

Предимплантационная генетическая диагностика триплоидных эмбрионов человека в программах ВРТ

¹Байкошкарлова С.Б., ²Сабырбек Ж.Б., ³Садыбекова Л.С., ⁴Махамбетова А.М., ¹Уморбекова Г.А., ¹Курманалиева Н.Г.

¹Клиника репродукции человека «Экомед», Казахстан, г. Алматы

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

³Таразский государственный университет имени М.Х.Дулати, Казахстан, г. Тараз

⁴Евразийский национальный университет имени Л.Н.Гумилева, Казахстан, г. Астана

E-mail: ecomed_marat@mail.ru

В рамках программы ЭКО триплоидные эмбрионы являются абортивным материалом и утилизируются. Однако потенциал и генетические механизмы, реализуемые в триплоидных эмбрионах до сих пор неизвестны. В этой связи исследование генетических показателей триплоидных эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий имеет не только прикладное, но и фундаментальное значение в понимании процессов оплодотворения и раннего эмбриогенеза человека. В ходе проведения исследования были получены данные по генетическим особенностям раннего эмбриогенеза триплоидных эмбрионов человека и различной частоте элиминации лишнего геномного набора в их генотипе, возникшего в результате дигинии, диандрии и диспермии. Была произведена оценка частоты нарушений сингамии и сегрегации хромосом у триплоидных эмбрионов человека. В ходе проведения исследования получены следующие результаты, выявлено, что у триплоидных эмбрионов человека существует механизм элиминации лишнего гаплоидного набора в раннем эмбриогенезе на стадии дробления, установлено, что частота диплоидных эмбрионов в группе дигинии составила 74,5%, в группе диспермии – 89% и в группе диандрии всего 10%, выявлена низкая частота (3%) нарушения сегрегации хромосом у триплоидных эмбрионов человека.

Ключевые слова: мейоз, оплодотворение, эмбрион, генетическая диагностика, триплоидия.

Появление вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) сделало возможным изучение механизмов оплодотворения ооцитов человека и особенностей раннего эмбриогенеза [1]. Основная масса получаемых ооцитов человека при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) являются зрелыми на стадии метафазы II (МII), хотя вполне возможно получение незрелых ооцитов в стадии зародышевого пузырька или метафазы I (MI) [1]. Впоследствии незрелые ооциты будут источниками аномальных зигот. Визуальный контроль зигот на пронуклеарной стадии не всегда может служить показателем точного потенциала эмбрионов и оценки их генетического набора [2]. Одной из наиболее частых геномных ошибок у человека является триплоидия. Триплоидные эмбрионы, возникающие в программах ВРТ, следовали различными онтогенетическими путями, даже если они были получены от одних родителей. Некоторые из них не были способны вступать в сингамию и инициальное дробление, тогда как другие могут делиться на два и более бластомера, доходя до стадии бластоцисты. Некоторые триплоиды сразу делятся на три бластомера в ходе первого деления и в дальнейшем дают морфологический нормальные эмбрионы, которые неотличимы от эуплоидных эмбрионов [2]. Это объясняет, почему является критичным отделение эуплоидных (2PN) зигот от полиплоидных зигот спустя 14-18 часов после оплодотворения, чтобы избежать переноса полиплоидных эмбрионов.

Существуют три главных механизма, ведущие к триплоидии. Наиболее распространенным является проникновение в ооцит двух спермиев и образование одного

материнского и двух отцовских пронуклеусов [3]. Обычные хромосомные наборы, дающие диспермические эмбрионы это 69XXX или 69XXY [1]. В ооцит может проникнуть, очень редко, двуклетный сперматозоид, который оказался неспособным к гаплоидизации во втором мейотическом делении (менее 8%) [4]. Спермии от мужчин с аномальными параметрами семени обнаруживают более значительную тенденцию формировать триплоидные эмбрионы посредством этого механизма, тогда как при нормозооспермии диспермические эмбрионы образуются преимущественно посредством оплодотворения двумя спермиями [5, 6]. Третий механизм триплоидии появляется за счет дигинии эмбрионов, содержащих два материнских пронуклеуса. Сохранение второго полярного тельца во время мейоза II является наиболее распространенной причиной дигинии эмбрионов, но они могут менее часто возникать и в результате сохранения первого полярного тельца во время мейоза I. Проникновение в двуклетный ооцит одиночного спермия будет давать, триплоидный эмбрион. Хотя триплоидия, является причиной примерно 15% репродуктивных потерь у человека [7], однако встречаются беременности с рождением ребенка, живущим до нескольких месяцев после родов [8].

В настоящее время основной задачей репродуктологии, является рациональное использование человеческих гамет и эмбрионов в программах ВРТ. В рамках программы ЭКО триплоидные эмбрионы являются абортивным материалом и утилизируются. Однако потенциал и генетические механизмы, реализуемые в триплоидных эмбрионах до сих пор неизвестны. В этой связи исследование генетических показателей триплоидных эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий имеет не только прикладное, но и фундаментальное значение в понимании процессов оплодотворения и раннего эмбриогенеза человека.

Основываясь на вышеизложенном целью наших исследований было изучение генетических показателей триплоидных эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований: интерфазные ядра бластомеров 125 триплоидных эмбрионов человека на стадии дробления в программах ЭКО. Были проведены исследования методом предимплантационной генетической диагностики интерфазных ядер для определения генетического набора по хромосомам 13, 16, 18, 21, 22, X, Y (Зонды компании Abbott Vysis, США);

Для проведения этих исследований были проанализированы 75 циклов предимплантационной генетической диагностики у 75 супружеских пар, прошедших различные программы ВРТ в период 2013-2014 годы на базе Института репродукции человека и эмбриологии (г. Алматы, Казахстан).

Возраст женщин варьировал в пределах от 23 до 45 лет. Стимуляцию суперовуляции у женщин проводили по схеме гонадотропинами, контролировали развитие фолликулов с помощью ультразвукового исследования. При достижении доминантными фолликулами размера 18-20 мм вводили триггер овуляции – хорионический гонадотропин (ХГ) в дозе 5-10 тыс. МЕ. Преовуляторные ооциты получали посредством трансвагинальной пункции фолликулов через 35-36 часов после инъекции ХГ.

Биопсию бластомеров проводили на эмбрионах достигших стадию 6-8 бластомеров, на третий день культивирования. Данная процедура осуществлялась при температуре 37⁰С. В лабораторных условиях, с помощью микроманипуляторов фирмы Narishige, в специальной среде PGD Biopsy Medium (Life Global) производился механический хэтчинг блестящей зоны эмбрионов. (рисунок 1). Здесь, в зависимости от диаметра иглы делали т,х,у образные разрезы. После хэтчинга с помощью биопсийной иглы производилась аспирация одного или двух бластомеров в зависимости от наличия ядра в аспирированном бластомере. Затем проводили фиксацию ядра, полученных бластомеров на предметных стеклах.



Рисунок 1 – Этапы хэтчинга при биопсии эмбрионов.

Для того, чтобы провести фиксацию ядер на предметных стеклах, готовили гипотонический и распластывающие растворы. Для приготовления гипотонического раствора смешивали 3,5% цитрат натрия и сывороточный альбумин в соотношении 5:1 и добавляли двойной объем дистиллированной воды. В состав распластывающего раствора входит дистиллированная вода, 1% Твин-20 и ледяная уксусная кислота. Каждый бластомер промывали в гипотоническом растворе в нескольких каплях. На предметное стекло капали распластывающий раствор и переносили в него бластомер. Затем наблюдали под микроскопом пока капля не высохнет и ядро не выйдет из цитоплазмы. Место, где зафиксировано ядро отмечали алмазным карандашом (рисунок 2).

Основные этапы FISH – диагностики:

- Предгибридизационная обработка
- Денатурация
- Гибридизация
- Постгибридизационная обработка
- Визуализация и интерпретация полученных результатов

Предгибридизационная обработка. Для обработки стекол готовили серию растворов. В состав 2*SSC входили растворы пепсина и параформальдегида. Для его приготовления брали 20*SSC и добавляли дистиллированную воду. Чтобы приготовить раствор пепсина брали 75 мл дистиллированной воды и 5 мкг кристаллического порошка пепсина, перемешивали и добавляли 65μl соляной кислоты. А для приготовления раствора параформальдегида использовали 500 мг параформальдегида, 25 мл 20*SSC раствора и 60 мл дистиллированной воды. Для того, чтобы параформальдегид полностью растворился ставили его на водяную баню при температуре 85⁰С. Затем в посуду Коплина наливали 2*SSC, раствор пепсина и ставили в водяную баню при температуре 37,5⁰С. А параформальдегид оставляли при комнатной температуре. Когда растворы были приготовлены, помещали стекла сначала в раствор 2*SSC на 5 минут, потом в раствор пепсина на 6 минут. Затем помещали обратно в раствор 2*SSC, для полоскания, а после оставляли в растворе параформальдегида на 17 минут. По истечении времени прополаскивали в растворе 2*SSC, в 70% и 90% спиртах, в дистиллированной воде и сушили в гибридизаторе. После того, как стекла подсыхали, капали ДНК-зонды, покрывали покровным стеклом, заклеивали парафильмом и ставили в гибридизатор. Далее начинали процесс денатурации.

Денатурация. Денатурацию производили при 86⁰С в течении 10 минут.

Гибридизация. Гибридизацию осуществляли при 43⁰С в течении 3 часов.

Постгибридизационная обработка. Для того, чтобы избавиться от неспецифического связывания зондов, промывали в 2*SSC растворе. Помещали растворы в водяную баню на 15 минут при температуре 37,5⁰С и ждали пока покровные стекла не отклеются. И затем прополаскивали в 70% и 90% спиртах, в дистиллированной воде и сушили в гибридизаторе.

Окрашивание и интерпретация результатов. На образцы капали Antifade, в состав которого входит DAPI, покрывали покровным стеклом и микроскопируем под иммерсией. Анализ результатов при помощи флуоресцентного микроскопа представляет собой регистрацию и идентификацию исследуемых хромосом специфически окрашенными флуоресцентными сигналами на различных фильтрах пропускающих свет определенной длины волны.

Регибридизация. После окончания первого цикла исследований убирали покровные стекла с предметных стекол и прополаскивали в 70% и 90% спиртах, в дистиллированной воде и сушили в гибридизаторе. После того, как стекла подсыхали, капали ДНК-зонды, покрывали покровным стеклом, заклеивали парафильмом и ставили в гибридизатор для второго цикла исследований.



Рисунок 2 – Этапы фиксации ядра бластомеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внедрение вспомогательных репродуктивных технологий дали возможность комплексному исследованию и глубокому пониманию морфо-физиологических и генетических закономерностей раннего эмбриогенеза эмбрионов человека.

Существует очень тонкий баланс, который необходимо поддерживать между гомологичными хромосомами родителей для того, чтобы зигота инициировала процесс дробления и сохранила последующую митотическую активность эмбриона. Этот баланс легко нарушается недостатком или избытком генетического материала одного из родителей. В этом случае часто эмбрионы останавливаются на разных этапах развития, при прохождении контрольных точек деления клеток и стадии блоков развития эмбрионов. Человеческие клетки чаще толерантны к избытку генетического материала в сравнении с недостатком. Как вышеуказывалось, триплоидные эмбрионы, возникающие в программах ВРТ, следуют различными онтогенетическими путями развития, даже если они были получены от одних родителей. Поэтому первым этапом наших исследований было изучение генетического набора триплоидных эмбрионов человека в зависимости от механизма оплодотворения, приведшего к триплоидии.

На рисунке 3 показаны результаты FISH диагностики триплоидного эмбриона элиминировавшего лишний набор генома и таким образом репарировавшего диплоидный набор хромосом. На 4 рисунке показаны результаты FISH диагностики триплоидного эмбриона с подтверждением триплоидии по хромосомам 13, 16, 18, 21, 22, X и Y.

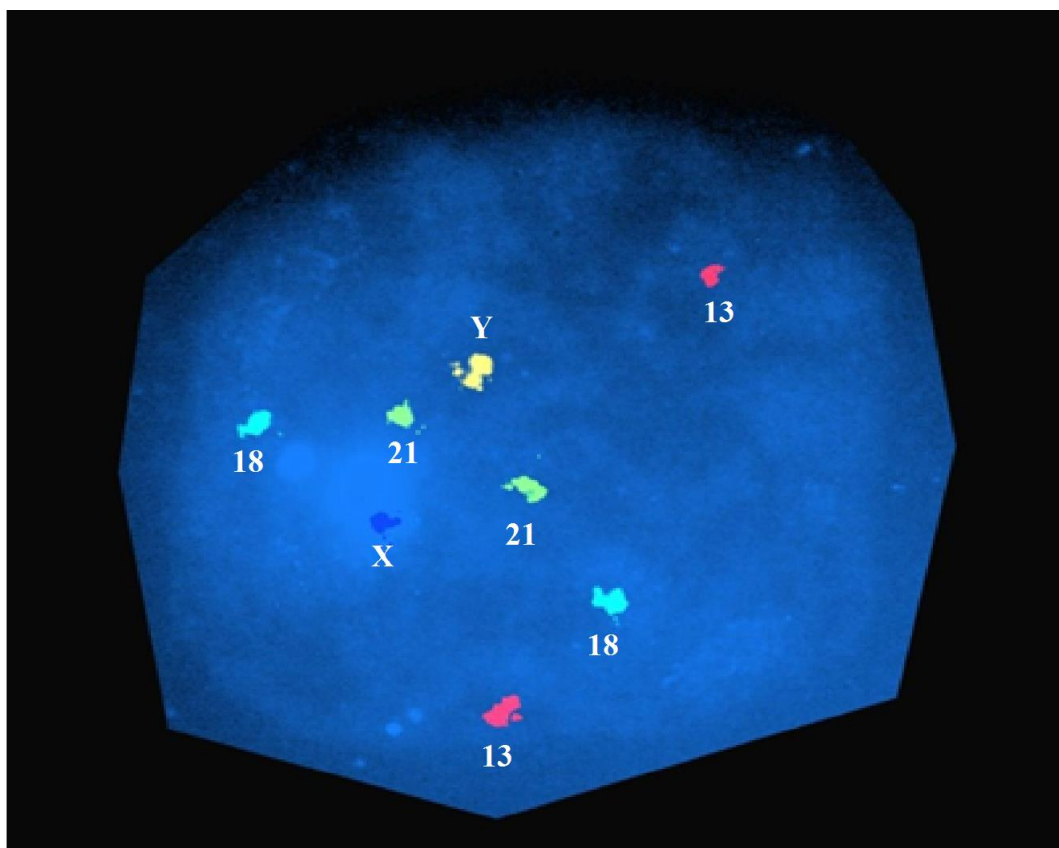


Рисунок 3 – Результаты FISH диагностики триплоидного эмбриона человека элиминировавшего лишний набор генома. (Увеличение x 1000).

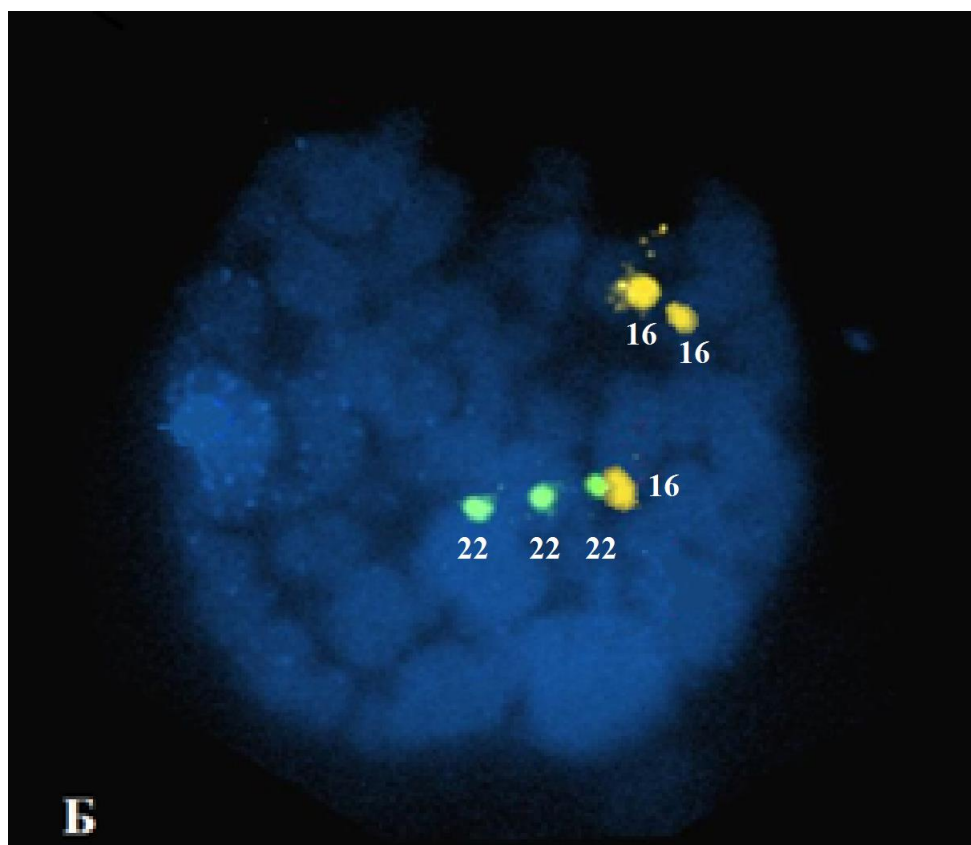
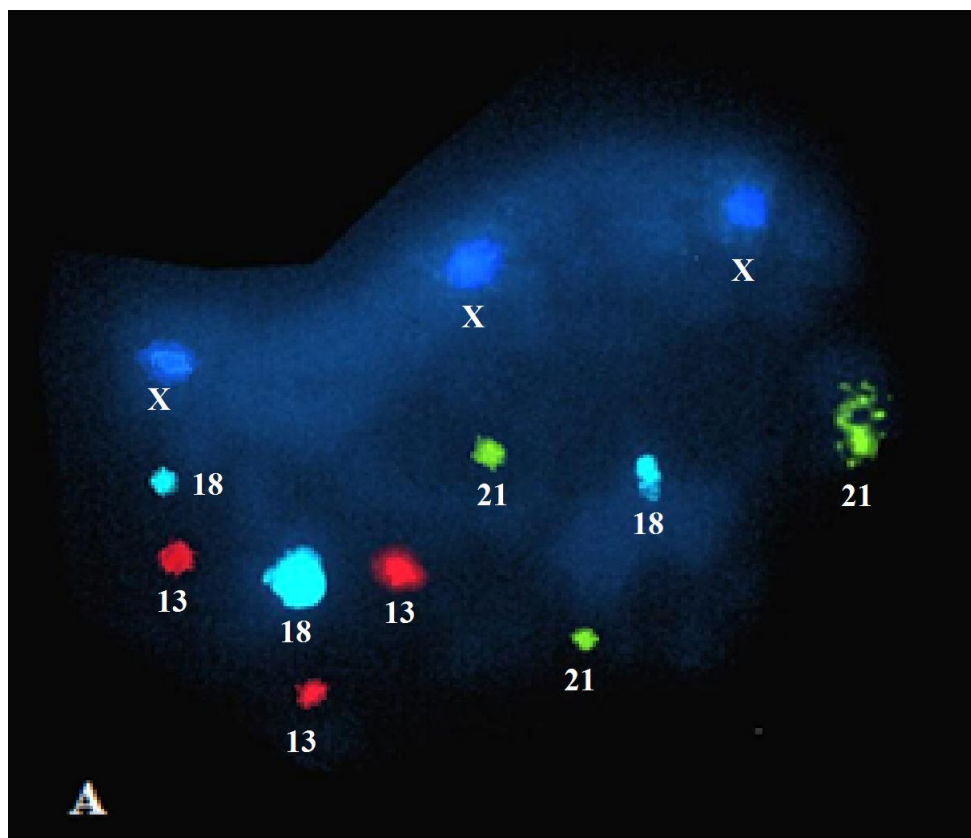


Рисунок 4 – Результаты FISH диагностики триплоидного эмбриона человека с аномальным набором хромосом. А - FISH диагностика по хромосомам 13, 18, 21, X и Y; Б - FISH диагностика по хромосомам 16 и 22 (Увеличение x 1000).

В таблице 1 приведены основные результаты FISH анализа на 125 триплоидных эмбрионов человека с указанием состояния развития на момент биопсии на третьи сутки, а также на пятый день культивирования. Как видно из таблицы 1 у 87 триплоидных эмбрионов по результатам FISH диагностики был диплоидный набор, что составило 69,6%. Самая высокая частота диплоидных эмбрионов была выявлена в группе диспермии, а самая низкая в группе диандрии. Соответственно количество аномальных эмбрионов было высоким в группе диандрии и самая низкая частота была в группе диспермии.

Таблица 1 - Основные результаты FISH анализа интерфазных ядер бластомеров 125 эмбрионов человека.

Оплодотворение	N	6-8 кл.	Бластоцисты	aN	6-8 кл.	Бластоцисты
Дигиния	74,5%	38	5	24,5%	13	0
Диандрия	10%	2	0	90%	19	0
Диспермия	89%	47	7	11%	6	0

Было выявлено, что у триплоидных эмбрионов человека существует механизм элиминации лишнего гаплоидного набора в раннем эмбриогенезе. Частота диплоидных эмбрионов в группе дигинии составила 74,5%, в группе диспермии – 89% и в группе диандрии всего 10%.

На следующем этапе наших исследований мы изучали явление мозаицизма у триплоидных эмбрионов человека для исключения ошибок анализа.

Таблица 2 - Результаты FISH анализа мозаицизма при проведении полной биопсии 60 эмбрионов человека

№	Результаты FISH диагностики	Количество эмбрионов
1	46, XY	15
2	46, XX	11
3	69, XXX	10
4	69, XXY	6
5	69, XYY	2
6	47, XX, +13	3
7	45, XX, -13	1
8	47, XX, +16	1
9	45, XX, -16	1
10	47, XX, +18	1
11	47, XY, +21	1
12	45, XX, -21	1
13	47, XX, +22	1
14	45, XX, -22	1
15	45, XO	1
16	48, XY, +16, +22	1
17	48, XX, +13, +21	1
18	48, XY, +13, +16; 45, XO; 46,XY	1
19	47, XX, +21; 44, XX, -16, -18	1

Как показано в таблице 2, количество генетически здоровых эмбрионов составило 40% (24 эмбриона), из них 14 – 46,XY, а 10 – 46,XX. Количество триплоидных эмбрионов 18, что составляет 30 % от общего числа эмбрионов. И, наконец, в результате проведения исследования было выявлено 2 эмбриона с мозаичным геномом, у которых выявлена низкая частота (3%) нарушения сегрегации хромосом.

ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенные исследования и полученные на их основе данные позволяют сделать следующие выводы:

- Выявлено, что у триплоидных эмбрионов человека существует механизм элиминации лишнего гаплоидного набора в раннем эмбриогенезе на стадии дробления.
- Установлено, что частота диплоидных эмбрионов в группе дигинии составила 74,5%, в группе диспермии – 89% и в группе диандрии всего 10%.
- Выявлена низкая частота (3%) нарушения сегрегации хромосом у триплоидных эмбрионов человека.

Литература

- 1 Rienzi L., Vajta G., Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature // Human Reproduction. – 2011. – Vol. 17, No. 1. – P. 34–45. DOI: 10.1093/humupd/dmq029
- 2 Veeck L.L. An Atlas of Human Gametes and Conceptuses // Parthenon Publishing. – 1999. – P. 223–256. DOI: 10.1201/b14639
- 3 Staessen C., Van Steirteghem A.C. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization // Hum. Reprod. – 1997. – Vol. 12, No. 2. – P. 321–327. DOI: 10.1093/humrep/12.2.321
- 4 Gordon J.W., Grunfeld L., Garissi G.J. Successful microsurgical removal of a pronucleus from trippronuclear human zygotes // Fertil Steril. – 1989. – Vol. 52, No. 3. – P. 367–372. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)60901-9
- 5 Macas E., Imthurn B., Roselli M., Keller P.J. The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection // Hum. Reprod. – 1996. – No. 11. – P. 2496–2501.
- 6 Egozcue S., Blanco J., Vidal F., Egozcue J. Diploid sperm and origin of triploidy // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17, No. 1. – P. 5–7. DOI: 10.1093/humrep/17.1.5
- 7 Dyban A.P., Baranov V.S. Cytogenetics of Mammalian Embryonic Development // Clarendon Press, Oxford. – 1987. – P. 40–67.
- 8 Rosenbusch B., Schneider M., Glaeser B., Brucker C. Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17, No. 9. – P. 2388–2393. DOI: 10.1093/humrep/17.9.2388

ҚРТ бағдарламаларында адамның триплоидты эмбриондарына имплантацияға дейінгі генетикалық диагностика жүргізу мәселесі

¹Байқошқарова С.Б., ²Сабырбек Ж.Б., ³Садыбекова Л.С., ⁴Махамбетова А.М.,

¹Уморбекова Г.А., ¹Құрманалиева Н.Ғ.

¹ «Экомед» адам ұрпағын өрбіту емханасы, Қазақстан, қ. Алматы

²эл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Қазақстан, қ.Алматы

³М.Х.Дулати атындағы Тараз мемлекеттік университеті, Қазақстан, қ. Тараз

⁴Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, қ. Астана

E-mail: ecomed_marat@mail.ru

Денеден тыс ұрықтандыру бағдарламасының аясында триплоидты эмбриондар аборттық материал болып табылып, жойылады. Алайда, триплоидты эмбриондардың іске асырылатын потенциалы және генетикалық механизмдері әлі күнге дейін белгісіз. Осыған байланысты, ҚРТ бағдарламаларында адамның триплоидты эмбриондарының генетикалық көрсеткіштерін зерттеу – ұрықтандыру процесстері мен адамның ерте эмбриогенезі түсініктеріне тек қолданбалы ғана емес, сонымен бірге фундаментальді мән береді. Зерттеу жүргізу барысында адамның триплоидты эмбриондарының ерте эмбриогенезіндегі генетикалық ерекшеліктері және дигиния, диандрия сонымен қатар диспермия салдарынан пайда болған генотиптегі артық жиынтықтың әртүрлі дәрежедегі элиминациясы бойынша мағлұматтар алынған. Адамның триплоидты эмбриондарындағы сегрегация және сингамия үрдістеріндегі хромосомалардың бұзылыстарына баға берілді. Зерттеу жүргізу барысында келесі нәтижелер алынды, адамның триплоидты эмбриондарында ерте эмбриогенезінде бөлшектену сатысында артық гаплоидтық жиынтықтың элиминациясы орын алатыны анықталды, дигиния тобындағы диплоидты эмбриондардың кездесу жиілігі – 74,5%, диспермия тобында – 89% және диандрия тобында – 10% ғана екендігі белгілі болды, адамның триплоидты эмбриондарында хромосомалардың сигрегациясының бұзылыстарының төмен жиілігі (3%) анықталды.

Түйін сөздер: мейоз, ұрықтандыру, эмбрион, генетикалық диагностика, триплоидия.

Preimplantation genetic diagnosis of human triploid embryos in art programs

¹Baikoshkarova S.B., ²Sabyrbek Zh.B., ³Sadybekova L.S., ⁴Mahambetova A.M.,

¹Umorbekova G.A., ¹Kurmanaliyeva N.G.

¹Human Reproduction clinic "Ecomed", Kazakhstan, city Almaty

²Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, city Almaty

³Taraz State University named after M.H.Dulati, Kazakhstan, city Taraz

⁴Eurasian National University named after L.N. Gumilev, Kazakhstan, city Astana

E-mail: ecomed_marat@mail.ru

Within the IVF program, triploid embryos are abortive material and are disposed of. However, the potential and genetic mechanisms realized in triploid embryos are still unknown. In this case, the study of the genetic indices of human triploid embryos in the programs of assisted reproductive technologies is not only applied but also fundamental in understanding the processes of fertilization and early embryogenesis of human. During the study, data were obtained on the genetic features of early embryogenesis of human triploid embryos and the different frequency of elimination of excess genomic set in their genotype that arose as a result of diandra, diginiya and dispermy. An assessment was made of the incidence of singamy disorders and chromosome segregation in human triploid embryos. In the course of the study, the following results were obtained, it was found that in human triploid embryos, there is a mechanism for eliminating the excess haploid set in early embryogenesis at the cleavage stage, it was found that the frequency of diploid embryos in the diginic group was 74.5%, in the dispermy group 89% In the diandra group only 10%, a low frequency (3%) of the violation of chromosome segregation in human triploid embryos was detected.

Key words: meiosis, fertilization, embryo, genetic diagnosis, triploidy.