

ЁРДАМЧИ РЕПРОДУКТИВ ТЕХНОЛОГИЯЛАР САМАРАДОРЛИГИНИ ОШИРИШДА ЯНГИ МЕТОДОЛОГИК ЁНДОШУВЛАРНИНГ ҚўЛЛАНИЛИШИ

Юлдашева С.З.,

Тошкент тиббиёт педиатрия институти.

✓ Резюме

Гамета ва эмбрионларни танлашнинг замонавий юқори технологик усуллари қўлаш, имплантация учун юқори имкониятга эга бўлган эмбрионларни танлаб олиш учун қулайлик яратади. ЁРТ нинг мақсади бўлиб битта соғлом боланинг туғилиши ҳисобланади. Шунга кўра, клиник эмбриологиянинг вазифаларига, амалий тиббиётда соғлом бола туғилиши учун энг юқори компетентликка эга бўлган эмбрионни аниқлаш имконини берувчи скрининг ўтказиш методикаларини яратиш, тадбиқ этиш ва қўлаш кирази. TimeLapse тўхтовсиз видеокузатувининг янги ажойиб технологиясининг қўлланилиши ҳар бир ривожланаётган эмбрионнинг морфодинамик ва морфокинетик индивидуал хусусиятларига баҳо бериш имконини беради. Тўхтовсиз *in vitro* шароитидаги микроскопия ҳужайраларнинг майдаланишида, бластоцистанинг шаклланишидаги асосий ҳодисаларни эрта аниқлаш учун шароит яратади. Тиббиётда янада кенг қўлланилаётган скринингнинг яна бир бошқа тури - бу эмбрионларнинг анеуплоидиясини аниқловчи генетик скринингдир. Турли муаллифларнинг маълумотларига кўра, ривожланаётган эмбрионларда анеуплоидиялар даражаси 70% гача ташкил этади. Генетик "соғлом" эмбрионни бачадон бўшлиғига кўчириб ўтказиш, соғлом бола туғилишини кутиш вақтини камайтиради ва генетик касалликлар билан туғиладиган болаларнинг олдини олади.

Калит сўзлар: эмбрион, одам, культивациялаш, генетик скрининг.

ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Юлдашева С.З.,

Ташкентский Педиатрический медицинский институт.

✓ Резюме

Применение современных высокотехнологичных методик отбора гамет и эмбрионов позволяет выбрать эмбрион, имеющий наиболее высокие шансы на имплантацию. Целью ВРТ является рождение одного здорового ребенка. В связи с этим задачами клинической эмбриологии является создание, внедрение и использование в практической медицине методик, позволяющих проведение скринингов, позволяющих определить наиболее компетентные для рождения здорового ребенка эмбрионы. Применение новой уникальной технологии непрерывного видеонаблюдения TimeLapse позволяет оценить индивидуальные особенности морфодинамики и морфокинетики каждого развивающегося эмбриона. Благодаря непрерывной микроскопии *in vitro* удается зафиксировать основные события раннего клеточного дробления, формирование бластоцист. Другой вид скрининга, который в последние годы приобретает все более широкое применение в медицине - это генетический скрининг на анеуплоидии эмбрионов. По данным разных авторов, уровень анеуплоидий в развивающихся эмбрионах составляет до 70%. Перенос генетически "здорового" эмбриона в полость матки позволяет снизить время ожидания рождения здорового ребенка и направлен на предотвращение рождения детей с генетическими заболеваниями.

Ключевые слова: эмбрион, человек, культивирование, генетический скрининг

APPLICATION OF NEW METHODOLOGICAL APPROACHES TO IMPROVE THE EFFICIENCY OF ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES

Yuldasheva S.Z.,

Tashkent Pediatric Medical Institute.

✓ Resume

The use of modern high-tech techniques for selecting gametes and embryos allows one to choose an embryo that has the highest chances of implantation. The goal of ART is the birth of one healthy child. In this regard, the tasks of clinical embryology are the creation, implementation and use in practical medicine of techniques that allow the screening to determine the most competent embryo for the birth of a healthy child. The use of the new unique technology of continuous video surveillance allows TimeLapse to evaluate the individual features of the morphodynamics and morphokinetics of each developing embryo. Thanks to continuous *in vitro* microscopy, it is possible to record the main events of early cell crushing, the formation of blastocysts. Another type of screening, which in recent years has become more widely used in medicine - is genetic screening for aneuploidy of embryos. According to different authors, the level of aneuploidy in developing embryos is up to 70%. The transfer of a genetically "healthy" embryo to the uterine cavity can reduce the waiting time for the birth of a healthy child and is aimed at preventing the birth of children with genetic diseases.

Key words: embryos, human, cultivation, genetic screening

Ёрдамчи репродуктив технологиялар (ЁРТ) (Assisted reproductive technology (ART)-тиббӣёт амалиётига бепуштликни олдини олувчи аввалдан ва мустаҳкам кириб келган усуллардан ҳисобланади. Кўп ҳолатларда, кутилган натижага - ҳомиладорликнинг самарали яқунланиши ва соғлом бола туғилиши - эришилади. Бироқ, ҳаттоки энг замонавий методикалар ҳам ЁРТ дастурини ўтказгандан сўнг ҳомиладор бўлишнинг ўртача 50-60% бўсағасини ўтиш имкони бормади. Пациентларнинг ЁРТ га мурожаат қилишларидан аввал мустақил равишда бепуштликка қарши ўтказган узоқ муддатли муолажалари, давола-нишлари ҳомиладор бўлиш ва соғлом бола туғилиши имкониятини янада камайтиради. Бундай ҳолатларда ЁРТ методикаларининг самарадорлигини оширишга талаб пайдо бўлади. Молекуляр генетика ва эмбрионларнинг культивациялаш янги технологиялари соҳа-сидаги замонавий диагностик усулларнинг ривожла-нишини инобатга олган ҳолда, уларнинг биргаликда ЁРТ самарадорлигини ва пациентларни қониқтириш даражасини оширишга эришиш мумкин.

Текширувларнинг актуаллигини қатор далиллар билан келтириш мумкин. Биринчидан, дунё аҳоли-сининг, умуман олганда, ва Россияда хусусан, ре-продуктив соғлиқнинг ёмонлашувининг мустаҳкам тенденцияси кузатилмоқда, бу бепуштлик даража-сининг ошиши, аёллар ва эркаклар фертиллигининг ўртача кўрсаткичларининг пасайишида намоён бўляпти. Бугунги кунда бепушт жуфтликлар миқдо-ри (бир йилгача ҳомиладор бўлмаган) Россияда 15% ни ташкил этмоқда ва бу фоиз ошиб бормоқда [2,5]. Ушбу ҳолат ЁРТ усуллари билан даволаниш учун мурожаат этаётган пациентлар миқдорини оширмоқ-да ва юқори самарали ташхис ва даволаниш усулла-рига талабларни оширмоқда. Яна бир муҳим омил-ларга, ҳомила ва янги туғилган болаларнинг туғма нуқсонлари, ўз-ўзидан ҳомиладорликнинг тугалла-ниши ва одатий ҳомила ташлаш каби асоратлар ки-ради. Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилоти (ЖСС) докладларига кўра, ҳомила ривожланишининг туғ-ма нуқсонлари ва янги туғилган болаларнинг пато-логиялари деярли 5% ни ташкил этади [3]. Ушбу гу-руҳда генетик табиатга эга касалликлар кўп миқдор-ни ташкил этади: хромосома, моноген ва мульти-фактор. Бунда, ногиронликка олиб келувчи ва янги туғилган болалар ҳаётининг прогнозига энг салбий таъсир кўрсатувчи бўлиб асосан хромосома касал-ликлари ҳисобланади. Ирсий (генетик) табиатга эга бўлган ҳомила ривожланишининг туғма нуқсонла-ри ва янги туғилган болаларнинг патологияларини преконцепцион босқичда олдини олувчи ҳозирда қўлланилиб келаётган чора-тадбирлар билан бир қаторда, ЁРТ методикаларини бажаришда қўшим-ча профилактик чораларни кўриш талаб этилади. Шунингдек, ЁРТ технологияларини (эмбрионлар-ни *in vitro* шароитида уруғлантириш ва кейинчалик ҳомиладорликнинг вақтидан илгари тугалланиши-ни олдини олувчи чора-тадбирлар) қўллашнинг ўзига хослиги, ирсий (генетик) патологияли бола туғилиши хавфини популяцияон частотага нисбатан оширади, чунки терапевтик чоралар прогностик нохуш ҳомиладорликнинг табиий механизмларига тўсқинлик қилади. Ҳомиладорликнинг бирламчи этапларида замонавий қўллаб-қувватловчи методи-

калар кўп ҳолатларда бундай "ҳимояловчи табиий механизм"ни олдини олади [9, 11].

Охирги йилларда кўпгина изланувчилар томони-дан берилган маълумотларга кўра, ҳомиладорликни режалаштирувчи аёлларнинг ўртача ёшининг ортиши ва улар орасида шунга кўра, ҳомиланинг туғма ва ирсий касалликлари хавфининг ошганлиги кузатил-моқда. Охирги 20 йил ичида оилада биринчи фарзанд-нинг туғилиши 20-25 дан 25-30 ёшга ошган, бундан ташқари, қуйидаги ижтимоий модел - битта, кам ҳолатларда - иккита фарзанднинг туғилиши кузатил-моқда. Ушбу ҳолат ЁРТ нинг самарасиз бўлишига са-баб бўлмоқда, чунки бундай ҳолатларда овариал ре-зервнинг пасайиши, патологик ҳомиладорлик, ҳоми-ла ва янги туғилган чақалоқларнинг туғма нуқсонла-ри хавфининг эса кўтарилиши, шунингдек, табиий менапауза ёшига етгунча ЁРТ усуллари билан давола-ниш даврининг қисқариши кузатилади [4]. ЁРТ усул-лари билан даволашнинг ижобий натижаларига катта аҳамият берилади. Бунга сабаб, охирги йилларда кли-никаларга бепуштликни даволаш мақсадида овариал резерви пастлиги билан мурожаат этувчи аёллар со-нининг ортиши, олинадиган эмбрионлар миқдори-нинг камайишидир, натижада ЁРТ дастурининг сама-расизлиги хавфи ошиб бормоқда, шу билан бирга ҳар бир имкониятнинг аҳамияти ва баҳоси ошиб бормоқда. Бундай шароитда, эмбриогенез жараёнининг нормал кечишига, унинг бачадон деворига имплантация бўли-шига, ҳомиланинг нормал ривожланишига тўсқин-лик қилувчи эмбрионнинг генетик етишмовчиликла-ри билан боғлиқ омодсизликнинг "баҳоси" юқори бўлиб бормоқда. Яна шуни таъкидлаш керакки, бун-дай пациентларни даволаш қимматлашиб бориши ҳам муҳим аҳамиятга эга. Бунга сабаб, масалан, генетик патологияси бўлган эмбрионларни беҳуда криокон-сервациялаш, уларнинг "генетик соғломлиги"ни ва пациент кутган натижаларнинг имкониятларини ино-батга олмаган ҳолда ўтказилган муолажалар ва ҳ.к [6].

Ҳозирги вақтда бепуштликни ЁРТ усуллари би-лан даволашда этик аспектларига катта аҳамият бе-рилмоқда. Улардан бири - пациентларга генетик па-тологияси бўлган эмбрионни кўчириб ўтказиш, ҳоми-ладорликнинг вақтидан илгари спонтан ёки меди-каментоз (агар ҳомилада пренатал жиддий патология аниқланса) тугаши эҳтимоли даражасини оширади. Бу пациентларда психологик муаммоларнинг келиб чи-қишига, яъни репродуктив реализация бўйича режа-ларини кейинроққа суриши ёки бутунлай тўхтатиши-га олиб келиши мумкин. Бундан ҳам мураккаброғи, этик нуқтаи назардан қараганда, она ва бола учун ҳам, боланинг генетик патология билан туғилишидир.

Келтирилган барча омиллар ЁРТ дастуридаги эм-бриологик этапнинг замонавий технологияларини ри-вожлантиришни биринчи ўринга қўйишни тақозо этади. Эмбрионларни олиш, ташхислаш ва культивациялаш технологияларини тўғри танлаш ва қўллаш ёрдамчи репродукция марказларининг ишларида катта ютуқ-ларга олиб келади.

Предимплантацион ташхислаш усуллари ичида диагностик ёндошувни (PGD) фарқлаш зарурдир. Унинг вазифасига эмбрионни эҳтимолий касалликка нисбатан селекция қилиш, унинг ташувчи ёки авло-дида мавжудлиги аниқ бўлган ҳолатларда, хромосома касалликлар профилактикаси учун ўтказиладиган пре-димплантацион скрининг текширувлари (PGS) киради [7, 8, 10]. Шунга кўра, агар PGD текширув усулида

асосан PCR технологияси қўлланилса, PGS да ҳозирга вақтда киесий геном гибридизация (а-CGH), ёки кейинги авлод секвенирлаш (NGS) ўтказилмоқда, шунингдек керакки, охириги вақтда юқори махсуддорликка эга бўлган скрининг усулининг талабгорлиги юқори [1, 12, 13].

Мақсад:

Ушбу изланишнинг мақсади, предимплантацион генетик анализ (скрининг) ва тўхтовсиз видеокузатув билан олиб бориладиган культивациялаш (TimeLapse инкубатор) каби замонавий усулларнинг афзалликларини аниқлаш.

Материал ва усуллар

2013–2015 йиллар давомида TimeLapse технологиясини қўллаб 743 та цикл ўтказилган. Эмбрион ривожланишини видеокузатув тизими 6 та PrimoVision (Vitrolife, Sweden) микроскоплари томонидан намойиш этилди. Микроскоплар Heracell - 240 (Germany) инкубаторларига ўрнатилди. Уларни сошлаш ва қўллаш ишлаб чиқарувчи завод талабларига кўра амалга оширилди. Эмбрионларни культивация қилиш махсус WOW (Vitrolife, Sweden) идишларида, универсал Continuis Single Culture (Irvine Scientific, USA) муҳитида культивациялашнинг 1- дан 5-6- кунигача олиб борилди. Культивациялашда ушбу тизимни қўллаш учун пациентларни танлашда махсус мезонлар қўлланилмади. Тизимга тўғри on-line кириш мумкин.

Культивациялашнинг 1- дан 5-6- кунигача эмбрион ривожланишига in vitro баҳо беришда майдаланиш жараёнининг биринчи учта бўлиниши, биринчи ва иккинчи бўлинишнинг вақт диапозони, шунингдек майдаланиш характери (морфокинетика) инobatга олинди.

Юқорида келтирилган барча мезонлар танлаб олинadиган эмбрионлар ва кўчириб ўтказиладиган эмбрионлар учун предиктор бўлиб хизмат қилди.

Битта эмбрионни 5-суткада (SSET -эмбрион селекция трансфер) электив кўчириб ўтказиш мезони бўлиб хизмат қилди: иккита юқори сифатли эмбрионларнинг мавжудлиги, анамнезда пациент ёши 35 дан кам, бундан аввал ЭКО га ҳаракат қилинмаганлиги. Битта эмбрионни 5-суткада (SSET) селекция кўчириб ўтказиш мезони бўлиб хизмат қилди: аввалги хирургик аралашувлар натижасидан кейинги бачадондаги чандиқ ва бошқа клиник вазиятлар.

2015–2017 йиллар давомида преимплантацион генетик ташхислаш билан 57 та цикл ўтказилган. Биопсия, анамнезда кўплаб самарасиз ЭКО ўтказган, кариотип патологиясига эга бўлган ёши катта пациентларда ўтказилди. 5-6 кундан кейин эмбрион сифатига кўра, PGS ўтказилиш зарурати баҳоланди. Предимплантацион генетик скрининг (PGS) усули юқори махсуддор секвенирлашнинг (NGS) янги авлодини қўллашга асосланган [13]. Анализ Illumina MySeq секвенаторида ўтказилади. Текширув учун материал - эмбрион культивациясидан кейин 5-6 кунда олинган трофэктодерма ҳужайралари, молекуляр генетик лабораториясига, ҳужайра материаллини стабиллаштирувчи, оптимал шароитда етказилди. Текширув натижасида эмбрион геноми барча 46 та хромосома бўйича баҳоланди. а-CGH методикасидан фарқли равишда NGS турли хилдаги хромосома касалликларини, хро-

мосомал дисбалансни юқори даражада ташхислаш имконини беради [7, 12].

Натижа ва таҳлиллар

Эмбрионларнинг ривожланишида жуда муҳим хавфли морфодинамик ходиса бўлиб, масалан, зиготанинг 3 та бластомерга бўлиниши (бундай эмбрионлар генетик ташхислаш вақтида 99,9% анеуплоидияни намойиш этади), шунингдек реверсив майдаланиш ҳисобланади.

Стандарт морфологик баҳолашда ушбу ходисаларни эътиборга ололмаслик, тўхтовсиз видеокузатув тизимининг культивация шароитида эмбрионлар селекцияси сифатини, шунингдек аъло ва яхши сифатли эмбрионларнинг умумий чиқишини кескин оширади.

Ўтказилган текширувлар натижасида клиник ҳомиладорликнинг учраши кўрсаткичлари, 5eSET ва 5SET гуруҳларида статистик аҳамиятга эга фарқларни кўрсатмади; кўчириб ўтказиш турини инobatга олмаган ҳолда, ҳомиладорликнинг учраши кўрсаткичлари I - гуруҳда II - гуруҳга нисбатан юқори (61,28% и 53,03%).

Ривожланишнинг 5-суткасида, юқори сифатли эмбрионлар, тўхтовсиз видеокузатувни қўллаган ҳолда культивациялашда 77% ни, культивациянинг стандарт усуллари қўллаган ҳолда 65,2% ни ташкил этди.

NGS усулини қўллаш бачадон бўшлиғига генетик "соғлом эмбрион"ни кўчириб ўтказиш имконини беради, бироқ бу эмбрион учун инвазив муолажа ҳисобланади ва унинг ривожланиши тўхташи хавфини тугдиради.

Бундан ташқари, тахминан 25% биопсияларда кейинчалик секвенирлаш натижасида, кўчириб ўтказишга яроқли эмбрионлар аниқланмайди. 70% гача биопсияланган эмбрионлар анеуплоидия статусига эга. Битта генетик "соғлом" эмбрионни кўчириб ўтказиш циклида ҳомиладорликнинг учраши кўрсаткичлари, ўтказилган текширувлар натижасига кўра 53% ни ташкил этди.

Шундай қилиб, ЁРТ дастурлари эмбриологик этапнинг замонавий технологиялари инвазив (time-lapse) ва инвазив генетик скрининг (PGS) усуллари қўллаган ҳолда, имплантация учун энг компетент эмбрионни танлаб олиш имконини беради.

АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ:

1. Глинкина Ж.И., Курцер М.А., Будник И.В. Исследование хромосомной патологии в клетках неразвивающегося хорiona методом высокопроизводительного секвенирования. /Доктор. Ру №7. 2017.
2. Джамалудинова А. Ф., Гоняев М. М. Репродуктивное здоровье населения России. //Молодой ученый. №14 - 2, 2017.
3. Доклад Секретариата ВОЗ. Борьба с генетическими заболеваниями. Сессия 116, 2005.
4. Кузнецов В.Н., Рыбаковский Л.Л. Стратегия демографического развития России. /М., ЦСП.: 2005.
5. Леваков С.А., Павлова С.А., Бугрова Т.И., Кедрова А.Г. Современный взгляд на бесплодный брак. //Клиническая практика №3, 2010.
6. Русанова Н.Е. Репродуктивные возможности демографического развития. /М, "Спутник плюс", 2008.
7. Шурыгина О.В., Шелочков А.М., Сараева Н.В., Кулакова О.В., Юлдашева С.З., Новые методологические подходы в культивировании и молекулярной диагностике эмбрионов человека. //Вестник новых медицинских технологий. №4, 2018
8. Fiorentino F., Biricik A., Bono S, Spizzichino L., Cotroneo E., Cottone G., Kokocinski F., Michel C.E. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-

- chromosome aneuploidy screening of embryos. Fertil. Steril., 2014
9. Handyside A.H. Preimplantation genetic diagnosis after 20 years. Reprod Biomed Online. 2010
10. Hansen M., Kurinczuk J.J., Bower C., Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. N.Engl.J.Med. 2002
11. Harper J.C., SenGupta S.B. Preimplantation genetic diagnosis: State of the ART 2011. Hum Genet. 2012.
12. Liberman R.F., Getz K.D., Heinke D., Luke B., Stern J.E., Declercq E.R., Chen X., Lin A.E., Anderka M. Assisted

Reproductive Technology and Birth Defects: Effects of Subfertility and Multiple Births. Birth Defects Res. 2017

13. PGDIS position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocyst stage. PGDIS Newsletter, July 19, 2016
14. Sahoo T., Dzidic N., Strecker M.N., Commander S., Travis M.K., Doherty C., Tyson R.W., Mendoza A.E., Stephenson M., Dise C.A., Benito C.W., Ziadie M.S., Hovanes K. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges. Genet Med. 2017.

Келиб тушган вақти 09.09.2020