

пациентов выявлено не было. По остальным трем полиморфизмам гена *p53*, в том числе по ОНП в экзоне 4, приводящему к несинонимичной замене аминокислоты в белке, достоверных отличий по частотам аллелей и генотипов между подвыборками больных УИВР молочной железы не обнаружено.

Ранее McGuire (1975 г.) показал, что чувствительность РМЖ к воздействию эстрогенов и антиэстрогенов коррелирует с количественным содержанием рецепторов в опухоли. Прогностическое значение эстроген-рецепторного статуса опухоли объясняется его корреляцией с факторами, определяющими благоприятный прогноз, такими как низкий пролиферативный индекс, гистологические особенности опухоли и т.д.

Полиморфизм  $C \rightarrow T$  в 3'-фланкирующей области гена *p53* расположен на расстоянии около 1500 п.н. от стоп-кодона трансляции *p53*. Потенциально он может влиять на события посттранскрипционной модификации мРНК гена *p53*. Учитывая данные о низкой степени дифференцировки клеток опухолевой ткани и более злокачественном характере течения РМЖ у больных с низким содержанием рецепторов «ER» и/или «PR», можно предположить, что выявленное нами повышение частоты гомозигот  $T/T$  полиморфизма  $C \rightarrow T$  в 3'-фланкирующей области гена *p53* в группах больных с «ER-» статусом и/или «PR-» статусом, свидетельствует об ассоциации данного генотипа с более злокачественным течением заболевания. Это указывает на сомнительность положительного эффекта при попытках эндокринной коррекции в ходе лечения онкологического заболевания. Женщины с генотипом  $T/T$  полиморфизма  $C \rightarrow T$  в 3'-фланкирующей области гена *p53* потенциально могут составлять группу риска с более злокачественным течением РМЖ. Данные ассоциативного анализа указывают не только на гормонозависимую значимость 3'-фланкирующей области гена *p53* при формировании патологического фенотипа, но и на необходимость учета генотипа по данному полиморфизму при терапии больных гормональными препаратами.

#### **Выводы**

Таким образом, женщины с генотипом  $T/T$  полиморфизма  $C \rightarrow T$  в 3'-фланкирующей области гена *p53* потенциально могут составлять группу риска с более злокачественным течением РМЖ. Данные ассоциативного анализа указывают не только на гормонозависимую значимость 3'-фланкирующей области гена *p53* при формировании патологического фенотипа, но и на необходимость учета генотипа по данному полиморфизму при терапии больных гормональными препаратами.

#### **Литература**

1. Ghosh A., Stewart D., Matlashewski G. Regulation of human *p53* activity and cell localization by alternative splicing // Mol. and Cell. Biology. - 2004. - P. 7987-7997.
2. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.// Cold Spring Harbor Lab. Press. - 1989.

#### **Резюме**

Выявлено статистически достоверное увеличение частоты гомозигот  $T/T$  полиморфизма  $C \rightarrow T$  в 3'-фланкирующей области гена *p53* в группе больных УИВР с «ER - » и/или «PR-» статусом опухоли по сравнению с выборкой пациентов с «ER+» и/или «PR+» статусом ( $P_{\chi^2}=0,031$  и  $0,003$  соответственно).

Statistically significant increasing in  $T/T$  homozygotes frequency for  $C/T$  polymorphism located in *p53* gene 3'-flanked region in two IDC patients groups with «ER - » and/or «PR-» tumor status compared to «ER+» and/or «PR+» status patients was detected ( $P_{\chi^2}=0,031$  and  $0,003$ , respectively).

## **ВПЛИВ ВІКУ ЖІНКИ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ООЦИТІВ ТА РАННІХ ЕМБРІОНІВ, ОТРИМАНИХ В ПРОГРАМАХ ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO***

Зниження жіночої фертильності з віком - явище суто фізіологічне. Воно починається приблизно з 35 років, а близько 50 років фертильність майже повністю втрачається. Зниження репродуктивного потенціалу призводить до зменшення ймовірності настання вагітності та збільшення частоти спонтанних абортів у жінок старшого віку. Причини та механізми зниження фертильності з віком досить інтенсивно вивчаються. Допоміжні репродуктивні технології відкрили нові можливості для дослідження цієї проблеми, оскільки весь процес - від отримання та запліднення ооцитів до розвитку доімплантаційних ембріонів - можна спостерігати поза організмом.

Існує припущення, що причиною зниження фертильності з віком може бути зменшення пулу оваріальних фолікулів, здатних до розвитку, а також зміни гормонального статусу жінок старшого віку [1]. Значна кількість дослідників вважає, що вік жінки – це один з факторів ризику виникнення анеуплоїдії ооцитів та ембріонів людини [2,3]. Так було встановлено, що між трисомією та віком жінки існує чітка залежність [4]. Часто вікове зниження фертильності пов'язують з погіршенням “якості” ооцитів [5]. Проте остаточно залежність між віком жінки та морфологічним та цитогенетичним статусом ооцитів доведена не була.

Метою даної роботи було дослідження впливу віку жінок, які проходять курс лікування безпліддя методом запліднення *in vitro*, на кількісні та морфофункціональні характеристики отриманих у них ооцитів та ранніх ембріонів.

### **Матеріал та методи.**

Об'єктом дослідження були ооцити та ранні ембріони, отримані від 121 жінки, що проходили курс лікування безпліддя методом запліднення поза організмом в “Інституті генетики репродукції”, м. Київ. За віком жінки були поділені на 2 групи: 1-а група – пацієнтки віком до 30 років включно, 43 особи, та 2-а група – жінки віком більш, ніж 30 років, 78 осіб. Ооцити отримували шляхом трансвагінальної пункції та аспірації фолікулів під контролем ультрасонографії після гормональної стимуляції суперовуляції.

При отриманні ооцитів враховували кількість їх від кожної жінки, після чого ооцити піддавали прижиттєвій морфологічній оцінці. За морфологічними ознаками клітин кумулюсу, що оточують ооцит, та самого ооцита їх сукупність ділили на дозрілі, недозрілі та ооцити з ознаками атрезії. В подальшому для запліднення *in vitro* недозрілі та ооцити з ознаками атрезії не використовувались.

Через 17-20 годин після інсемінації *in vitro* проводили візуальний контроль запліднення. Ооцити, в яких виявлялись два пронуклеуси, вважали нормально заплідненими. В аномально запліднених ооцитах візуалізували 1, 3 або більше пронуклеусів. Ооцити, в яких пронуклеуси були відсутні, вважали такими, що не запліднились. Разом з аномально заплідненими ооцитами їх виключали з подальшого культивування.

При подальшому культивуванні нормально запліднених ооцитів, через 48-72 години після інсемінації, проводили морфологічну оцінку ранніх ембріонів, що дробились. При цьому враховували наступні ознаки: відповідність дроблення стадії розвитку, ступінь фрагментації, вакуолізації бластомерів, а також рівномірність дроблення. Ембріони оцінювали за чотирибальною системою, причому оцінці 1 відповідали ембріони найвищої якості за вказаними морфологічними ознаками, а оцінці 4, відповідно, найнижчої.

### **Результати та обговорення**

Результати отримання та морфологічної оцінки ооцитів у двох груп жінок представлені в таблиці 1. Як видно з таблиці, середній вік жінок молодшої групи склав 27,1±1,8 років, в другій групі цей показник дорівнював 34,9±1,5. При цьому наймолодшій жінці 1-ї групи було 22 роки, а найстаршій жінці 2-ї групи – 42 роки. Кількість отриманих ооцитів у розрахунку на одну жінку достовірно не відрізнялась (15,4±1,3 та 13,1±0,8 відповідно в 1-й та 2-й групах). Відсотки дозрілих, незрілих та ооцитів з ознаками атрезії були практично однаковими в досліджуваних групах жінок. Таким чином, за вказаними вище характеристиками ооцитів розбіжностей між двома віковими групами жінок не було виявлено.

Таблиця 1.

Характеристики ооцитів, отриманих у жінок двох вікових груп

Група жінок	Кількість жінок в групі	Середній вік жінок	Загальна кількість отриманих ооцитів	Кількість ооцитів на 1 жінку	Дозрілі ооцити (%)	Недозрілі ооцити (%)	Ооцити з ознаками атрезії (%)
1 (<30 р.)	43	27,1±1,8	662	15,4±1,3	77,9±0,7	15,8±1,4	6,2±1,5
2 (>30 р.)	78	34,9±1,5	1020	13,1±0,8	78,2±0,4	15,3±0,9	6,3±0,9

◇±\*\*

Результати запліднення ооцитів та морфологічної оцінки ранніх ембріонів двох вікових груп жінок представлені в таблиці 2.

Таблиця 2.

Характеристики запліднення ооцитів та морфологічна оцінка ембріонів жінок двох вікових груп

Група жінок	Нормальне запліднення (%)	Аномальне запліднення (%)	Незапліднені ооцити (%)	Оцінка морфології ембріонів (%)	
				1 бал	4 бали
1 (<30 р.)	71,3±0,8	3,9±1,5	2,5±1,5	46,8±2,1	11,9±2,7
2 (>30 р.)	69,1±0,5*	5,3±0,9	4,2±0,9	44,8±1,2	18,0±1,5*

Примітка:

\* - p<0,05

Як видно з таблиці, рівень нормального запліднення ооцитів у 1-й (молодшій) групі жінок був достовірно вищим, ніж в 2-й групі (71,3±0,8 та 69,1±0,5 % відповідно, - p<0,05). Аномально запліднених (3,9±1,5 та 5,3±0,9% відповідно) та ооцитів, що лишились незаплідненими (2,5±1,5 та 4,2±0,9% відповідно) було дещо більше у 2-й групі жінок, проте різниця не є достовірною.

Ооцити, а потім зиготи та доімплантаційні ембріони людини мають певні морфологічні маркери, що свідчать про морфофункціональну повноцінність та здатність до подальшого розвитку. Виключно важливою є морфологічна оцінка ембріонів, яку зазвичай здійснюють на 2-й або 3-й день ембріонального розвитку (після запліднення *in vitro*). При цьому враховуються кількість, розмір та симетричність бластомерів, ступінь їх фрагментації та стан цитоплазми [6]. Використання цих

маркерів дозволяє ембріологам відбирати для переносу в матку жінки ембріони, що найбільш здатні до імплантації, таким чином зменшуючи кількість перенесених ембріонів та підвищуючи вірогідність настання вагітності.

Відсоток доімплантаційних ембріонів з найвищою оцінкою за морфологічними ознаками (1бал) у двох групах жінок достовірно не відрізнявся ( $46,8 \pm 2,1$  та  $44,8 \pm 1,2\%$  відповідно у 1-й та 2-й групах). І лише частка ембріонів, що мали найнижчу оцінку за морфологічними маркерами (4 бали) була достовірно більшою в групі жінок старшого віку ( $11,9 \pm 2,7$  та  $18,0 \pm 1,5\%$  відповідно в 1-й та 2-й групах,  $p < 0,05$ ) (таб.2).

#### **Висновки**

На рівні гамет, отриманих в програмах запліднення *in vitro*, їх кількісних та морфологічних характеристик, впливу віку нами не було виявлено.

Вплив віку жінки показано при заплідненні оцитів, рівень якого був нижчий в старшій групі жінок, а також в процесі дроблення доімплантаційних ембріонів. В старшій групі жінок відсоток ембріонів з низькою морфологічною оцінкою був достовірно більшим.

#### **Література**

1. *Steinkampf M.P.* Effect of aging on ovulation induction // *Semin. Reprod. Endocrinol.* – 1991. – V.9, №2. – P.266-271.
2. *Bowman M.C., Saunders D.M.* Rates of aneuploidy in oocytes of older women: are equivocal findings of concern for menopausal embryo recipients? // *Hum. Reprod.* – 1994. – V.9, N7. – P.1200-1201.
3. *Angell R.R.* Higher rates of aneuploidy in oocytes from older women // *Hum. Reprod.* – V.9, N7. – P.1199 -1200.
4. *Hook E.B.* Down syndrome rates and relaxed selection hypothesis // *Am. J. Hum. Genet.* – 1983. – V.35, N7. – P.1307-1313.
5. *Navot D., Bergh P.A. et.al.* Poor oocyte quality rather than imolantation failure as a cause of age-related decline in female fertility // *Lancet.* – 1991. – V.337, Nii.- P.1375-1377.
6. *Balaban B., Urman B.* Embryo culture as a diagnostic tool // *Reprod. BioMed. Online.* – 2003.-V.7, N6. – P.671-682.

#### **Резюме**

Проведен сравнительный анализ количественных и морфологических характеристик ооцитов и ранних эмбрионов женщин двух групп – до 30 и более 30 лет – в программах оплодотворения *in vitro*. Наблюдала снижение уровня оплодотворения в старшей возрастной группе женщин, а также повышение у них уровня эмбрионов с низкой оценкой морфологии.

Проведено порівняльний аналіз кількісних та морфологічних характеристик ооцитів та ранніх ембріонів жінок двох груп – до 30 та більш ніж 30 років – в програмах запліднення *in vitro*. Спостерігали зниження рівня запліднення в старшій віковій групі жінок, а також підвищення у них рівня ембріонів з низькою оцінкою морфології.

Comparison of morphological characteristics of oocytes and early embryos from 121 women divided into 2 groups (less than 30 years and over 30 years) was carried out in *in vitro* fertilization programs. For group of patients over 30 years old decrease of number of normally fertilized oocytes was shown. We also observed an increase of number of early embryos with low assesment of morphology (Grade 4) in older age group.