

Н.О.Будерацька^{1,2}
М.П.Петрушко^{1,3}

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

² Інститут генетики репродукції, Київ

³ ДРТ-клініка репродуктивної медицини, Харків

Ключові слова: ооцит кріоконсервація, вітрифікація, морфологія, частота настання вагітності, виживання.

Надійшла: 03.10.2016

Прийнята: 18.11.2016

УДК 612.613.1

ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ МОРФОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ЯК КРИТЕРІЙ ПРОГНОЗУ ЕФЕКТИВНОСТІ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ООЦИТІВ ЛЮДИНИ

Реферат. Кріоконсервування ооцитів набуває все більшої актуальності в програмах допоміжних репродуктивних технологій, оскільки дозволяє уникнути етичних і правових проблем, пов'язаних з кріоконсервування ембріонів. В роботі проведено вивчення морфологічних параметрів ооцитів та їх вплив на ефективність кріоконсервування. В роботі показано, що при виявленій широкій варіабельності морфології ооцитів, оцінка та відбір найбільш перспективного клітинного матеріалу перед заморожуванням може проводитися з використанням якісних морфологічних критеріїв, оскільки виявлений взаємозв'язок між цими критеріями і успішністю кріоконсервування. Якісними параметрами вибору кріорезистентних ооцитів є: стан першого полярного тіла, *Zona pellucida* та цитоплазми. Запропоновані критерії оцінки морфофункціонального стану ооцитів перед кріоконсервуванням сприяють підвищенню результативності лікування безпліддя методом екстракорпорального запліднення.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 4. – С. 18-22.

© Н.О.Будерацька, М.П.Петрушко, 2016

✉ petrushkom@mail.ru

Buderatskaya N.A., Petrushko M.P. Variability of morphological parameters as a criterion to forecast efficiency of cryopreserved human oocytes.

ABSTRACT. Background. Cryopreservation of oocytes becomes increasingly important in the programs of assisted reproductive technologies, as it avoids the ethical and legal problems associated with the cryopreservation of embryos. **Objective.** The purpose of the work was to study the morphological parameters of the oocytes and their impact on the effectiveness of cryopreservation. **Methods.** This is a retrospective data analysis of IVF cycles using vitrified oocytes. The 724 mature oocytes with dysmorphism and normal morphology were vitrified using CryoTec by vitrification method. A total of 724 mature oocytes were vitrified. P-level critical value was 0,05. **Results** It was shown that evaluation and selection of the most promising cell material prior to freezing can be carried out using the qualitative morphological criteria, as there has been revealed the relationship between these criteria and the success of cryopreservation. Qualitative parameters to select the cryoresistant oocytes are as follows: state of the first polar body, *Zona pellucida* and cytoplasm. The results showed that classification based on oocytes morphology revealed a significant correlation with survival after cryopreservation, fertilization rate and *in vitro* development of embryos to blastocyst stage. **Conclusion.** The proposed criteria for assessing the morphofunctional state of oocytes prior to cryopreservation contribute to the effectiveness of the treatment of infertility by means of *in vitro* fertilization.

Key words: oocyte cryopreservation, vitrification, morphology, pregnancy rate, survival rate.

Citation:

Buderatskaya NA, Petrushko MP. [Variability of morphological parameters as a criterion to forecast efficiency of cryopreserved human oocytes]. *Morphologia*. 2016;10(4):18-22. Ukrainian.

Вступ

Кріоконсервування ооцитів набуває все більшої актуальності в програмах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), оскільки дозволяє уникнути етичних і правових проблем, пов'язаних з кріоконсервуванням ембріонів. Збереження ооцитів є необхідним для жінок, що піддаються ризику передчасної втрати функції яєчників, внаслідок доброякісних або злоякісних новоутворень. Досить великий перелік онкологічних захворювань, які успішно виліковуються за

допомогою променевої терапії та хіміотерапії: хронічний мієлолейкоз, хвороба Ходжкіна, мієлофіброз, саркома Едвіна. У той же час, проведене лікування згубно впливає на фолікулярний апарат яєчників, викликаючи їх передчасне виснаження і аменорею [1]. У ряді випадків існує можливість провести стимуляцію яєчників і отримати здорові яйцеклітини до початку лікування. Кріоконсервування ооцитів дозволяє зберегти репродуктивну функцію, що особливо важливо для незаміжніх жінок і підлітків [2]. Ау-

тодонорство заморожених ооцитів дозволяє вирішити проблему їх «старіння» та підвищення ризику хромосомних аномалій ембріонів у жінок, які планують материнство в пізньому репродуктивному віці. Кріоконсервування, також, дає можливість зберегти зайві ооцити, отримані при пункції надмірної кількості фолікулів, в країнах, де існує мораторій на заморожування ембріонів (Італія, Німеччина, країни Середнього та Близького Сходу) [3].

Донорство ооцитів широко використовується при лікуванні безпліддя у жінок з передчасним виснаженням яєчників, у пацієнок, які перенесли двосторонню оофоректомію, рідше - у жінок старшого віку, які перебувають в менопаузі. Використання методики заморожування ооцитів дозволяє істотно полегшити виконання даної програми, оскільки зникає необхідність синхронізації циклів донора і реципієнта. Більш того, удосконалення програм кріоконсервування, в останні роки, призвело до створення банків ооцитів, які в даний час успішно функціонують.

Одним з перспективних напрямків кріоконсервування є створення банку цитоплазми ооцитів для перенесення ядер з метою терапевтичного клонування.

У літературі представлені результати виживання ооцитів, особливості їх запліднення і дроблення, без урахування морфофункціональних характеристик до кріоконсервування [4,5].

Мета

Мета дослідження – вивчення варіабельності морфологічних параметрів ооцитів та критерії оцінки функціонального стану клітинного матеріалу для їх кріоконсервування.

Матеріали та методи

Усі маніпуляції з гаметами та ембріонами проводили відповідно до Європейського протоколу з захисту ембріонів [6] та рішення Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України.

Гамети та доімплантаційні ембріони людини отримувалася в циклах лікування безпліддя з використанням ДРТ.

Вітрифікацію ооцитів проводили при кімнатній температурі (+ 24°C). Заморожування і подальше зберігання ооцитів здійснювали на носіях CryoTec (Cryotech, Japan). Ооцити еквілібрували

в кріопротекторній суміші 7,5% ДМСО та 7,5% етиленгліколю протягом 10-14 хв (в залежності від швидкості відновлювання первинного об'єму ооцита). Після завершення еквілібрації ооцити переносили в 15% р-ну ДМСО, 15% р-ну етиленгліколю та 0,5 М сахарози. Після 1 хв експозиції ооцити розміщували на носій і занурювали в рідкий азот.

Зберігання заморожених ооцитів здійснювали в судинах Дьюара в рідкому азоті (-196° С) до моменту розморожування.

Розморожування ооцитів починали в 1,0 М розчині сахарози при температурі + 37 ° С. Через 1 хв ембріони переносили в 0,5 М р-н сахарози на 3 хв при температурі + 24 ° С. Після чого ооцити переносили в 20% сироватку («SSS», Life Global, USA) на 5 хв. Запліднення та культивування ембріонів до стадії бластоцисти здійснювали в середовищі «Global total» («Life Global», USA).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за методом Стьюдента з використанням програми «Excel» («MS», США). Результати приведені у вигляді середнього значення ± стандартне відхилення. Дані вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Всі ооцити були розділені на 5 груп залежно від характеристик основних клітинних структур.

Група 1 – контроль – стан основних морфологічних структур відповідають нормі (n=326); 2 – ооцити з фрагментацією, дегенерацією, або збільшенням/зменшенням першого полярного тіла (n=126); 3 – з потовщенням/потоншенням, викривленням *Zona pellucida* (n=85); 4 – ооцити з поліморфізмом цитоплазми (вакуолізація, грануляція, наявність ліпофусцинових тілець, агрегація ендоплазматичного ретикулулу (ЕПР) (n=121); 5 – множинні морфологічні зміни. (n=66).

Результати та їх обговорення

Виживання ооцитів різних морфологічних варіантів після кріоконсервування методом вітрифікації представлені в таблиці 1.

Виживання ооцитів, що відносяться до групи 1 (рис. 1) склало $98,8 \pm 8,1\%$. Запліднення було відзначено в $92,4 \pm 8,5\%$ клітин. До стадії бластоцисти розвинулося $67,8 \pm 2,7\%$ ембріонів.

Таблиця 1
Частота виживання, запліднення та бластуляції ооцитів людини різних морфологічних варіантів

Параметри	Групи дослідження (M±m)				
	1	2	3	4	5
Частота виживання, %	98,8±8,1	80,3±10,3	40,2±3,3*	36,2±8,1*	20,2±1,9*
Частота запліднення, %	92,4±8,5	90,3±8,6	73,3±7,8*	54,7±3,2*	50,5±5,1*
Кількість ембріонів на стадії бластоциста, %	67,8±2,7	54,6±5,2	49,3±8,5	33,3±3,3*	12,4±1,2*

Примітка: * - відмінність значуща у порівнянні з контролем, $p < 0,01$.



Рис. 1. Ооцит, що відповідає варіанту норми за морфологічними критеріями. Нативний препарат. DIC контраст. $\times 600$.

Вживання ооцитів, які були віднесені до другої групи склало $80,3 \pm 10,3\%$. Дисторфізм першого полярного тіла не вплинув на запліднення та подальший розвиток ембріонів до стадії бластоцисти, оскільки частота їх запліднення і темпи дроблення *in vitro* відповідали варіантам норми (рис. 2).



Рис. 2. Фрагментація, вакуолізація першого полярного тіла. Нативний препарат. DIC контраст. $\times 400$.

Наші спостереження підтверджують роботи Ebner T. та співавт, які вивчали вплив дисторфізма першого полярного тіла на запліднення, дроблення та імплантацію ембріонів [7]. Ten J. (2007) з співавт оцінювали запліднення і подальший розвиток двох груп ооцитів: з фрагментованим та морфологічно нормальним першим полярним тільцем. Авторами був виявлений статистично значущий зв'язок між морфологічними параметрами першого полярного тільця та якістю отриманих ембріонів, при цьому частота настання вагітності при перенесенні ембріонів, які

розвинулися з ооцитів першої групи була значно вище, ніж при перенесенні ембріонів, отриманих з ооцитів другої групи [8].

Таким чином, було показано, що морфологічні параметри першого полярного тільця можуть служити критерієм для відбору найбільш якісного матеріалу в програмах допоміжних репродуктивних технологій.

Нами було відзначено, що аномалії *Zona pellucida* по різному впливають на виживання ооцитів (рис. 3). Так, клітини з товстою зоною частіше дегенерували після заморожування-відігрівання, що виражалося в її руйнуванні. Ооцити з тоншою *Zona pellucida* характеризувалися високою частотою виживання і мали більше шансів на запліднення.



Рис.3. Дефект *Zona pellucida*. Нативний препарат. DIC контраст. $\times 400$.

У середньому, частота дроблення ембріонів, отриманих з ооцитів з патологією *Zona pellucida* була достовірно нижче контролю.

З нашими результатами узгоджуються роботи Choi J. (2015) з спів, в яких знайдено ефект впливу товщини *Zona pellucida* на виживання ооцитів після вітрифікації. [9].

Вживання ооцитів четвертої групи дослідження (рис. 4), які характеризувалися наявністю вакуолей або цитоплазматичних включень складала $36,2 \pm 8,1\%$. Результати проведеного нами дослідження дозволяють зробити висновок про вплив даної патології на кріорезистентність ооцитів. Очевидно наявність зайвої води в вакуолях може мати негативний вплив на процеси дегідратації.

Немає єдиної думки про вплив центральної грануляції на подальший розвиток ембріонів *in vitro*. Одні вчені вважають, що даний поліморфізм яйцеклітини не впливає на якість запліднення, ембріонів і частоту імплантації. Інші дослідники прийшли до іншого висновку: якість ембріонів було скомпрометовано після заплід-

нення яйцеклітин з наявністю центральної гранулярної області в цитоплазмі.



Рис. 4. Ооцит з вакуолею та ліпофусциновими тільцями в цитоплазмі. Нативний препарат. DIC контраст. $\times 600$.

Так, Kahraman S. (2000) з співавт довели, що у ооцитів з наявністю центральної гранулярної області в цитоплазмі частота анеуплоїдії досить висока - 52,2% [10].

Ооцити з множинною патологією мали найменший показник виживання після кріоконсервування (рис. 5). Частота запліднення та дроблення *in vitro* були достовірно нижчими, ніж у всіх групах дослідження.

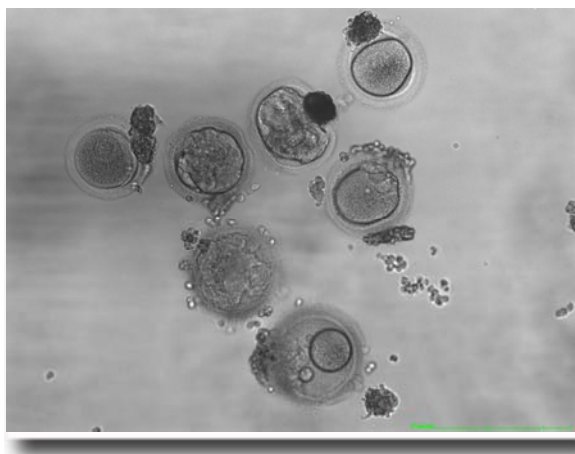


Рис. 5. Ооцити з множинною патологією. Нативний препарат. DIC контраст. $\times 200$.

Ідентичні результати продемонстровані в роботах Yu E. (2015) з співавт, в яких на великій вибірці показано, що ооцити з дисморфізмом мають нижчий процент запліднення, ніж ооцити

без патології [11].

Alikani M. (2005) і співавт, використовуючи очищення ооцитів в день їх аспірації, з подальшим введенням одиничного сперматозоїда в яйцеклітину (ICSI), провели дослідження за оцінкою потенціалу ембріонів, отриманих з яйцеклітин з множинною патологією. Було виявлено, що ембріони, що розвинулися з таких яйцеклітин мають знижений потенціал дроблення та імплантації [12].

Протиріччям цього висновку є роботи Seet V. (2013). Приділяючи основну увагу аномаліям форми ооцитів, дефектів будови прозорої оболонки, наявності в цитоплазмі гранул та вакуолей, агрегаціям гладкого ЕПР, автори прийшли до досить парадоксального висновку, що жодна з аномалій не впливає на частоту запліднення за допомогою ICSI, проте, немає даних про вплив перерахованих параметрів на виживання після кріоконсервування та подальший розвиток ооцитів *in vitro* [13].

Оцінка морфології ооцитів є складним завданням, так як основні механізми, які змінюють їх зовнішній вигляд є багатофакторними і складними. Морфологічні зміни в ооцитах можуть бути результатом внутрішніх факторів, таких, як вік та генетичний стан, або зовнішніх факторів, таких, як протоколи стимуляції та умови культивування [14].

Підсумок

Ооцити людини, отримані в циклах лікування безпліддя, володіють широкою варіабельністю будови першого полярного тіла, *Zona pellucida* та цитоплазми.

Оцінка і відбір клітинного матеріалу за морфологічними параметрами перед заморожуванням може забезпечити успішність їх кріоконсервування.

Вакуолізація цитоплазми негативно впливає на виживання ооцитів після вітрифікації, їх подальше запліднення та розвиток *in vitro*.

Поліморфізм першого полярного тіла та *Zona pellucida* не знижує життєздатність ооцитів після кріоконсервування та не зменшує частоту утворення зигот та ембріонів на стадії бластоцисти.

Перспективи подальших розробок

Перспектива подальшої роботи полягає в запровадженні ефективних методів кріоконсервування та середовищ реабілітації ооцитів після кріоконсервування з урахуванням особливостей їх будови. Науковий та практичний інтерес представляє вивчення хромосомного статусу ембріонів, отриманих з кріоконсервованих ооцитів та його кореляції з морфофункціональними характеристиками ооцитів та ембріонів.

Літературні джерела References

1. Derlatka P, Grabowska-Derlatka L, Jalinik K, Danska-Bidzińska A. [Recurrent ovarian cancer - qualification and results of surgical treatment]. *Ginekol Pol.* 2015 Dec;86(12):902-6. Polish.
2. Tomasi-Cont N, Lambertini M, Hulsbosch S, Peccatori AF, Amant F. Strategies for fertility preservation in young early breast cancer patients. *Breast.* 2014 Oct;23(5):503-10. doi: 10.1016/j.breast.2014.05.024.
3. Beca JP, Lecaros A, Gonzalez P, Sanhueza P, Mandakovic B. [Medical, ethical and legal issues in cryopreservation of human embryos]. *Rev Med Chil.* 2014 Jul;142(7):903-8. doi: 10.4067/S0034-98872014000700011. Spanish
4. Montjean D, Geoffroy-Siraudin C, Gervoise-Boyer M, Tourame P, Boyer P. Morphokinetics analysis of embryos derived from vitrified / warmed oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 2015 Nov;32(11):1615-21. doi: 10.1007/s10815-015-0569-0.
5. Goltsev AN, editor. [Current problems of cryobiology and cryomedicine]. Kharkiv; 2012. Chapter 2.2, Grishchenko VI, Kopeika EF, Petrushko MP Chub NN, Pinyayev VI, Kramar MI, authors; [Cryopreservation of embryos, reproductive cells and tissues of humans and animals]; p. 337-61. Russian.
6. Protocol on Embryo Protection A Working Party of the 24th Meeting of the Steering Committee on Bioethics of the Council of Europe. Strasbourg. 2003; 44 p.
7. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000 Feb;15(2):427-30.
8. Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reprod Biomed Online.* 2007 Jan;14(1):40-8.
9. Choi JK, Yue T, Huang H, Zhao G, Zhang M, He X. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. *Cryobiology.* 2015 Oct;71(2):350-5. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.08.012.
10. Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalioglu N. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000 Nov;15(11):2390-3.
11. Yu EJ, Ahn H, Lee JM, Jee BC, Kim SH. Fertilization and embryo quality of mature oocytes with specific morphological abnormalities. *Clin Exp Reprod Med.* 2015 Dec;42(4):156-162. doi: 10.5653/cerm.2015.42.4.156.
12. Alikani M, Schimmel T, Willadsen SM. Cytoplasmic fragmentation in activated eggs occurs in the cytokinetic phase of the cell cycle, in lieu of normal cytokinesis, and in response to cytoskeletal disorder. *Mol Hum Reprod.* 2005;11(5):335-344.
13. Seet VY, Al-Samerria S, Wong J, Stanger J, Yovich JL, Almahbobi G. Optimising vitrification of human oocytes using multiple cryoprotectants and morphological and functional assessment. *Reprod Fertil Dev.* 2013;25(6):918-26. doi: 10.1071/RD12136.
14. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online.* 2006 May;12(5):608-15.

Будерацкая Н.А., Петрушко М.П. Вариабельность морфологических параметров как критерий прогноза эффективности криоконсервирования ооцитов человека.

Реферат. Криоконсервирование ооцитов приобретает все большую актуальность в программах вспомогательных репродуктивных технологий, поскольку позволяет избежать этических и правовых проблем, связанных с криоконсервированием эмбрионов. В работе проведено изучение морфологических параметров ооцитов и их влияние на эффективность криоконсервирования. В работе показано, что при выявленной широкой вариабельности морфологии ооцитов, оценка и отбор наиболее перспективного клеточного материала перед замораживанием может проводиться с использованием качественных морфологических критериев, поскольку обнаружена взаимосвязь между этими критериями и успешностью криоконсервирования. Качественными параметрами выбора криорезистентных ооцитов являются: состояние первого полярного тела, *Zona pellucida* и цитоплазмы. Предложенные критерии оценки морфофункционального состояния ооцитов перед криоконсервированием способствуют повышению результативности лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения.

Ключевые слова: ооцит криоконсервация, витрификация, морфология, частота наступления беременности, выживание.