

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

ПЕТРУШКО МАРИНА ПАВЛІВНА

УДК: 612.646:615.014.41:57.017

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ, ЦИТОЛОГІЧНІ І МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ  
ХАРАКТЕРИСТИКИ НАТИВНИХ І КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ**

03.00.19 - кріобіологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Харків-2006

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

### **Науковий**

**консультант:** академік НАН України,  
доктор медичних наук, професор  
**Грищенко Валентин Іванович,**  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,  
директор ІПКіК НАН України, м.Харків

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук професор, **Лівшиць Людмила Аврамівна,** Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, завідувач відділу геноміки людини, м.Київ

доктор біологічних наук, професор, академік УААН  
**Осташко Федір Іванович,**  
Інститут тваринництва УААН, провідний науковий співробітник відділу біотехнології репродукції сільськогосподарських тварин, м.Харків

доктор біологічних наук, професор **Гордієнко Євген Олександрович,** Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, завідувач відділу низькотемпературного консервування, м.Харків

**Провідна установа:** Національний медичний університет  
ім. О.О.Богомольця МОЗ України, Науково-дослідний лабораторний центр, м.Київ

Захист відбудеться «17» листопада 2006 року о 13. 30 годині на засіданні спеціалізованої Вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 61015, Харків-15, вул.Переяславська, 23

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, за адресою: 61015, Харків-15, вул.Переяславська, 23

Автореферат розісланий «15» вересня 2006 р.

Учений секретар  
спеціалізованої Вченої ради,  
доктор медичних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України

Гольцев А.М.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** В Україні за останнє десятиріччя спостерігається стійка тенденція до депопуляції, основною причиною якої є зниження народжуваності. Крім того, безплідні шлюби складають 10-35% від загальної кількості пар репродуктивного віку. Тому для покращення демографічної ситуації важливо вирішення проблеми безплідного шлюбу (Грищенко В.І., 2003).

За визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я лікування безплідності методами допоміжних репродуктивних технологій успішне, якщо в результаті отримана одноплідна вагітність без патологій розвитку (ESHRE Capri Workshop, 2000). Багатоплідна вагітність розглядається як ускладнення, оскільки зростає ризик передчасних пологів, народження дітей з низькою вагою та виникнення інших медичних, соціальних і економічних проблем (Калініна О.О., 2004).

У зв'язку з цим виникає питання вибору ембріонів для трансплантації в порожнину матки пацієнтки, що, у свою чергу, передбачає визначення чітких морфологічних критеріїв, які відображають високий імплантаційний потенціал і генетичну повноцінність ембріонів. Не менш актуальними вважаються питання кріоконсервування ембріонів, які залишилися невикористаними після ембріоперенесення та їх селекції після заморожування-відігрівання (Gerris J., 2002). Запропонована альтернатива – культивування та трансфер бластоцисти - не є оптимальною, оскільки цієї стадії в умовах *in vitro* досягає не більш 50% ембріонів (Henman M., 2005). Відзначається, що для настання вагітності переніс у порожнину матки пацієнтки 4-клітинних ембріонів найбільш сприятливий (Jaroudi K., 2004).

Науково-технічний прогрес у біології та медицині, у першу чергу розвиток репродуктивних технологій та методів генетичної діагностики, дозволяє на практиці здійснити профілактику уроджених аномалій розвитку і спадкоємної патології (Барияк І.Р., 2003; Гречаніна О.Я., 2003; Запорожан В.М., 2003; Лівшиць Л.А., 2003). Незважаючи на широке використання методів кріоконсервування репродуктивних клітин і ембріонів людини, ще не отримано переконливих доказів щодо негативного впливу таких процедур на генетичний апарат. Виникнення різного роду ушкоджень може бути перешкодою для широкого використання кріоконсервованих ембріонів у методах допоміжних репродуктивних технологій.

Наведені факти підтверджують актуальність і необхідність дослідження впливу факторів кріоконсервування на морфофункціональні, цитологічні та молекулярно-генетичні характеристики преімплантаційних ембріонів людини з метою перенесення в порожнину матки пацієнток тільки генетично повноцінних ембріонів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалася з 2000 по 2005 р. у рамках наукових тем Інституту проблем кріобіології і

кріомедицини НАН України відповідно до напрямку роботи відділу кріобіології систем репродукції (№ 2.2.6.66 "Вивчення механізму підвищення фертильності гамет і стійкості фетальних клітин людини і тварин при дії низьких температур у сполученні з іншими фізичними і хімічними факторами", № державної реєстрації 0100U000408 і № 2.2.6.96 "Вивчення особливостей дії низьких температур і гіпотермії на гамети, ембріони, ембріональні клітини в залежності від етапу гамето- і ембріогенезу, розробка середовищ збереження, кріоконсервування і репарації нелетальних кріоушкоджень цих біооб'єктів", № державної реєстрації 0101U003480). Автор був відповідальним виконавцем вказаних тем.

**Мета і задачі дослідження.** На підставі детального аналізу морфофункціональних, цитологічних і молекулярно-генетичних характеристик визначити вплив факторів кріоконсервування на генетичний апарат преімплантаційних ембріонів людини; розробити науково обґрунтовані принципи комплексної оцінки ембріонів за морфологічними характеристиками, здатністю до поновлення мітозу, швидкістю морфогенетичних процесів і результатами преімплантаційної генетичної діагностики для їх використання у допоміжних репродуктивних технологіях при лікуванні безпліддя.

Для досягнення даної мети необхідно вирішити наступні **задачі**.

1. Розробити принципи оцінки стану ембріонів до і після кріоконсервування та використати їх як біомаркери кріостійкості;
2. Визначити ефективність кріоконсервування ембріонів людини, що знаходяться на різних стадіях преімплантаційного розвитку;
3. Провести порівняльний аналіз життєздатності кріоконсервованих зигот, що знаходяться у різних фазах клітинного циклу;
4. Порівняти швидкість морфогенетичного розвитку нативних і кріоконсервованих преімплантаційних ембріонів людини;
5. З'ясувати стан мітозів в бластомерах ембріонів людини до і після впливу факторів кріоконсервування;
6. Провести цито- та молекулярно-генетичний аналіз нативних і кріоконсервованих ембріонів людини з метою виявлення впливу факторів кріоконсервування на їх генетичний апарат;
7. Провести цитогенетичний аналіз ооцитів та спермій для визначення внеску батьківського і материнського геномів у загальну частоту хромосомної нестабільності ембріонів;
8. Підвищити життєздатність преімплантаційних ембріонів людини за допомогою систем сокультивування з преовуляторною сироваткою крові пацієнтки, фолікулярною рідиною преовуляторних фолікулів, клітинами кумулюсу і гранульози.

**Об'єкт дослідження.** Процеси ушкодження генетичного апарату преімплантаційних ембріонів людини після кріоконсервування та взаємозв'язок цих процесів з морфологічною і функціональною цілістю ембріонів людини, що культивувалися *in vitro*.

**Предмет дослідження.** Морфофункціональні, цитологічні і молекулярно-генетичні характеристики ембріонів людини, що знаходилися на різних стадіях преімплантаційного розвитку.

**Методи дослідження.** Для одержання преімплантаційних ембріонів людини застосовували екстракорпоральне запліднення ооцитів, отриманих у пацієток, що проходили лікування безплідності методами допоміжних репродуктивних технологій. У роботі використовували морфологічний метод оцінки ембріонів при прижиттєвій світловій мікроскопії. Стан хроматину оцінювали за методом фарбування клітин флюоресцентними барвниками. Стан генетичного апарату визначали за допомогою цитогенетичного методу шляхом каріотипування і флюоресцентної гібридизації *in situ*. Для кріоконсервування ембріонів використовували режими повільного охолодження. Здатність до поновлення мітозу і темпи дроблення вивчали в умовах тривалого культивування ембріонів людини *in vitro*. Для реабілітації кріоконсервованих ембріонів після відігрівання використовували методи сокультивування на монослої клітин кумулюсу і гранульози, а також біологічно активні рідини.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за методом Стюдента. За критерій вірогідності розходження приймали рівень 95 % ( $p < 0,05$ ).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Уперше досліджено морфофункціональні характеристики ембріонів людини, що знаходились на різних стадіях морфогенезу, визначено оптимальний термін розвитку і морфологічні параметри ембріонів для кріоконсервування. Уперше вивчена швидкість морфогенетического розвитку ембріонів людини після кріоконсервування. При цьому виявлено, що оцінка життєздатності, яка заснована тільки на морфологічних параметрах і темпах дроблення *in vitro* недостатня, оскільки вона не враховує вплив факторів кріоконсервування на генетичний апарат ембріонів. Тому важливим є вивчення генетичної повноцінності кріоконсервованих ембріонів із залученням цитогенетичних і молекулярно-генетичних досліджень. Уперше показано, що фактори кріоконсервування знижують мітотичний індекс наступного поділу ембріонів після кріоконсервування, збільшують кількість патологічних станів мітозів і індують виникнення пікнотичних ядер. У преімплантаційних ембріонах людини після кріоконсервування зростає частота анеуплоїдії хромосом групи G, збільшується частота мозаїцизму і поліплоїдії. Переконливо продемонстровано, що грубі хромосомні аберації в нативних і деконсервованих ембріонах виявляються у виді порушення каріо- і цитокінезу: утворення полімультинуклеарних бластомерів, фрагментів бластомерів, що містять нерівномірні маси хроматину. Доведена необхідність вивчення внеску батьківського і материнського геномів у

частоту хромосомної нестабільності преімплантаційних ембріонів. Уперше показана ефективність сокультивування з біологічно активними рідинами, клітинами кумулюсу і гранульози для підвищення життєздатності кріоконсервованих ембріонів людини.

**Практичне значення одержаних результатів.** Морфологічна та генетична оцінка кріоконсервованих ембріонів, встановлення швидкості морфогенетичного розвитку – гарантія перенесення повноцінних ембріонів у порожнину матки пацієнтки. Тому запропоновані методики можуть бути рекомендовані для лікувальних установ, що застосовують методи допоміжних репродуктивних технологій, а також у наукових інститутах, які досліджують преімплантаційний розвиток ембріонів.

Матеріали дисертаційного дослідження використовуються у навчальному процесі кафедри медичної біології, генетики і паразитології Харківського медичного університету, кафедри генетики Львівського Державного Університету ім. І. Франка, кафедри хімії і біохімії Харківської Державної зооветеринарної Академії, у Центрі репродукції людини «Імплант», м.Харків, клініках з лікування безпліддя “Надія” м.Київ, “Інтерсоно”, м.Львів.

**Особистий внесок здобувача.** Винесені на захист положення і результати отримані дисертантом особисто. Роботи, що відносяться до теми дисертаційної роботи, опубліковані у співавторстві з науковим консультантом теми академіком НАН України В.І.Грищенко та іншими співробітниками відділу кріобіології системи репродукції, відбивають результати загального планування і проведення експериментів, аналіз отриманих результатів і підготовки матеріалів до друку. Сформульовані основні положення і зроблені остаточні висновки дисертації. В опублікованих спільно зі співавторами працях особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [1, 7, 17, 32] у приготуванні препаратів та цитогенетичному аналізі ооцитів, обробці результатів та формулюванні висновків;
- у роботах [3, 4, 5, 9, 10, 13, 14, 27, 29, 33, 34, 35, 37, 39, 40, 41] у самостійному проведенні культивування нативних та кріоконсервованих ембріонів та їх морфофункціональному аналізі, участі при обговоренні результатів та винесенні остаточних висновків;
- у роботах [16, 21, 22, 25, 46, 51] у проведенні кріоконсервування ембріонів людини, аналізі результатів та формулюванні висновків;
- у роботах [2, 6, 11, 12, 28] у проведенні ембріологічного етапу програми екстракорпорального запліднення ооцитів і культивування ембріонів;
- у роботах [18, 26, 31, 38, 42, 43, 44, 52, 53] у виконанні цитогенетичних та молекулярно-генетичних досліджень, інтерпретації, статистичній обробці і узагальненні отриманих даних;

- у роботах [48, 50] у вивченні швидкості морфогенетичного розвитку ембріонів, статистичній обробці результатів досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Про результати досліджень було проінформовано на наукових форумах: 33-му (Іспанія, 1996 р.), 38-му (Шотландія, 2001 р.), 40-му (Португалія, 2003 р.), 41-му (Китай, 2004 р.) щорічних Міжнародних з'їздах товариства кріобіології; на симпозіумі з міжнародною участю "Безплідність. Допоміжні репродуктивні технології" (Київ, 1995, 1997, 1999, 2000 рр.), з'їзді українського Наукового товариства кріобіологів (Харків, 1995, 1998, 2001, 2003 рр.), Міжнародному симпозіумі "Біоетика на порозі третього тисячоріччя" (2000 р.); III Парнасівській конференції (Львів, 2000 р.); конференції молодих вчених "Медицина третього тисячоріччя" (Харків, 2001, 2002 рр.); конференції товариства молекулярної біології і генетики (Київ, 2001 р.); науково-практичній конференції Асоціації репродуктивної медицини України з міжнародною участю (Київ, 2002, 2003, 2006 рр.), V (Адлер, 1995 р.), VI (Санкт-Петербург, 1996 р.), VII (Сочі, 1997 р.), XI (Самара, 2002 р.), XII (Санкт-Петербург, 2003 р.), XIV (Саратов, 2004 р.) і XV (Чебоксари, 2005 р.); Міжнародних конференціях Російської асоціації репродукції людини "Репродуктивні технології сьогодні і завтра", а також на Міжнародній конференції "Збереження генетичних ресурсів" (Санкт-Петербург, 2004 р.).

**Публікації.** Основні положення дисертації викладено в 53-х наукових працях: в наукових фахових виданнях - 17, статтях закордонного друку - 4, статтях збірників наукових праць - 7 (з них 3 у збірниках, затверджених ВАК України), тезах доповідей на наукових форумах – 23 (21 з них - на міжнародних). Отримано 2 патенти України на винахід.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 350 сторінках друкованого тексту і складається з вступу, огляду літератури, розділу "Матеріали і методи дослідження", чотирьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення отриманих результатів, висновків, переліку використаних джерел літератури, що включає 568 першоджерел (62 сторінки) та додатків (6 сторінок). Дисертацію ілюстровано 31 таблицями та 42 рисунками, з яких 7 таблиць та 8 рисунків на окремих сторінках.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Загальна методика і основні методи дослідження.** Дослідження проведено на преімплантаційних ембріонах людини. Ембріони одержували після запліднення *in vitro* ооцитів пацієнток, що проходили лікування безплідності методом екстракорпорального запліднення. Після перенесення 4-х ембріонів у порожнину матки пацієнтки (Наказ МОЗ, № 24, 1999 р.) одержували

письмову, інформовану, вільну згоду подружньої пари на проведення подальших наукових експериментів на репродуктивних клітинах та ембріонах.

Ембріони оцінювали під інвертованим мікроскопом Olympus BX 100 (зб. х600) через кожні 24 год культивування протягом 5 діб. Використовували систему аналізу зображень Scion Image for Windows, 2000. Враховували кількість та діаметр бластомерів, щільність міжклітинного контакту, ступінь фрагментації, прозорість і гомогенність цитоплазми, наявність цитоплазматичних вакуолей і стан *zona pellucida*.

Кріоконсервування ембріонів проводили за повільною програмою з 1,2-пропандіолом (1,2-ПД). Відігрівання ембріонів проводили протягом 30 сек інкубації у водяній бані (37°C) (Lassale B, 1995).

Вживання ембріонів оцінювали за морфологічними критеріями, здатністю до поновлення мітозу та частотою дроблення до стадії бластоцисти.

Цитогенетичні препарати хромосом преімплантаційних ембріонів готували за методом Тарковського (Tarkowsky A., 1966), молекулярно-генетичний аналіз флюоресцентною гібридизацією *in situ* проводили за (Coonen E., 2002). Визначені зонди (Multi Vysion PB) використовували для хромосом 13, 21, 22 і центромерних ділянок хромосом 16 і 18. Препарати вивчали під мікроскопом Olympus BX 100 із флюоресцентною насадкою і системою аналізу зображень FISH Vysis PB. Цитологічний аналіз фіксованих ембріонів проводили за класифікацією патологій мітозу (Алов І., 1982).

Стан хроматину ядер бластомерів вивчали після фарбування флюоресцентним барвником Hoechst 33342 і морфологічної оцінки на інвертованому мікроскопі з флюоресцентною насадкою USIO USH 102D, використовуючи NU-фільтр в області спектру 334-465 нм (Fabian D., 2005).

Кількісне визначення вільних амінокислот у сироватці крові проводили за методом PICO-TAG на амінокислотному аналізаторі "Waters".

Сокультивування ембріонів людини проводили на клітинах кумулюсу і гранульози, а також з додаванням фолікулярної рідини і материнської преовуляторної сироватки крові в середовище культивування (Lindley E., 2001).

## Результати досліджень та їх обговорення

**Морфофункціональні характеристики нативних і кріоконсервованих ембріонів людини.** Метою першої серії експериментів було визначення життєздатності преімплантаційних ембріонів людини після еквілібрації з розчинами кріопротекторів. Слід зосередити увагу на такому феномені: на етапі переносу ембріонів із культурального середовища з температурою 37°C в розчини кріопротекторів з температурою 22°C відбуваються осмотичні ушкодження (стиск

бластомерів, зміна міжклітинної адгезії). Тому надалі ембріони охолоджували в середовищі культивування з 37 до 22°C із швидкістю 0,7°C/хв, потім переносили в розчини кріопротекторів. У даній серії експериментів обрали розчин 1,2-ПД у концентраціях 1, 1,5 і 2М, який готували на фосфатно-буферному середовищі. Ембріони, що експонували в стандартному культуральному середовищі при 0, 22 і 37°C протягом 5 і 10 хв без розчину кріопротектора, були обрані як контроль. Досліджувані ембріони поділяли на три групи. I групу складали 4-клітинні ембріони, етап насичення в яких проводили з розчином 1М, II – 1,5 М і III - 2 М 1,2-ПД.

Після 10-хвилинної експозиції ембріонів контрольної групи при фізіологічних умовах (37°C) їх виживання складало  $97,6 \pm 2,3\%$ , при температурі 22°C мало тенденцію до зниження ( $94,4 \pm 3,5\%$ ) і вірогідно ( $p < 0,01$ ) знижувалося при температурі 0°C ( $68 \pm 4,9\%$ ). Введення в середовище еквілібрації ембріонів розчинів кріопротекторів при 37°C призводило до достовірного зниження їх виживання ( $p < 0,01$ ). Десятихвилинна експозиція 4-клітинних ембріонів при 22°C не вплинула на їх виживання і складала для контролю, I, II і III груп відповідно  $94,4 \pm 3,5$ ;  $92,9 \pm 3,4$ ;  $95,9 \pm 2,7$  і  $94,3 \pm 3,7\%$  ( $p > 0,05$ ).

Встановлена залежність між виживанням і температурою експозиції ембріонів людини. Зменшення часу експозиції до 5 хв істотно не вплинуло на життєздатність ранніх ембріонів. Однак, враховуючи той факт, що зменшення часу експозиції ембріонів у розчині кріопротектора з метою зниження його цитотоксичного впливу не дає можливості для повного насичення, було прийняте рішення застосувати 10-хвилинну експозицію на етапі насичення ембріона розчином кріопротектора.

Ембріони були кріоконсервовані після інкубації в кріоконсервуючому розчині при температурі 22°C (I група). Даний розчин містив 1,5 М 1,2-ПД і 0,1 М сахарози. Охолодження здійснювали з 22 до -7°C зі швидкістю 2°C/хв, ініціацію кристалізації при -7°C, охолодження зі швидкістю 0,3 °C / хв до -30 °C з наступним зануренням зразків у рідкий азот (Lassal B., 1985). Визначали температуру кристалізації кріоконсервуючого розчину -5°C. Виходячи з цього, було зроблено припущення, що при зниженні температури «сидінгу» до -7°C можлива спонтанна кристалізація розчину. Тому II групу склали ембріони, які кріоконсервували за наступною програмою: 10-хвилинна експозиція в 1,5 М розчині 1,2-ПД; охолодження від кімнатної температури до -5°C зі швидкістю 0,7°C /хв; ручний «сидінг» при -5°C; повільне охолодження зі швидкістю 0,3°C/хв до -32°C; занурення зразків у рідкий азот. III групу ембріонів кріоконсервували таким чином: 10-хвилинна експозиція в 1,5М розчині 1,2-ПД; охолодження від 22°C до -5°C зі швидкістю 0,7°C /хв; 10-хвилинна стабілізація для вирівнювання температури всього зразка, ручний «сидінг» при -5°C; повільне охолодження зі швидкістю 0,3°C

/хв до  $-32^{\circ}\text{C}$ ; занурення зразків у рідкий азот. Відігрівання проводили швидко на водяній бані при температурі  $30^{\circ}\text{C}$ .

Порівняльний аналіз морфології нативних і кріоконсервованих ембріонів при використанні комплексної оцінки якості після 48 год культивування дозволив встановити, що ембріони всіх досліджуваних груп до кріоконсервування знаходилися на одній стадії розвитку, мали інтактну блискучу оболонку, правильні, щільно прилягаючі один до одного бластомери і світлу, дрібнозернисту цитоплазму без вакуолярних і цитоплазматичних включень (табл.1). Кількість ушкоджених бластомерів зростала зі зниженням температури «сидінгу». Більшість ембріонів I і II груп характеризувалися руйнуванням одного бластомера або повним їх лізисом.

Виявилося, що в нативних ембріонах середня кількість бластомерів на ембріон склала  $3,97 \pm 0,01$ ,  $3,99 \pm 0,02$  і  $3,92 \pm 0,01$  для I, II і III груп відповідно ( $p > 0,05$ ). В поодиноких ембріонах усіх досліджуваних груп відзначали залучення цілого бластомера до процесів фрагментації. Після кріоконсервування середня кількість бластомерів у ембріоні склала  $2,64 \pm 0,09$ ,  $3,57 \pm 0,06$  та  $3,75 \pm 0,04$  для I, II і III груп відповідно.

У роботі вивчали морфометричні характеристики ембріонів до і після кріоконсервування. Незалежно від протоколу кріоконсервування  $62,8 \pm 2,8$ ;  $65,2 \pm 0,8$  і  $67,8 \pm 2,1\%$  ембріонів I, II і III груп відповідно мали однаковий розмір бластомерів. Однак в усіх групах спостерігалися макробластомери, що виникли, імовірно, за рахунок злиття двох сусідніх клітин.

Цитоплазма бластомерів нативних ембріонів характеризувалася прозорістю і гомогенністю. Після кріоконсервування в ембріонах I і II груп виникали дегенеративні зміни в цитоплазмі у вигляді агрегації гладкого ендоплазматичного ретикулуму, одного чи декількох вакуолеподібних утворень в центрі бластомера. В ембріонах I групи відзначали утворення великих “проломів” і розриви *zona pellucida*.

Для з'ясування залежності виживання від морфологічних характеристик ембріони поділяли на дві групи: нативні ( $n=52$ ) і кріоконсервовані ( $n=53$ ). Ембріони кожної групи були віднесені до одного з чотирьох типів категорії якості (тип фрагментації) за процентним вмістом цитоплазматичних фрагментів: перша – ембріони з бластомерами сферичної форми, які щільно прилягають один до одного, мають світлу дрібнозернисту цитоплазму, інтактну *zona pellucida* без цитоплазматичних фрагментів; друга – ембріони з нерівними бластомерами з фрагментацією, що не перебільшує 10%; третя – ембріони з фрагментацією цитоплазми не більш 50% та інтактною *zona pellucida*; четверта – фрагментація цитоплазми ембріонів більш 50%.

## Морфологічні характеристики ембріонів людини до і після кріоконсервування

| Характеристика ембріонів                              | Ембріони, %         |                       |                     |                       |                     |                       |
|-------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
|                                                       | І група<br>n =163   |                       | ІІ група<br>n =166  |                       | ІІІ група<br>n =157 |                       |
|                                                       | До<br>заморожування | Після<br>відігрівання | До<br>заморожування | Після<br>відігрівання | До<br>заморожування | Після<br>відігрівання |
| Бластомери інтактні                                   | 96,7±0,7            | 52,1±5,1              | 97,1±0,9            | 60,5±0,5              | 96,3±0,3            | 85,4±0,6**            |
| Однаковий розмір бластомерів                          | 85,9±0,1            | 62,8±2,8              | 88,6±0,7            | 65,2±0,8              | 89,7±1,7            | 67,8±2,1*             |
| Наявність не більш 25%<br>цитоплазматичних фрагментів | 83,1±3,2            | 43,8±1,0              | 85,4±0,6            | 68,8±1,0              | 82,2±0,2            | 78,9±0,9*             |
| Прозорість і гомогенність<br>цитоплазми               | 96,2±0,2            | 69,7±1,7              | 67,8±2,1            | 59,5±0,8              | 98,1±0,1            | 96,5±1,5**            |
| Наявність цитоплазматичних<br>вакуолей                | -                   | 12,2±0,2              | -                   | 4,7±0,7***            | -                   | -                     |
| Разрив <i>zona pellucida</i>                          | -                   | 8,1±0,1               | -                   | 1,2±1,2               | -                   | -                     |
| Щільний міжклітинний контакт                          | 97,6±0,4            | 96,9±1,1              | 95,7±0,3            | 84,9±0,6              | 96,9±1,1            | 95,7±0,3              |

Примітки:

1. \* – у порівнянні з ембріонами після кріоконсервування І і ІІ груп,  $p<0,05$ ;
2. \*\* – у порівнянні з ембріонами після кріоконсервування І і ІІ груп,  $p<0,01$ ;
3. \*\*\* – у порівнянні з І групою,  $p<0,001$ ;
4. – ознака відсутня.

Ембріони досліджуваних груп кріоконсервували. Після деконсервації проводили морфологічну оцінку збереження ембріонів методом світлової мікроскопії.

Ембріони без фрагментації цитоплазми мали високий рівень виживання після кріоконсервування. Картина фрагментації ембріонів першого типу статистично не відрізнялася до і після кріоконсервування. Після кріоконсервування вірогідно зростала кількість ембріонів із третім і четвертим типами фрагментації за рахунок лізису бластомерів, які були оточені фрагментованими ділянками.

Середня кількість бластомерів в ембріонах першого типу складала  $3,7 \pm 0,3$ . Після кріоконсервування загальна кількість бластомерів знизилася за рахунок їх руйнування або за рахунок додаткової фрагментації ділянок цитоплазми (табл. 2). У зв'язку з цим вірогідно зросла загальна кількість ембріонів з третім і четвертим типами фрагментації.

Слід звернути увагу на факт зниження загальної кількості бластомерів при підвищенні ступеня фрагментації. Так, середня кількість бластомерів для першого-четвертого типів складала  $3,2 \pm 0,7$ ,  $2,9 \pm 0,9$ ,  $2,2 \pm 0,8$  і  $0,8 \pm 0,6$  відповідно. Через 48 год культивування загальна кількість бластомерів у нативних і кріоконсервованих ембріонів першого і другого типів статистично зрівнялася, тоді як для ембріонів третього і четвертого типів була характерна інша картина розвитку.

Таблиця 2

**Загальна кількість бластомерів в ембріонах людини з різним типом фрагментації цитоплазматичних ділянок**

| Тип фрагментації | Час культивування, год |               |                                      |                    |                    |
|------------------|------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|
|                  | Контроль               |               | Кріоконсервовані ембріони, $M \pm m$ |                    |                    |
|                  | 24                     | 48            | 24                                   | 24                 | 48                 |
|                  |                        |               | До кріоконсервування                 | Після відігрівання |                    |
| Перший           | $3,7 \pm 0,3$          | $6,7 \pm 0,6$ | $3,7 \pm 0,3$                        | $3,2 \pm 0,7$      | $6,1 \pm 1,5$      |
| Другий           | $3,6 \pm 0,3$          | $6,2 \pm 0,9$ | $3,6 \pm 0,4$                        | $2,9 \pm 0,9$      | $5,4 \pm 1,9$      |
| Третій           | $3,4 \pm 0,4$          | $5,5 \pm 0,7$ | $3,2 \pm 0,4$                        | $2,2 \pm 0,8^*$    | $3,9 \pm 1,7^*$    |
| Четвертий        | $2,0 \pm 0,6$          | $2,6 \pm 0,9$ | $2,6 \pm 0,6$                        | $0,8 \pm 0,6^*$    | $1,0 \pm 0,8^{**}$ |

Примітки:

- \* – достовірні відмінності від контролю й ембріонів досліджуваної групи до кріоконсервування,  $p < 0,05$ ;
- \*\* – достовірні відмінності від контролю й ембріонів досліджуваної групи до кріоконсервування,  $p < 0,001$ .

Оскільки фрагментація цитоплазматичних ділянок 4-клітинних ембріонів впливає на їх виживання, а також, з огляду на той факт, що перші ділення дроблення преімплантаційних ембріонів людини мають асинхронний характер, який може впливати на їх виживання після кріоконсервування, об'єктом дослідження були обрані зиготи.

Облік морфології ядерець має істотне значення в морфофункціональній оцінці стану клітини, оскільки з ядерцями пов'язані процеси транскрипції і трансформації рибосомальної РНК (Braude P., 2002). З огляду на цей факт зиготи були розділені на чотири типи:

перший – зигота з рівною кількістю нуклеолей, які знаходяться у зоні контакту пронуклеусів;

другий – зигота з рівною кількістю нуклеолей, які розсіяні у площині пронуклеусів;

третій – зигота з різною кількістю нуклеолей в пронуклеусах;

четвертий – зигота з нерівними пронуклеусами.

У даному дослідженні контрольну групу склали 149 зигот, I і II – по 113, III – 80. Через 24 год у контрольній групі нормальний розвиток продемонстрували більш  $87,8 \pm 5,1\%$  клітин з першим типом морфології пронуклеусів. Аналогічні дані були характерні для II групи, у той час як зиготи, кріоконсервовані через 18 год після інсемінації (I група), розвилися в нормальні ембріони тільки в  $25 \pm 1,5\%$  випадків. Інші були або заблоковані на стадії зиготи, або характеризувалися високим ступенем фрагментації цитоплазми. Подібна картина спостерігалася при подальшому розвитку зигот, кріоконсервованих через 26 год після інсемінації. Аналогічні результати були характерні для другого типу організації пронуклеусів (табл. 3).

Таким чином, на підставі отриманих даних можна зробити висновок про перспективність кріоконсервування зигот через 22 год після інсемінації, коли чітко візуалізуються два пронуклеуси. У цей час зигота знаходиться в G2 фазі клітинного циклу (Balakier H., 1993). Ранні зиготи і зиготи на стадії, яка передуює мітозу, найбільш чутливі до дії ушкоджуючих факторів кріоконсервування.

Об'єктивним критерієм морфофункціональної цілості кріоконсервованих ембріонів є їх здатність до поновлення мітозу і дроблення *in vitro* до стадії бластоцисти (Landgley M., 2001).

Вивчали швидкість морфогенетичного розвитку і порівнювали кількість бластомерів в еквівалентних стадіях формування бластоцисти нативними і деконсервованими ембріонами.

Ембріони були розділені на дві групи: I - ембріони культивували 120 год, II – ембріони кріоконсервували на стадії 4-х бластомерів, після відтаювання культивували *in vitro*.

**Морфологічні характеристики ембріонів після 24 год культивування  
нативних і кріоконсервованих зигот людини  
з різним типом морфології пронуклеусів та різним терміном запліднення**

| Тип<br>зигот | Нативні ембріони<br>(контроль), % |                                   | Кріоконсервовані ембріони , %         |                                   |                                       |                                |                                         |                                   |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
|              | 1 і 2<br>категорії<br>якості      | 3 і 4<br>категорії<br>якості/блок | І група (18 год після<br>інсемінації) |                                   | ІІ група 22 год після<br>інсемінації) |                                | ІІІ група (26 год після<br>інсемінації) |                                   |
|              |                                   |                                   | 1 і 2<br>категорії<br>якості          | 3 і 4<br>категорії<br>якості/блок | 1 і 2<br>категорії<br>якості          | 3 і 4 категорії<br>якості/блок | 1 і 2 категорії<br>якості               | 3 і 4<br>категорії<br>якості/блок |
| Перший       | 87,8±5,1                          | 12,2±0,9                          | 25,0±1,5*                             | 75,1±6,8                          | 80,0±5,5                              | 20±0,9                         | 14,3±0,9*                               | 85,7±8,1                          |
| Другий       | 81,6±7,7                          | 18,4±0,3                          | 14,3±0,9*                             | 85,7±5,5                          | 68,2±4,9                              | 31,8±2,9                       | 17,4±1,1*                               | 82,6±7,8                          |
| Третій       | 58,8±4,2                          | 41,2±3,8                          | 0,3±0,01*                             | 99,7±8,8                          | 43,5±3,3                              | 56,5±5,2                       | 4,3±0,3*                                | 95,6±8,8                          |
| Четвертий    | 52,0±5,0                          | 48,0±4,0                          | 0**                                   | 100                               | 12,5±0,8**                            | 87,5±6,6                       | 0**                                     | 100                               |

Примітки:

1 \* – достовірні відмінності від контролю й ембріонів третьої групи,  $p < 0,05$ ;

2. \*\* – достовірні відмінності від контролю,  $p < 0,001$ .

Показник формування бластоцист розраховували як відношення ембріонів, що сформували бластоцисти, до загальної кількості ембріонів. Усього було аспіровано 334 і 342 ооцитів, що складало  $11,5 \pm 0,8$  і  $12,7 \pm 0,8$  ооцитів на пацієнтку ( $p > 0,05$ ). Запліднилося  $81,2 \pm 1,7$  і  $83,3 \pm 2,4\%$  ооцитів відповідно ( $p < 0,05$ ). З 156 невикористаних для перенесення ембріонів контрольної групи  $50 \pm 1,2\%$  досягли стадії бластоцисти.

Після кріоконсервування 163 ембріонів II групи, які були не використані для ембріоперенесення,  $9,8 \pm 0,23\%$  цілком зруйнувалися, у  $11,0 \pm 1,4\%$  виживання склало менш 50%, в інших ембріонах ( $78,9 \pm 1,6\%$ ) більш 50% бластомерів були інтактними. Після культивування стадії бластоцисти досягли  $14,6 \pm 0,6\%$  ембріонів, що вірогідно нижче, ніж у I групі ( $p < 0,001$ ). При 100%-му збереженні бластомерів вихід бластоцист був найбільшим -  $54,2 \pm 1,4\%$ , порівнянню з кількістю бластоцист, сформованих нативними ембріонами.

Частота досягнення стадії «вилуплення» бластоцисти для нативних ембріонів вірогідно вища, ніж для кріоконсервованих. У той же час еквівалентні стадії розвитку характеризуються різною кількістю бластомерів.

Кріоконсервовані ембріони демонструють прискорені темпи дроблення в порівнянні з нативними. Так, якщо рання бластоциста нативних ембріонів характеризується наявністю  $54,0 \pm 2,5$  бластомерів, то після кріоконсервування кількість бластомерів зростала до  $63,1 \pm 2,1$  ( $p < 0,05$ ).

Для кавітованої бластоцисти середня кількість бластомерів складала  $65,4 \pm 2,1$ , для кріоконсервованих ембріонів цей показник збільшився до  $82,2 \pm 3,6$  ( $p < 0,01$ ). Для бластоцист в стадії «вилуплення» вірогідно зростає розходження в середній кількості клітин на бластоцисту для нативних і кріоконсервованих ембріонів відповідно  $87 \pm 2,6$  і  $125 \pm 4,5$  ( $p < 0,001$ ) (рис.1).

Таким чином, кріоконсервування впливає на швидкість морфогенетичного розвитку, який виражається в збільшенні кількості бластомерів у бластоцисті. Однак фактори кріоконсервування зменшують здатність ембріонів до вивільнення з *zona pellucida*, що вимагає проведення процедури допоміжного «вилуплення».

**Цитогенетичний і молекулярно-генетичний аналіз нативних і кріоконсервованих ембріонів людини.** Проаналізовано 268 фіксованих препаратів нативних ембріонів (контроль) і 284 кріоконсервованих. Виявлено наявність інтерфазних і каріокінетичних ядер у ембріонів контрольної групи, що пояснюється асинхронністю протікання клітинних циклів. Кількість патологічних мітозів у преімплантаційних ембріонах експериментальної групи (13,0%) була вища, ніж у контрольної (4,8%), однак спектр патологічних мітозів був іншим. У нативних ембріонах патологія мітозів була пов'язана з ушкодженням хромосом. Серед патологічних мітозів, що спостерігаються у кріоконсервованих ембріонах, виявлялися ушкодження хромосом (хроматидні мости; сповільнення руху хромосом у метакінезі; утворення мікроядер) і ушкодження мітотичного

апарату (трехполюсний і моноцентричний мітози; зім'ята і грудкувата метафази). Слід зазначити, що найбільш частими патологіями мітозу були набрякання і злипання хромосом.

Після цитологічного дослідження з'ясовано, що більшість бластомерів контрольних ембріонів знаходилася в стадії інтерфази мітозу, мала виражені базофільні ядра, у яких чітко проглядалися ядерця. Так,  $89,3 \pm 0,5\%$  бластомерів знаходилися в інтерфазі,  $5,0 \pm 0,5\%$  на ранній профазі мітозу  $4,1 \pm 0,5\%$  бластомерів перебували в стадії метафази мітозу. У контрольних препаратах кількість пікнотично змінених ядер склала  $1,6 \pm 0,3\%$ . Слід звернути увагу на зміну цитологічної картини у ембріонів після кріоконсервування у бік зменшення кількості бластомерів в інтерфазі ( $71,2 \pm 0,7\%$ ) і збільшення клітин на ранній профазі мітозу  $18,1 \pm 0,8\%$ . На стадії метафази мітозу знаходилося  $3,1 \pm 0,05\%$  клітин. Після кріоконсервування кількість пікнотичних ядер збільшилася до  $7,6 \pm 0,4\%$ , що може свідчити про загибель внутрішньоклітинних структур і некротичні процеси, які відбуваються в клітині після кріоконсервування.

Для цитогенетичного аналізу методом каріотипування виявилися придатними  $57,5 \pm 1,6\%$  нативних і  $60,3 \pm 1,5\%$  кріоконсервованих ембріонів. В інших випадках спостерігали дегенеративні зміни (конденсація чи деспіралізація хроматину, злипання хромосом); у  $68,1\%$  випадків нативні ембріони мали нормальний диплоїдний набір хромосом (рис.2); у  $26,9\%$  - були анеуплоїдними. Мозаїчними вважали  $2,5\%$  ембріонів (табл. 4). При аналізі ембріонів людини після кріоконсервування встановлено, що нормальні метафазні пластинки візуалізувалися у  $42,1\%$  випадків, частота поліплоїдії збільшилася до  $7\%$ , анеуплоїдії - до  $27,2\%$ , мозаїцизму - до  $23,7\%$ .

Таблиця 4

## Результати цитогенетичного аналізу ембріонів людини до і після кріоконсервування

| Каріотип                 |                                                                                                                                                                              |                          | Кількість ембріонів,п,% |                  |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|
|                          |                                                                                                                                                                              |                          | Контроль                | Кріоконсервовані |
| Диплоїдія                |                                                                                                                                                                              | 46,XX;                   | 34                      | 19               |
|                          |                                                                                                                                                                              | 46,XY                    | 44                      | 28               |
|                          |                                                                                                                                                                              | 45-48 <2n>,XX            | 2                       | 1                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 44-47<2n>,XX             | 1                       | 0                |
| Всього                   |                                                                                                                                                                              |                          | 81 (68,1)               | 48 (42,1)        |
| Поліплоїдія              |                                                                                                                                                                              | 69, XXX                  | 2                       | 3                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 92, XXXY                 | 1                       | 2                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 68-71, <3n>XXX           | 0                       | 1                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 65-70, <3n>XX?           | 0                       | 1                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 90-94, <4n>XXXY?         | 0                       | 1                |
| Всього                   |                                                                                                                                                                              |                          | 3 (2,5)                 | 8 (7,0)          |
| Анеуплоїдія              | Гіперплоїдія                                                                                                                                                                 | 47, XY, +C               | 3                       | 2                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 47, XX, +E               | 3                       | 4                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 47, XX, +F               | 3                       | 0                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 47,XX,+G                 | 1                       | 1                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 48,XX, +E,+E             | 1                       | 1                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 48,XY,+C,+E              | 1                       | 0                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 49,XX,+E,+F,+G           | 1                       | 0                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 51, XX,+B,+D,+E,+F,+G    | 0                       | 1                |
|                          | Всього                                                                                                                                                                       |                          | 13 (10,9)               | 9 (7,9)          |
|                          | Гіпоплоїдія                                                                                                                                                                  | 45,XX,-D                 | 1                       | 0                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 45,XX,-G                 | 2                       | 0                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 44,XX,-A,-B              | 4                       | 1                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 43,XY, - A,-B,-C         | 1                       | 1                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 40,XY?,-A,-B,-C,-E,-F,-G | 2                       | 2                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 43, XX, -F,-F,-G         | 2                       | 4                |
| 43,XX,-E,-E,-F           |                                                                                                                                                                              | 0                        | 3                       |                  |
| 43,XY,-E,-E,-F           |                                                                                                                                                                              | 0                        | 4                       |                  |
| 43,XY?,-D,-E,-G          |                                                                                                                                                                              | 2                        | 3                       |                  |
| 43,XX,-E,-E,-G,-G        |                                                                                                                                                                              | 1                        | 1                       |                  |
| 42,XX,-F,-F,-G,-G        |                                                                                                                                                                              | 1                        | 0                       |                  |
| 40,XY?,-A,-B,-D,-E,-F,-G |                                                                                                                                                                              | 1                        | 0                       |                  |
| 47,XX,+A,+B,+C           | 0                                                                                                                                                                            | 2                        |                         |                  |
| Всього                   |                                                                                                                                                                              | 17 (14,3)                | 21 (18,4)               |                  |
| Комбіновані випадки      |                                                                                                                                                                              | 45,XX,?+C,+D,-D,-F,-G    | 0                       | 1                |
|                          |                                                                                                                                                                              | 44XX, +D,-F,-G,-G        | 2                       | 0                |
| Всього:                  |                                                                                                                                                                              |                          | 32 (26,9)               | 31 (27,2)        |
| Мозаїцизм                | Диплоїдні мозаїки:<br>1) хаотичні мозаїки<br>2) 2n/pol<br>3)мітотичні анеуплоїди:<br>а)мітотичне нерозходження хромосом<br>б)мітотичний анафазний міст<br>в)ендоредуплікація |                          | 2                       | 9                |
|                          |                                                                                                                                                                              |                          | 1                       | 8                |
|                          |                                                                                                                                                                              |                          | 0                       | 1                |
|                          |                                                                                                                                                                              |                          | 0                       | 2                |
|                          | Поліплоїдні мозаїки                                                                                                                                                          |                          | 0                       | 2                |
|                          | Гаплоїдні мозаїки                                                                                                                                                            |                          | 0                       | 5                |
| Всього                   |                                                                                                                                                                              |                          | 3 (2,5)                 | 27 (23,7)        |
| Всього:                  |                                                                                                                                                                              |                          | 119 (100)               | 114 (100)        |

Серед 7 груп хромосом найбільш часто анеуплоїдія виникала за рахунок нерозходження хромосом груп E, F і G, що було характерним як до, так і після кріоконсервування ембріонів. Частота аномального розходження хромосом груп A, C+X і D була вірогідно нижча теоретично очікуваної, а груп E, F і G - вища ( $p < 0,05$ ) (табл. 5).

Таблиця 5

**Частота аномальної розбіжності серед 7 груп хромосом нативних і кріоконсервованих ембріонів людини**

| Досліджувані групи ембріонів | Групи хромосом |      |      |      |      |      |      | Всього |
|------------------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|--------|
|                              | A              | B    | C+X  | D    | E    | F    | G    |        |
| Нативні, %                   | 10,4           | 10,4 | 9,1  | 7,8  | 18,2 | 19,5 | 24,7 | 100    |
| Кріоконсервовані, %          | 6,8            | 8,0  | 9,1  | 6,8  | 31,8 | 21,6 | 15,9 | 100    |
| Очікувана частота, %*        | 13,0           | 8,7  | 34,9 | 13,0 | 13,0 | 8,7  | 8,7  | 100    |

Примітка:

\* - теоретично очікувана частота розраховувалася з урахуванням того, що хромосоми різних груп мають однакову імовірність аномальної розбіжності.

Встановлено збільшення нерозходження хромосом груп E і F в ембріонах людини після кріоконсервування.

Враховуючи труднощі щодо одержання повноцінних препаратів метафазних хромосом і той факт, що патології мітозу можуть носити зворотній характер, було здійснено молекулярно-генетичний аналіз інтерфазних хромосом методом флюоресцентної гібридизації *in situ*.

Проведено FISH-аналіз 10 ембріонів людини після 48 год культивування *in vitro*: 3 ембріони першої категорії якості перебували в стадії 4-х бластомерів, 7 ембріонів (першої і другої категорій якості) - на стадії 8-ми бластомерів. Всі ембріони були зафіксовані і пройшли успішну гібридизацію. FISH-аналіз був можливий у 32 бластомерах (табл. 6).

Кріоконсервували 20 ембріонів першої категорії якості (чіткі, рівні бластомери однакової величини, відсутність фрагментації). На стадії 2-х бластомерів знаходилися 5 ембріонів (25%), на стадії 4-х бластомерів - 10 (50%) і на стадії 8-ми бластомерів - 5 (25%).

Після кріоконсервування 16 ембріонів зберегли 50% інтактних бластомерів, у 4-х ембріонах спостерігали повний лізис бластомерів. Таким чином, частота виживання ембріонів склала 80%.

За результатами аналізу інтерфазних ядер 80% нативних і 63,7% кріоконсервованих ембріонів мали нормальний каріотип. Поліплоїдні мозаїки (тетра- і гексаплоїдні клітинні лінії) були виявлені у 18,2% ембріонів після кріоконсервування. Частота анеуплоїдії по 13, 18, 21 і 22-й хромосомах у нативних і кріоконсервованих ембріонах статистично не відрізнялась ( $p > 0,05$ ).

Таблиця 6

**Цитогенетичний аналіз ембріонів людини до кріоконсервування методом FISH-аналізу**

| Номер ембріона | Кількість клітин | Кількість FISH-сигналів у хромосомах |    |    |    |    | Діагностика ембріона |
|----------------|------------------|--------------------------------------|----|----|----|----|----------------------|
|                |                  | 13                                   | 18 | 21 | 16 | 22 |                      |
| 1              | 4                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 2              | 2                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 3              | 1                | 3                                    | 2  | 2  | 0  | 2  | Комплексний мозаїк   |
|                | 1                | 2                                    | 3  | 2  | 2  | 4  |                      |
|                | 1                | 2                                    | 2  | 1  | 2  | 3  |                      |
|                | 1                | 1                                    | 2  | 3  | 0  | 1  |                      |
| 4              | 6                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 5              | 2                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 6              | 1                | 3                                    | 3  | 1  | 3  | 3  | Комплексний мозаїк   |
|                | 2                | 2                                    | 2  | 0  | 2  | 2  |                      |
|                | 1                | 0                                    | 0  | 2  | 2  | 2  |                      |
| 7              | 2                | 1                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 8              | 1                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 9              | 2                | 2                                    | 1  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 10             | 5                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |

Успішна гібридизація була здійснена у 11 ембріонах (68,8%), FISH-аналіз був можливий у 37 бластомерах (табл. 7).

Таблиця 7

**Цитогенетичний аналіз ембріонів людини після кріоконсервування методом FISH-аналізу**

| Номер ембріона | Кількість клітин | Кількість FISH-сигналів у хромосомах |    |    |    |    | Діагностика ембріона |
|----------------|------------------|--------------------------------------|----|----|----|----|----------------------|
|                |                  | 13                                   | 18 | 21 | 16 | 22 |                      |
| 1              | 1                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 2              | 1                | 4                                    | 4  | 4  | 4  | 4  | Тетраплоїд 4N        |
| 3              | 1                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Комплексний мозаїк   |
|                | 1                | 1                                    | 0  | 1  | 0  | 0  |                      |
|                | 1                | 0                                    | 0  | 2  | 1  | 0  |                      |
| 4              | 7                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 5              | 1                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 6              | 3                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Комплексний мозаїк   |
|                | 2                | 2                                    | 2  | 2  | 0  | 2  |                      |
|                | 1                | 0                                    | 2  | 0  | 0  | 2  |                      |
|                | 1                | 1                                    | 2  | 1  | 3  | 2  |                      |
|                | 1                | 2                                    | 4  | 4  | 2  | 2  |                      |
| 7              | 1                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
|                | 1                | 2                                    | 2  | 2  | 1  | 2  |                      |
|                | 1                | 2                                    | 2  | 2  | 3  | 2  |                      |
| 8              | 2                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 9              | 5                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Мозаїк 2N/6N         |
|                | 1                | 6                                    | 6  | 6  | 6  | 6  |                      |
| 10             | 2                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
| 11             | 2                | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | Норма                |
|                | 1                | 1                                    | 2  | 1  | 2  | 2  |                      |

Важливо звернути увагу на високу частоту анеуплоїдій із залученням 16-ї хромосоми у ембріонах людини після кріоконсервування ( $p < 0,01$ ) (табл. 8).

Таблиця 8

**Частота анеуплоїдії бластомерів у ембріонів людини до і після кріоконсервування**

| Хромосома | Кількість бластомерів з анеуплоїдією n, % |                  | Очікувана частота, %** |
|-----------|-------------------------------------------|------------------|------------------------|
|           | Деконсервовані ембріони                   | Нативні ембріони |                        |
| 13        | 7 (18,9)                                  | 5 (15,6)         | 13,0                   |
| 18        | 5 (13,5)                                  | 4 (12,5)         | 13,0                   |
| 21        | 7 (18,9)                                  | 5 (15,6)         | 8,7                    |
| 16        | 10 (27)*                                  | 3 (9,4)          | 13,0                   |
| 22        | 5 (13,5)                                  | 4 (12,5)         | 8,7                    |

Примітки:

1. \* – відмінності достовірні у порівнянні з другою групою,  $p < 0,01$ ;
2. \*\* – теоретично очікувана частота розраховувалася з припущення, що хромосоми різних груп мають однакову імовірність аномальної розбіжності.

Молекулярно-генетичний аналіз експресії генів *bcl-2* та *baх*, що залучені до процесів апоптозу, в нативних та кріоконсервованих ембріонах довів, що активність вказаних генів корелює з морфологічними характеристиками ембріонів. Так, у ембріонах з вираженою фрагментацією цитоплазматичних ділянок відсутня експресія *baх* гену.

Цитогенетичний аналіз методами каріотипування і флюоресцентної гібридизації *in situ* дозволив визначити, що преімплантаційні ембріони при заплідненні *in vitro* ооцитів пацієнток, що беруть участь у циклах лікування безплідності, характеризуються високою генетичною гетерогенністю. Відбір нативних і кріоконсервованих ембріонів ще до початку вагітності при виявленні генетичних патологій важливий для запобігання народження дитини з хромосомними аномаліями.

**Внесок батьківського і материнського геномів у частоту нестабільності генетичного апарату ембріонів людини.** Було аспіровано 3526 ооцитів, з яких 78% запліднилося. У 22% ооцитів були відсутні морфологічні ознаки фертилізації. Серед 776 фіксованих ооцитів придатними для цитогенетичного аналізу виявилось 49,7% (табл. 9). В інших випадках спостерігали дегенеративні зміни (конденсація чи деспіралізація хроматину, злипання хромосом).

Виявилось, що з віком пацієнток збільшується частота анеуплоїдії та поліплоїдії статевих клітин. Диплоїдні клітини склали 15% від усіх проаналізованих ооцитів. У 86 клітинах виявили різні аномалії кількості хромосом і хромосомні аберації.

Таким чином, підвищення частоти хромосомної патології ооцитів у пацієнток з віком має таку ж тенденцію, як у природній популяції, однак показники спонтанної патології нижчі (Almeida P., 1993).

З 157 зрілих ооцитів 30,6% мали аномальний каріотип. Серед незрілих і перезрілих клітин аномалії каріотипу склали 68,8 і 26,1%. При цитогенетичному аналізі було встановлено, що 11,7% ооцитів характеризувалися цитологічними ознаками запліднення. Це виражалося в присутності, поряд із хромосомами ооцитів, передчасно конденсованих хромосом спермія (ПКХ).

Таблиця 9

**Результати цитогенетичного аналізу незапліднених  
ооцитів людини**

| Каріотип       |                      | Кількість ооцитів n | Загальна кількість ооцитів n, % |
|----------------|----------------------|---------------------|---------------------------------|
| Норма          | 23,X                 | 204                 | 204 (52,8)                      |
| Гіпергаплоїдія | МІІ, 26X, +C,+C,+F   | 1                   | 12 (3,1)                        |
|                | МІІ, 26X, +B,+C,+F   | 1                   |                                 |
|                | МІІ, 25X, +F,+E      | 1                   |                                 |
|                | МІІ, 25X, +C,+F      | 2                   |                                 |
|                | МІІ, 24X,+C          | 1                   |                                 |
|                | МІІ, 24X,+G          | 2                   |                                 |
|                | МІІ, 24X,+E          | 2                   |                                 |
|                | МІІ, 23X, +Acht      | 1                   |                                 |
|                | МІІ, 23X, +Ccht      | 1                   |                                 |
| Гіпогаплоїдія  | МІІ, 19,X,-C,-E,-F,G | 1                   | 74 (19,2)                       |
|                | МІІ, 20X,-C,-E,-F    | 2                   |                                 |
|                | МІІ, 20X, -C,-C,-E   | 2                   |                                 |
|                | МІІ,20X,-C,-E,-E     | 2                   |                                 |
|                | МІІ,20X,-C,-F,-F     | 2                   |                                 |
|                | МІІ, 21X, -E,-E      | 8                   |                                 |
|                | МІІ, 22X,-C          | 17                  |                                 |
|                | МІІ, 22X,-G          | 16                  |                                 |
|                | МІІ, 22X,-D          | 10                  |                                 |
|                | МІІ, 22X,-F          | 13                  |                                 |
|                | МІІ, 22,X,-B,        | 1                   |                                 |
| Диплоїдія      | 46, XX               |                     | 51 (13,2)                       |
| Ооцити з ПКХ   |                      |                     | 45 (11,7)                       |
| Всього         |                      |                     | 386 (100)                       |

Виникнення ПКХ може відбуватися через аномальний стан хроматину сперміїв. У роботі проаналізовано стан нуклеарного хроматину 63 зразків сперми пацієнтів програми екстракорпорального запліднення (ЕКЗ). Зразки І групи (n=33) мали нормальну компактизацію хроматину (кількість деконденсованих ядер не більш  $5 \pm 0,5\%$ ). Групу з аномальним укладанням хроматину склали 30 зразків, у яких цей показник склав більш  $5 \pm 0,5\%$ . Концентрація

сперматозоїдів у I групі -  $98,1 \pm 3,2$ , у II -  $89,1 \pm 9,2$  млн/мл; прогресивно-рухливі форми -  $56 \pm 2,2$  і  $48,8 \pm 0,9$  %; морфологічно аномальні спермії -  $14,2 \pm 2,1$  і  $24 \pm 2,2$  % відповідно. Середня кількість аспірованих ооцитів була порівняна в обох групах. Частота запліднення в групі з нормальною конденсацією хроматину сперміїв була вища, ніж у групі з аномальною.

Таким чином, організація хроматину сперміїв корелює з морфофункціональними показниками еякуляту і може впливати на частоту фертилізації і ранній розвиток ембріонів у програмі ЕКЗ (табл. 10). Відомо, що експресія чоловічого геному відбувається в ембріонах людини на стадії 4-8 бластомерів (Tesarik J., 1998). Можливо, аномалії в механізмах, які контролюють компактизацію хроматину сперміїв, позначаються вже на ранніх стадіях розвитку ембріонів та виявляються в підвищенні ступеня цитоплазматичної фрагментації.

Таблиця 10

**Показники сперматогенезу, частоти запліднення і якості ембріонів у групах з нормальним і аномальним станом хроматину**

| Показник                                     | Стан хроматину             |                               |
|----------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
|                                              | I група<br>(конденсований) | II група<br>(деконденсований) |
| Концентрація сперматозоїдів                  | $98,1 \pm 3,2$             | $89,1 \pm 9,2$                |
| Прогресивно-рухливі форми                    | $56,0 \pm 2,2$             | $48,8 \pm 0,9^*$              |
| Морфологічно аномальні сперматозоїди         | $14,2 \pm 2,1$             | $24,0 \pm 2,2^{**}$           |
| Середня кількість ооцитів                    | $5,9 \pm 0,7$              | $6,2 \pm 1,1$                 |
| Частота запліднення                          | $79,0 \pm 2,4$             | $45,0 \pm 2,6^{**}$           |
| Середня кількість ембріонів без фрагментації | $44,1 \pm 0,8$             | $22,2 \pm 0,6^*$              |

Примітка:

– у порівнянні з I групою,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ .

Однією з особливостей запліднення ооцитів людини при проведенні програми ЕКЗ є утворення зигот з аномальною кількістю пронуклеусів. За даними літератури від 1 до 6,5% усіх запліднених ооцитів *in vitro* можуть бути моно- та поліпронуклеарними, або взагалі не містити пронуклеусів (Стефанович А.В., 1994; Воробйова О.О., 2000).

Після інсемінації 3526 ооцитів було отримано 2750 зигот. У 95% знайшли ознаки нормального запліднення (два пронуклеуси), у 1,2% виявили апроноуклеарні зиготи, 0,7% – один пронуклеус, 1,2% - три, 1,9% - чотири і більш (поліпронуклеарні).

Спостереження за морфологічними характеристиками і темпами дроблення дозволило встановити, що всі нормально запліднені ооцити продовжили свій розвиток *in vitro*, тоді як зупинили свій розвиток до першого поділу дроблення  $44,1 \pm 4,1\%$  трохпронуклеарних,  $57,9 \pm 4,8\%$  однопронуклеарних,  $76,9 \pm 6,5\%$  поліпронуклеарних і  $53,1 \pm 5,1\%$  апроноуклеарних зигот.

Відповідно  $66,7 \pm 5,8$  і  $62,5 \pm 5,9\%$  одно- і апроноуклеарних зигот виявилися диплоїдними,  $60 \pm 5,5\%$  трохпронуклеарних – триплоїдними.

Зиготи з аномальною кількістю пронуклеусів вірогідно частіше спостерігаються у жінок віком від 35 років. Частота виникнення аномальних зигот залежить від морфофункціональних характеристик ооцитів: у перезрілих ооцитах зростає частота утворення поліпронуклеарних зигот. Більшість аномально запліднених зигот припиняє свій розвиток до першого поділу. Ембріони, що розвилися з трохпронуклеарних зигот в умовах *in vitro*, мають високий рівень асинхронності розвитку.

Цитогенетичний аналіз при проведенні програм допоміжних репродуктивних технологій дозволяє оцінити якість одержуваних гамет, встановити етап, на якому зупинився розвиток ембріонів, аномалії процесу запліднення і дроблення, а також інші патологічні зміни, визначити які іншими методами неможливо. Цитогенетичний аналіз незапліднених ооцитів і виявлення цитологічних ознак фертилізації дозволяють зрозуміти причини невдалого запліднення і пояснити ідіопатичну форму безплідності.

**Сокультивування нативних і деконсервованих ембріонів людини.** Були вивчені морфофункціональні характеристики ембріонів, що культивували з преовуляторною фолікулярною рідиною яєчників, преовуляторною сироваткою крові та клітинами кумулюсу і гранульози пацієнтки.

Ембріони були поділені на контрольну і досліджувану групи, у яких ембріони знаходилися в різних умовах культивування. Через 24 год порівнювали морфологічні властивості ембріонів у різних культуральних системах.

Слід звернути увагу, що  $45,0 \pm 3,6$  і  $40,8 \pm 3,9\%$  нативних і кріоконсервованих ембріонів характеризувалися нормальною морфологією і були віднесені до першої і другої категорії якості при культивуванні в стандартному середовищі (табл. 11).

## Вплив умов сокультивування на морфологічні характеристики ембріонів людини

| Системи культивування                             | Контроль              |                                                                      | Кріоконсервовані ембріони |                                                                      |
|---------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|                                                   | Кількість ембріонів n | Кількість ембріонів першої категорії якості, 48 год культивування, % | Кількість ембріонів n     | Кількість ембріонів першої категорії якості, 48 год культивування, % |
| Стандартне середовище                             | 20                    | 45,0±3,6                                                             | 20                        | 40,8±3,9                                                             |
| Стандартне середовище+20% фолікулярна рідина      | 18                    | 17,0±1,3*                                                            | 20                        | 20,4±1,9*                                                            |
| Стандартне середовище+20% сироватка крові         | 22                    | 81,4±2,4**                                                           | 21                        | 76,7±3,7**                                                           |
| Сокультивування з клітинами кумулюсу і гранульози | 24                    | 92,2±2,2**                                                           | 22                        | 86,4±3,2**                                                           |

Примітки:

- 1.— \*у порівнянні зі стандартним середовищем,  $p < 0,01$ ;
- 2.— \*\* - у порівнянні зі стандартним середовищем,  $p < 0,001$ .

Сокультивування ембріонів на моношарі клітин кумулюсу і гранульози дозволило підвищити кількість ембріонів першої і другої категорії якості ( $p < 0,001$  у порівнянні з використанням стандартного середовища).

Застосування систем сокультивування *in vitro* сприяє зниженню кількості ембріонів з ознаками фрагментації як до, так і після кріоконсервування, в основному за рахунок збільшення концентрації амінокислот (триптофан, пролін, валін, орнітин, глутамін і лейцин).

Вивчення розвитку ембріонів дає можливість поглибити наші знання про преімплантаційний ембріогенез, а з практичної точки зору сприяє створенню більш ефективних систем культивування ранніх ембріонів людини *in vitro*. Отримані результати свідчать про перспективність використання преовуляторної сироватки і систем сокультивування преімплантаційних ембріонів при проведенні експериментальних та практичних робіт.

У розділі «Обговорення отриманих результатів» узагальнено результати, проведено порівняння результатів роботи з відомими дослідженнями в галузі кріобіології, генетики, репродуктології.

Показано, що, використовуючи комплексну оцінку ембріонів людини, що включає морфологічні характеристики, здатність до поновлення мітозу, темпи дроблення в культурі і преімплантаційну генетичну діагностику, можна одержати всебічну інформацію про біологічну

повноцінність ембріонів до і після кріоконсервування та прогнозувати імовірність настання вагітності.

## ВИСНОВКИ

Сучасні методи кріоконсервування і принципи оцінки морфофункціонального збереження преімплантаційних ембріонів людини не дозволяють визначити вплив факторів кріоконсервування на їх генетичний апарат. Тому в дисертаційній роботі на підставі детального аналізу морфофункціональних, цитологічних та молекулярно-генетичних характеристик визначений вплив вихідного стану преімплантаційних ембріонів людини на їх життєздатність після кріоконсервування. У дисертації наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення наукової проблеми генетичної безпеки використання кріоконсервованих преімплантаційних ембріонів людини у допоміжних репродуктивних технологіях при лікуванні безпліддя.

1. Розроблена система комплексної оцінки морфологічних характеристик шляхом аналізу розміру та ступеня адгезії бластомерів, наявності фрагментації, цитоплазматичних вакуолей, стану *zona pellucida*, яка визначає внесок індивідуальних характеристик і дозволяє використовувати їх як біомаркери кріочутливості ембріона.
2. Морфологія ембріонів до кріоконсервування позитивно корелює з їх виживанням після відігрівання. У зв'язку з цим ембріони без цитоплазматичних фрагментів, які мають світлу дрібнозернисту цитоплазму, інтактну *zona pellucida*, бластомери сферичної форми, придатні для кріоконсервування.
3. Встановлено, що оптимальною стадією для кріоконсервування преімплантаційних ембріонів людини є зигота. Кріоконсервування ембріонів людини, що знаходяться на даній стадії, варто проводити через 20-22 год після інсемінації. Поетапне розморожування зигот у 1–3-ю добу перед використанням у допоміжних репродуктивних технологіях та наступне культивування дозволяють переносити в порожнину матки пацієнтки ембріони різних термінів розвитку, що збільшить імовірність їх імплантації.
4. Кріоконсервовані ембріони у порівнянні з нативними характеризуються різними темпами морфогенетичного розвитку. Після кріоконсервування ембріони демонструють прискорені темпи дроблення, які виражаються у ранньому формуванні бластоцисти і збільшенні загальної кількості бластомерів. Фактори кріоконсервування впливають на здатність бластоцисти до виходу з *zona pellucida*, що вимагає проведення процедури допоміжного "вилуплення".
5. Молекулярно-цитогенетичний аналіз при гібридизації клонованих послідовностей ДНК із метафазними та інтерфазними хромосомами *in situ* дозволив визначити високу генетичну

гетерогенність преімплантаційних ембріонів людини. У преімплантаційних ембріонах людини після кріоконсервування зростає частота анеуплоїдії хромосом групи G, збільшується частота мозаїцизму і поліплоїдії.

6. Селекція ембріонів за станом хроматину бластомерів є індикатором ефективності кріоконсервування і надійним критерієм оцінки функціональної активності генома бластомерів.
7. Фактори кріоконсервування індукують фрагментацію бластомерів з утворенням без'ядерних ділянок цитоплазми, що перешкоджають нормальному розподілу бластомерів. Ембріони людини на різних стадіях розвитку виявляють різну морфофункціональну цілість після кріоконсервування, що виражається в збільшенні ступеня фрагментації бластомерів.
8. Грубі хромосомні аберації в нативних і деконсервованих ембріонах виявляються у виді порушення каріо- та цитокінезу: утворення мультинуклеарних бластомерів, фрагментів бластомерів, що містять нерівномірні маси хроматину. Фактори кріоконсервування індукують злиття окремих бластомерів з утворенням поліплоїдних клітин. Тому необхідна преімплантаційна генетична діагностика кріоконсервованих ембріонів з метою використання у допоміжних репродуктивних технологіях генетично повноцінних ембріонів.
9. Фактори кріоконсервування знижують мітотичний індекс наступного поділу після кріоконсервування, збільшують кількість патологічних станів мітозів і індукують виникнення пікнотичних ядер.
10. Основне хромосомне порушення при цитогенетичному аналізі незапліднених ооцитів – анеуплоїдія. Із збільшенням кількості незрілих ооцитів, отриманих при пункції фолікулів, підвищується ризик хромосомної патології; з віком у жінок спостерігається нестабільність хромосомного набору репродуктивних клітин, що обумовлює проведення додаткового цитогенетичного аналізу.
11. Для поліпшення умов культивування преімплантаційних ембріонів *in vitro* була розроблена система сокультивування на клітинах кумулюсу і гранульози, яка дозволила зменшити частоту фрагментації нативних і кріоконсервованих ембріонів людини.
12. Розроблені науково обґрунтовані принципи комплексної оцінки нативних та кріоконсервованих ембріонів за морфологічними характеристиками, здатністю до поновлення мітозу, швидкістю морфогенетичних процесів з урахуванням результатів преімплантаційної генетичної діагностики можуть бути використані в якості прогностичних критеріїв вірогідності розвитку повноцінних ембріонів при їх застосуванні у допоміжних репродуктивних технологіях.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ

1. Грищенко В.И., Петрушко М.П., Геродес А.Г., Пиняев В.И. Цитогенетический анализ гамет и эмбрионов в программе экстракорпорального оплодотворения // Проблемы репродукции. – 1996. – № 1. – С.63–67.
2. Грищенко В.И., Петрушко М.П., Пиняев В.И., Луцкая Л.И., Терячая И.В., Крамар М.И., Юрченко Г.Г. Использование спермиев, хранившихся в условиях гипотермии, для реинсеминации неоплодотворенных ооцитов в программе ЭКО // Проблемы криобиологии. – 1998. – № 3. – С.48–52.
3. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Петрушко М.П., Пиняев В.И. Влияние нативной и криоконсервированной фолликулярной жидкости человека на оплодотворяющую способность спермиев и развитие эмбрионов человека *in vitro* // Проблемы криобиологии. – 1999. – № 1. – С.66–68.
4. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Петрушко М.П., Никитченко Ю.В. Роль антиоксидантной системы нативной и криоконсервированной фолликулярной жидкости человека в сохранении биологических свойств спермиев человека // Биологический вестник. – 1999. – Т.3, № 1,2. – С.36–40.
5. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Петрушко М.П., Пиняев В.И., Грищенко Н.Г. Использование фолликулярной жидкости человека на этапе культивирования гамет и эмбрионов в программе ЭКО // Проблемы репродукции. – 1999. – №6. – С.43–46.
6. Грищенко В.И., Петрушко М.П., Пиняев В.И. Влияние количества и качества эмбрионов на результативность программы ЭКО // Проблемы репродукции. – 2000. – № 1. – С.44–47.
7. Грищенко В.И., Жегунов Г.Ф., Петрушко М.П., Хроменкова О.Б. Причины низкой эффективности програми ЗІВ: цитогенетичний аспект // Педіатрія, акушерство і гінекологія. – 2000. – № 2. – С.107–110.
8. Петрушко М.П. Использование криоконсервированных эмбрионов человека во вспомогательных репродуктивных технологиях // Проблемы криобиологии. – 2000. – № 1. – С. 71–76.
9. Грищенко М.Г., Петрушко М.П., Пиняев В.И., Рязанцев В.В. Роль антиоксидантных ферментных систем фолликулярной жидкости в процессах оплодотворения ооцитов при лечении бесплодия с использованием вспомогательных репродуктивных технологий // Медицина сьогодні і завтра. – 2001. – №.3. – С.102–104.
10. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Петрушко М.П., Пиняев В.И., Грищенко Н.Г. Оптимизация программы экстракорпорального оплодотворения путем использования биологически

- активных сред: 3б. наук. праць Асоціації акушерів-гінекологів України. – Київ, 2001.– С. 173–175.
11. Грищенко В.І., Петрушко М.П., Піняєв В.І. Лікування неплідності методом екстракорпорального запліднення // Журнал Академії Медичних Наук України. – 2001.– № 3.– С.569-575.
  12. Grischenko V.I., Petrushko M.P., Pinyaev V.I., Terpyachaya I.V. Use of sperm stored under hypothermic conditions for reinsemination of unfertilized oocytes in an IVF programme // Cryo-Letters. – 2001.– Vol.22, №4.– P.235–240.
  13. Грищенко М.Г., Петрушко М.П., Піняєв В.І., Рязанцев В.В. Процеси перекисного окислення ліпідів, антиоксидантні ферментативні системи фолікулярної рідини та процеси запліднення ооцитів *in vitro* при використанні допоміжних репродуктивних технологій // Педіатрія, акушерство і гінекологія. – 2002.– № 2.– С.103–107.
  14. Пат. 48932 А Україна МПК G 01N33/00. Спосіб прогнозування запліднення ооцитів при лікуванні безплідності в програмі запліднення *in vitro* / М.Г. Грищенко, М.П. Петрушко., В.І. Піняєв., В.В. Рязанцев / Заявл. 08.07.02. Опубл. 15.08.02. Бюл. №8. – С.4.146.
  15. Петрушко М.П. Цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов человека // Цитология и генетика. – 2003.– № 6.– С.50-56.
  16. Грищенко В.І., Петрушко М.П., Геродес А.Г., Терпячая І.В. Беременность и роды после трансплантации деконсервированных эмбрионов человека // Проблемы криобиологии. – 2003.– № 3.– С.99–102.
  17. Грищенко В.І., Петрушко М.П., Ерогова Н.Н., Піняєв В.І. Преждевременная конденсация хромосом спермиев в ооцитах человека, оплодотворенных *in vitro* // Цитология и генетика. – 2004.– №2.– С.55–60.
  18. Грищенко В.І., Петрушко М.П., Ерогова Н.Н., Піняєв В.І. Морфофункциональные и цитогенетические характеристики трехпронуклеарных зигот человека в программе ЭКО // Цитология и генетика. – 2004.– №1.– С.21–26.
  19. Петрушко М.П. Возникновение многоядерных бластомеров эмбрионов человека после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2004.– № 1.– С.55–62.
  20. Петрушко М.П. Цитогенетический анализ нативных и деконсервированных эмбрионов человека методом флюоресцентной гибридизации *in situ* // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2004.– № 3.– С.339–344.
  21. Пат. 4909 Україна МПК A01N1/02. Спосіб кріоконсервування ембріонів людини // В.І. Грищенко, М.П. Петрушко, Т.М. Гуріна // Заявл. 24.05.04. Опубл. 15.02.05.– Бюл.2.

22. *Петрушко М.П.* Скорость морфогенеза эмбрионов человека после криоконсервирования // Пробл. криобиологии. – 2005. – № 1. – С.56–62.
23. *Петрушко М.П.* Морфологические характеристики нативных и криоконсервированных эмбрионов человека // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2005. – № 2. – С.45–50.
24. *Петрушко М.П.* Роль фаз клеточного цикла и морфологии пронуклеусов в жизнеспособности нативных и криоконсервированных зигот человека // Проблемы криобиологии. – 2005. – № 2. – С.202–206.
25. *Грищенко В.И., Геродес А.Г., Петрушко М.П., Терпячая И.В., Грищенко Н.Г.* Лечение бесплодия у пациентов с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ) методом ОИВ с использованием криоконсервированных эмбрионов: Зб. наук. праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Щупика. – Київ, 2006. – С.107–110.
26. *Грищенко В.И., Петрушко М.П., Пиняев В.И., Грищенко Н.Г.* Генетические аспекты переноса криоконсервированных эмбрионов: Зб. наук. праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Щупика. – Київ, 2006. – С.181–184.
27. *Петрушко М.П., Пиняев В.И., Луцкая Л.И., Терпячая И.В.* Роль клеток кумулюса в фертилизации, дроблении и эффективности программы ЭКО: Сб. науч. трудов симпозиума с международ. участием "Бесплодие. Вспомогательные репродуктивные технологии". – Київ, 1997. – С.112–114.
28. *Грищенко В.И., Пиняев В.И., Петрушко М.П., Луцкая Л.И., Терпячая И.В.* Лечение бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения: Актуальные вопросы репродуктологии и криомедицины. – Харків, 1998. – С.135–138.
29. *Геродес А.Г., Пиняев В.И., Луцкая Л.И., Петрушко М.П., Терпячая И.В.* Влияние концентрации половых гормонов в фолликулярной жидкости человека на результативность ОИВ: Сб.науч. трудов симпозиума с межд. участием "Бесплодие. Вспомогательные репродуктивные технологии". – Київ, 1999. – С.22–25.
30. *Петрушко М.П.* Криоконсервирование эмбрионов человека: выбор оптимального метода: Сучасні аспекти репродуктології, перинатальної медицини та криобіології. – Харків, 2003. – С.191–196.
31. *Grischenko V.I., Chub N.N., Petrushko M.P., Pinyaev V.I., Lutsкая L.I., Terpyachaya I.V., Yurchenko G.G.* Morphofunctional, cytogenetic characteristics of gametes, zygotes and embryos after exposure to hypothermia: Cryo-95. The 32-rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology. – Madison, 1995. – P.2–52.

32. *Grischenko V.I., Luts kaya L.I., Khromushkin K.N., Petrushko M.P.* Effect of low temperature preservation on human oocytes at different stage of development: Cryo-96. The 33-rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology. – Indianapolis, 1996.– P.106.
33. *Грищенко В.И., Геродес А.Г., Никитченко Ю.В., Петрушко М.П., Пиняев В.И.* Роль антиоксидантной системы фолликулярной жидкости, нативной и хранившейся при низких температурах в сохранении биологических свойств спермиев человека // Цитология. – 1999.– Т.41, №9.– С.813–814.
34. *Grishenko V.I., Pinyaev V.I., Petrushko M.P.* Co-culturing of human embryos with cumulus cells // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 1999.– Vol.16, №.3.– P.156.
35. *Gerodes A.G., Yurchenko G.G., Petrushko M.P., Todorov P.* Effect of antisperm antibodies in follicular fluid on the results of IVF: 9<sup>th</sup> International Symposium of Immunology of Reproduction. – Varna, 2000.– P.83-84.
36. *Петрушко М.П.* К вопросу о необходимости принятия статуса эмбриона: Тези доповідей міжн. симпозіуму “Біоетика на порозі III тисячоліття”.- Харків, 2000.– С.109–110.
37. *Grishenko V.I., Petrushko M.P., Gerodes A.G., Pinyaev V.I.* Application of cryopreserved biologically active fluids during embryos culturing in the IVF Program: CRYO–2001. 38<sup>th</sup> meeting of the society for cryobiology. – 2001.– P.184.
38. *Petrushko M.P., Erogo va N.N.* Trippronuclear zygotes after *in vitro* fertilization of human oocytes: Abstracts book of Conference on molecular biology and genetics. – Kyiv, 2001.– P.184.
39. *Грищенко Н.Г., Петрушко М.П., Пиняев В.И., Семенченко А.Ю.* Изучение концентрации простагландинов PG F2 $\alpha$  и PG E 2 в фолликулярной жидкости в физиологических овуляторных циклах и при лечении бесплодия в программе оплодотворения *in vitro*: 36. тез “Медицина третьего тысячоліття”. – Харків, 2001.– С.128–129.
40. *Грищенко В.И., Петрушко М.П., Геродес А.Г., Пиняев В.И.* Криоконсервированные биологически активные среды как составляющая часть среды культивирования гамет и эмбрионов *in vitro* // Проблемы криобиологии. – 2001.– №.3.– С.62.
41. *Петрушко М.П., Геродес А.Г., Никитченко Ю.В.* Биологически активные жидкости организма человека: сокультивирование с гаметами и эмбрионами человека *in vitro*: Міжнародна наук.-практ. конференція "Нові технології отримання біологічно активних речовин".- Алушта, 2002.– С.180–181.
42. *Petrushko M.P., Grishenko V.I., Erogo va N.N., Pinyaev V.I.* Cytogenetic analysis of cryopreserved human embryos: CRYO-2003. 40<sup>th</sup> meeting of the society for cryobiology. – Coimbra, 2003. – P.173.

43. Грищенко В.И., Петрушко М.П., Пиняев В.И., Ерогова Н.Н., Гурина Т.М., Луцкая Л.И. Полиплоидия бластомеров эмбрионов человека после криоконсервирования: Тези доповідей III міжнарод. наук.-практ. конференції "Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія". – Харків, 2003. – С.258.
44. Петрушко М.П., Грищенко В.И., Пиняев В.И., Ерогова Н.Н. Генетический анализ нативных и криоконсервированных эмбрионов человека // Проблемы репродукции. – 2003.– №5.– С.50.
45. Петрушко М.П. FISH-анализ нативных и криоконсервированных эмбрионов человека: Материалы международ. конференции "Сохранение генетических ресурсов" // Цитология. – 2004. – Т.46, №.9. – С.833–835.
46. Грищенко В.И., Копейка Е.Ф., Петрушко М.П. Проблемы криобиологии и сохранение генетических ресурсов: Материалы международ. конференции "Сохранение генетических ресурсов" // Цитология. – 2004.– Т.46, №.9.– С.784–785.
47. Петрушко М.П. Морфофункциональные характеристики эмбрионов человека как прогностический критерий программы ЭКО: 36. тез "Медицина третьего тысячеліття". – Харків, 2004.– С.65.
48. Grishenko V.I., Petrushko M.P., Pinyaev V.I., Erogorova N.N. Morphological characteristics and morphogenesis rate of human embryos after cryopreservation: Cryo-2004. The 41-th Annual Meeting of the Society for Cryobiology. – Beijing, 2004.– P.145.
49. Петрушко М.П. "Ошибки ЭКО" - цитогенетический аспект: Тезисы 14 международной конференции РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра" // Проблемы репродукции. – 2004.– С.113–114.
50. Petrushko M.P., Grishenko V.I., Erogorova N.N., Pinyaev V.I. Frequency of formation and total cell number of blastocyst after cryopreservation: Book of Abstracts Sero International. – Stressa, 2004.– P.5.
51. Петрушко М.П., Пиняев В.И., Ерогова Н.Н. Криоконсервирование эмбрионов человека на стадии зиготы: Материалы международ. конференции "Репродуктивные технологии сегодня и завтра".- Чебоксары, 2005. – С.38–39.
52. Петрушко М.П., Пиняев В.И., Ерогова Н.Н. Мозаицизм нативных и криоконсервированных эмбрионов человека: Тези II Українського конгресу з міжнарод. участю "Метаболічні спадкові захворювання" // Ультразвукова перинатальна діагностика.– 2005.– № 20. – С.88.
53. Петрушко М.П., Пиняев В.И., Ерогова Н.Н. Оценка состояния хроматина в бластомерах после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2005. – № 3. – С.248.

## АНОТАЦІЇ

**Петрушко М.П. Морфофункціональні, цитологічні і молекулярно-генетичні характеристики нативних і кріоконсервованих ембріонів людини. - Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2006.

У дисертаційній роботі представлена розробка принципів морфофункціонального, цитогенетичного і молекулярно-генетичного аналізів ембріонів, що включає їх морфологічні характеристики, стадію розвитку, здатності до поновлення мітозу і генетичну діагностику, які дозволяють використовувати для перенесення у порожнину матки пацієнток морфологічно і генетично повноцінні ембріони. Встановлено, що оптимальною стадією для кріоконсервування преімплантаційних ембріонів людини є зигота. Поетапне розморожування зигот у 1 – 3-ю добу перед ембріотрансфером та наступне культивування дозволяють переносити в порожнину матки ембріони різних термінів розвитку, що збільшує імовірність їх імплантації. Кріоконсервовані ембріони у порівнянні з нативними характеризуються різними темпами морфогенетичного розвитку. Після кріоконсервування ембріони демонструють прискорені темпи дроблення, що виражається в раннім формуванні бластоцисти і збільшенні загальної кількості бластомерів. Фактори кріоконсервування впливають на здатність бластоцисти до виходу з *zona pellucida*, що вимагає проведення процедури допоміжного "вилуплення", збільшують кількість патологічних станів мітозів і індують виникнення пікнотичних ядер. У преімплантаційних ембріонах людини після кріоконсервування зростає частота анеуплоїдії хромосом групи G, відбувається збільшення частоти мозаїцизму і поліплоїдії. Необхідним є проведення преімплантаційної генетичної діагностики кріоконсервованих ембріонів з метою перенесення у порожнину матки пацієнтки генетично повноцінних ембріонів.

**Ключові слова:** ембріон, кріоконсервування, 1,2-пропандіол, цитогенетичний аналіз, FISH-аналіз, хроматин.

**Петрушко М.П. Морфофункциональные, цитологические и молекулярно-генетические характеристики нативных и криоконсервированных эмбрионов человека. - Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2006.

В диссертационной работе представлена разработка принципов морфофункционального, цитологического и молекулярно-генетического анализов эмбрионов, включающая морфологические характеристики, стадию развития, способность к возобновлению митоза и

генетическую диагностику, позволяющую использовать для вспомогательных репродуктивных технологий морфологически и генетически компетентные эмбрионы. Комплексная оценка морфологических характеристик позволяет установить индивидуальные характеристики биообъекта и использовать их как биомаркеры криочувствительности эмбрионов.

В работе показано, что морфология эмбрионов до криоконсервирования позитивно коррелирует с их выживаемостью после оттаивания. В связи с этим только эмбрионы, которые относятся по морфологической оценке к первой категории качества (эмбрионы без признаков фрагментации, с бластомерами сферической формы, которые плотно прилегают один к другому, имеют светлую мелкозернистую цитоплазму, интактную *zona pellucida*), пригодны для криоконсервирования.

Установлено, что оптимальной стадией для криоконсервирования доимплантационных эмбрионов человека является зигота. Криоконсервирование эмбрионов человека, которые находятся на данной стадии, следует проводить через 20-22 ч после инсеминации. Поэтапное размораживание зигот на 1-3-и сут перед эмбриопереносом и их последующее культивирование дает возможность переносить в полость матки эмбрионы разных сроков развития, что увеличивает вероятность их имплантации. Криоконсервированные эмбрионы по сравнению с нативными характеризуются различными темпами морфогенетического развития. После криоконсервирования эмбрионы демонстрируют ускоренные темпы дробления, что выражается в раннем формировании бластоцисты и увеличении общего количества бластомеров. Факторы криоконсервирования индуцируют фрагментацию бластомеров с образованием безъядерных участков цитоплазмы, влияют на способность бластоцисты к "вылуплению" из *zona pellucida*, снижают митотический индекс последующего после криоконсервирования деления, повышают число патологических состояний митозов и индуцируют возникновение мультинуклеарных бластомеров. Молекулярно-цитогенетический анализ методом гибридизации клонированных последовательностей ДНК с метафазными и интерфазными хромосомами *in situ* позволил определить, что преимплантационные эмбрионы человека обладают высокой генетической гетерогенностью. В криоконсервированных эмбрионах возрастает частота анеуплоидии по хромосомам группы G, увеличивается частота мозаицизма и полиплоидии. Установлено, что селекция эмбрионов по состоянию хроматина бластомеров является индикатором эффективности криоконсервирования и надежным критерием функциональной активности генома бластомеров.

Факторы криоконсервирования индуцируют слияние отдельных бластомеров с образованием полиплоидных клеток. Частота возникновения полиплоидных бластомеров коррелирует со стадией развития эмбрионов. Грубые хромосомные абберации в нативных и криоконсервированных эмбрионах выявляются в виде нарушений карио- и цитокинеза: образование полимультинуклеарных бластомеров, фрагментов цитоплазматических участков

бластомеров. В связи с этим была предложена доимплантационная генетическая диагностика криоконсервированных эмбрионов.

Основным хромосомным нарушением при цитогенетическом анализе неоплодотворенных ооцитов является анеуплоидия. С увеличением количества незрелых ооцитов, полученных при пункции фолликулов яичника, увеличивается риск хромосомной патологии; с возрастом у женщины повышается нестабильность хромосомного набора репродуктивных клеток, что требует проведения дополнительного цитогенетического анализа.

Для улучшения условий культивирования преимплантационных эмбрионов *in vitro* была подобрана система сокультивирования на клетках кумулюса и гранулезы. Применение аутологических систем сокультивирования *in vitro* способствует снижению числа эмбрионов с признаками фрагментации как в нативных, так и в криоконсервированных эмбрионах в основном за счет увеличения в среде культивирования концентрации таких аминокислот, как триптофан, пролин, валин, орнитин, глутамин и лейцин. Обнаруженные эффективные антиоксидантная и антирадикальная активности фолликулярной жидкости человека и преовуляторной сыворотки крови, по-видимому, определяют их положительное действие на морфофункциональные характеристики эмбрионов человека.

**Ключевые слова:** эмбрион, криоконсервирование, 1,2-пропандиол, цитогенетический анализ, FISH-анализ, хроматин.

**Petrushko M.P. The morphofunctional, cytological and molecular genetic analysis of native and cryopreseved human embryos.** – Manuscript.

Thesis for the doctoral degree by speciality 03.00.19 –cryobiology.– Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, 2006.

This thesis describes the development of the principles of morphofunctional, cytological and molecular genetic analysis of embryos, including the taking into account their morphological characteristics, development stage, enabling to use for transfer into patients' uterus cavity of morpholohgically and genetically competent embryos. It has been found that optimal stage for cryopreservation of pre-implantation human embryos is zygote. Stepwise thawing of zygotes during the 1-3rd days before embryo transfer and their following culturing enables to transfer into uterus cavity the embryos of various gestation terms that allows to increase their implantation. Cryopreserved embryos in comparison with native ones are characterized with different rates of morphogenetic development. After cryopreservation the embryos demonstrate accelerated cleavage terms that is manifested in early formation of blastocyst and rise in total number of blastomeres. Cryopreservation factors induce blastomere fragmentation with the formation of nuclei-free cytoplasm sites, affect the blastocyst ability to "hatch" out of *zona pellucida*, increase the number of pathological state of mitoses and induce the

appearance of multinuclear blastomeres. In cryopreserved embryos the frequency of aneuploidy on chromosomes of G group increases, there is a rise in the mosaics and polyploidy frequency. In this connection it has been proposed to perform pre-implantation genetic diagnostics of cryopreserved embryos.

**Key words:** embryo, cryopreservation, 1,2-propanediol, cytogenetic analysis, FISH-analysis, chromatin.