

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

ПЕТРУШКО МАРИНА ПАВЛОВНА

УДК: 612.646:615.014.41:57.017

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ, ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
НАТИВНЫХ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ
ЧЕЛОВЕКА**

03.00.19 – криобиология

Диссертация на соискание научной степени
доктора биологических наук

Научный консультант
д.мед.н., профессор, академик НАН Украины
Валентин Иванович Грищенко

Харьков – 2006

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	9
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1. Преимплантационное развитие эмбрионов человека в условиях <i>in vitro</i> - фундаментальный и практический аспекты	19
1.2. Криоконсервирование преимплантационных эмбрионов человека и вспомогательные репродуктивные технологии	28
1.3. Новые направления в изучении структурно-функциональной организации хромосом преимплантационных эмбрионов человека	48
1.4. Повышение жизнеспособности эмбрионов человека путем применения систем сокультивирования	65
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	76
2.1. Общие методические положения	76
2.2. Объекты исследования	76
2.3. Этические аспекты исследования	76
2.4. Общая схема исследований	77
2.5. Методика экстракорпорального оплодотворения и культивирования эмбрионов <i>in vitro</i>	78
2.5.1. Выделение ооцитов из аспирата	78
2.5.2. Оценка степени зрелости ооцитов	78
2.5.3. Цитологическое исследование эякулятов	80
2.5.4. Методики выделения подвижной фракции спермиев из эякулята	82
2.5.5. Инсеминация ооцитов человека <i>in vitro</i>	82
2.5.6. Контроль оплодотворения	83
2.5.7. Сортировка эмбрионов по стадиям развития	83

2.5.8. Культивирование эмбрионов человека до стадии вылупившейся бластоцисты	84
2.5.9. Перенос эмбрионов в полость матки	85
2.6. Методы приготовления цитогенетических препаратов из преимплантационных эмбрионов человека	86
2.6.1. Приготовление препаратов для световой микроскопии	86
2.6.2. Приготовление препаратов для цитогенетического анализа хромосом	86
2.6.3. Цитогенетический анализ фиксированных препаратов методом кариотипирования	87
2.6.4. Молекулярно-генетический метод анализа хромосом с флюоресцентной гибридизацией <i>in situ</i>	87
2.6.5. Цитологический анализ фиксированных эмбрионов	89
2.7. Постановка криобиологического эксперимента	89
2.7.1. Методика эквilibрации эмбрионов с растворами криопротекторов	89
2.7.2. Методика криоконсервирования эмбрионов с использованием медленного охлаждения	90
2.7.3. Методика отогрева криоконсервированных эмбрионов	91
2.7.4. Удаление криопротекторов после оттаивания	91
2.8. Оценка жизнеспособности эмбрионов человека	91
2.8.1. Прижизненная световая микроскопия эмбрионов	91
2.8.2. Изучение состояния хроматина методом флюоресцентного окрашивания красителем Hoechst 33342	92
2.8.3. Определение конденсации нуклеарного хроматина спермиев	93
2.8.4. Качественный анализ мРНК генов <i>bcl-2</i> и <i>bax</i> в нативных и криоконсервированных преимплантационных эмбрионах	93

человека	
2.9. Сокультивирование эмбрионов человека	95
2.9.1. Получение фолликулярной жидкости и выделение клеток кумулюса и гранулезы	95
2.9.2. Получение преовуляторной сыворотки крови	96
2.10. Биохимические методы исследования	96
2.10.1. Определение концентрации общего белка в сыворотке крови	96
2.10.2. Количественное определение свободных аминокислот в сыворотке крови	96
2.10.3. Методики исследования содержания гидроперекиси липидов и антиоксидантной активности фолликулярной жидкости и преовуляторной сыворотки крови	97
2.10.4. Исследование концентрации стероидных гормонов в фолликулярной жидкости и преовуляторной сыворотке крови	99
2.11. Статистическая обработка результатов	100
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	101
3.1. Морфофункциональные характеристики нативных и криоконсервированных эмбрионов человека	101
3.1.1. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов человека после эквilibрации с растворами криопротекторов	101
3.1.2. Морфологические характеристики 4–клеточных эмбрионов человека до и после криоконсервирования	105
3.1.3. Жизнеспособность криоконсервированных преимплантационных эмбрионов человека с разной степенью	118

фрагментации цитоплазмы	
3.1.4. Роль фаз клеточного цикла и морфологии пронуклеусов в жизнеспособности нативных и криоконсервированных зигот	128
3.1.5. Скорость морфогенетического развития эмбрионов человека после криоконсервирования	134
3.1.6. Трансплантация криоконсервированных эмбрионов человека	143
3.2. Цитологический, цитогенетический и молекулярно-генетический анализ нативных и криоконсервированных эмбрионов человека	148
3.2.1. Цитологический анализ состояния митозов в эмбрионах человека после эквilibрации с растворами криопротекторов	148
3.2.2. Цитологический анализ состояния митозов в нативных и криоконсервированных эмбрионах человека	151
3.2.3. Цитогенетический анализ нативных и криоконсервированных эмбрионов человека методом кариотипирования	156
3.2.4. Молекулярно-генетический анализ эмбрионов человека методом флюоресцентной гибридизации	162
3.2.5. Оценка состояния хроматина в бластомерах эмбрионов человека до и после криоконсервирования	168
3.2.6. Многоядерность бластомеров эмбрионов человека после криоконсервирования	172
3.2.7. Молекулярно-генетический анализ экспрессии генов bcl-2 и bax в нативных и криоконсервированных эмбрионах человека	177
3.3. Вклад отцовского и материнского геномов в частоту нестабильности генетического аппарата эмбрионов человека	180

3.3.1. Цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов человека	180
3.3.2. Преждевременная конденсация хромосом спермиев в ооцитах человека, оплодотворенных <i>in vitro</i>	186
3.3.3. Оценка состояния хроматина спермиев человека	191
3.3.4. Морфофункциональные и цитогенетические характеристики зигот с аномальным количеством пронуклеусов	195
3.4. Повышение жизнеспособности нативных и криоконсервированных эмбрионов человека путем сокультивирования	204
3.4.1. Морфофункциональные характеристики нативных и криоконсервированных эмбрионов человека при сокультивировании	204
3.4.2. Биохимические характеристики биологически активных жидкостей в системе сокультивирования	209
РАЗДЕЛ 4. АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	219
ВЫВОДЫ	274
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	279
ПРИЛОЖЕНИЕ	345

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

а-ГнРг	-агонист гонадотропин-рилизинг гормона (аналог гонадолиберина)
ант-ГнРг	- антагонист гонадотропин-рилизинг гормона
АТФ	-аденозинтрифосфорная кислота
БАС	-биологически активная среда
БСА	-бычий сывороточный альбумин
ВКМ	-внутренняя клеточная масса
ВРТ	-вспомогательные репродуктивные технологии
Гн	-гонадотропные гормоны аденогипофиза
ГнРг	-гонадотропин-рилизинг гормон
ДМСО	-диметилсульфоксид
ДНК	-дезоксирибонуклеиновая кислота
Е ₂	-эстрадиол
ЖА	-жидкий азот
ЛГ	-лютеинизирующий гормон
ПГД	-преимплантационная генетическая диагностика
ПКХ	-преждевременная конденсация хроматина
ПТ	-полярное тельце
ПЦР	-полимеразная цепная реакция
ПЭ	-перенос эмбрионов
РНК	-рибонуклеиновая кислота
УЗИ	-ультразвуковое исследование
ФЖ	-фолликулярная жидкость
ФР	-факторы роста
ФСГ	-фолликулостимулирующий гормон
чХГ	-человеческий хорионический гонадотропин

ЭКО	-экстракорпоральное оплодотворение
ЭФР	-эпидермальный фактор роста
FISH	-флюоресцентная гибридизация <i>in situ</i>

ВВЕДЕНИЕ

На Украине в последнее десятилетие наметилась стойкая тенденция к депопуляции, основной причиной которой является падение рождаемости [1]. Кроме того, бесплодные браки составляют 10-35% от общего количества пар репродуктивного возраста. Поэтому для улучшения демографической ситуации важным является решение проблемы бесплодного брака [2,3].

Сейчас не вызывает сомнений, что замораживание гамет и эмбрионов, полученных после оплодотворения *in vitro*, и последующее их оттаивание для использования в целях достижения беременности у бесплодных супружеских пар имеет большое практическое значение. Такой подход к сохранению репродуктивного материала, с одной стороны, позволяет отсрочить или продолжить лечение пациентки при возникновении опасных или неясных ситуаций, например, в случаях угрозы развития тяжелой клинической картины синдрома гиперстимуляции яичников, дает возможность воздержаться от переноса эмбрионов в матку в текущем менструальном цикле и осуществить его в последующих циклах. Наибольшее значение имеет криоконсервирование эмбрионов, оставшихся после переноса в полость матки пациентки. При отсутствии беременности, эмбрионы могут быть перенесены в матку в последующих циклах, не требующих повторной стимуляции суперовуляции и получения яйцеклеток, и тем самым, повысить эффективность лечения.

Вопросы, касающиеся внедрения в практику криоконсервирования эмбрионов и их использования при лечении бесплодия, нуждаются в существенном совершенствовании, поскольку необходимо гарантировать не только

мофофункциональную, но и генетическую полноценность криоконсервированных эмбрионов.

Актуальность темы. По данным Всемирной Организации Здравоохранения попытка лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий является успешной, если в результате получена нормально развивающаяся одноплодная беременность [7]. Многоплодная беременность рассматривается как осложнение, поскольку возрастает риск преждевременных родов, рождения детей низкого веса и возникновение других медицинских, социальных и экономических проблем [8–13].

В среде специалистов идет постоянная дискуссия на предмет того, каким образом снизить риск многоплодия и в то же время увеличить основной показатель процедуры ЭКО – число рожденных живых детей. В основном рассматривается два подхода – в полость матки переносить не более одного эмбриона [14], второй – для коррекции числа плодов использовать инструментальную редукцию [15–17]. Однако в первом случае существенно снижается эффективность программы ЭКО, во-втором – возрастает риск самопроизвольного аборта [18].

Альтернативой этому может быть перенос ограниченного количества эмбрионов в стимулированном цикле с последующим криоконсервированием оставшихся эмбрионов, что, в свою очередь, предусматривает определение четких морфологических критериев эмбрионов, отражающих их высокий имплантационный потенциал и генетическую полноценность [19–20]. Предложенная альтернатива - перенос бластоцисты, не является оптимальной, поскольку в условиях *in vitro* этой стадии достигает не более 50% эмбрионов [21].

Отмечается, что для наступления беременности перенос 4-х клеточных эмбрионов наиболее благоприятен [22].

Эффективность методов криоконсервирования базируется на морфологической оценке эмбрионов после оттаивания, а именно, на учете количества неповрежденных бластомеров и степени фрагментации цитоплазмы [23, 24].

Исследования, посвященные разработке и усовершенствованию способов криоконсервирования эмбрионов, не позволили добиться высокой сохранности криоконсервированного материала. Достаточно глубоко изучены вопросы повреждения биомембран, цитоскелета, осмотические явления, возникающие в ходе криоконсервирования эмбрионов [25,26].

Научно-технический прогресс в биологии и медицине и, в первую очередь развитие репродуктивных технологий и методов генетической диагностики, позволяет на практике обеспечить профилактику врожденных аномалий развития и наследственной патологии [4–6].

В последние годы особенное значение приобретает профилактика врожденных пороков развития и наследственной патологии, поскольку их уровень в общей популяции остается высоким – по данным 2002 года - 30,7 на 1000 рожденных живыми [27, 28].

Несмотря на широкое использование методов криоконсервирования репродуктивных клеток и эмбрионов человека, еще не получено убедительных доказательств безопасности данной процедуры для их генетического аппарата. Так, описан синдром Эдвардса после переноса деконсервированных эмбрионов [29], отмечены случаи полиплоидии [30], анеуплоидии [31], мозаичных эмбрионов [32]. Наблюдения за детьми, родившимися после переноса

деконсервированных эмбрионов, не позволяют сделать окончательных выводов о безопасности данной процедуры для их физического и умственного развития [33-35].

Возникновение различного рода повреждений генетического аппарата может стать препятствием широкого использования криоконсервированных эмбрионов в методах вспомогательных репродуктивных технологий.

Все это подтверждает актуальность и необходимость исследования влияния факторов криоконсервирования на хромосомный аппарат эмбрионов человека, с целью переноса в полость матки пациенток только генетически полноценных эмбрионов.

Объектом изучения морфологических, функциональных, цитогенетических и молекулярно-генетических характеристик были выбраны преимплантационные эмбрионы человека, полученные после аспирации фолликулов и оплодотворения *in vitro* ооцитов пациенток, проходивших курс лечения бесплодия в циклах экстракорпорального оплодотворения, и не были использованы для переноса в полость матки, ввиду их избыточного количества. Эмбрионы были использованы в научной работе с письменного, свободного и информированного согласия пациентов.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа выполнялась с 2000 по 2005 гг. в рамках научных тем Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины в соответствии с направлением работы отдела криобиологии системы репродукции (№ 2.2.6.66 "Изучение механизма повышения фертильности гамет и устойчивости фетальных клеток человека и животных при действии низких температур в сочетании с другими

физическими и химическими факторами", № госрегистрации 0100U000408 и № 2.2.6. 96 "Изучение особенностей действия низких температур и гипотермии на гаметы, эмбрионы, эмбриональные клетки в зависимости от этапа гамето- и эмбриогенеза, разработка сред сохранения, криоконсервирования и репарации нелетальных криоповреждений этих биообъектов", номер государственной регистрации 0101U003480). Автор являлся ответственным исполнителем указанных тем.

Цель и задачи исследования. На основании детального анализа морфофункциональных, цитологических и молекулярно-генетических характеристик определить влияние факторов криоконсервирования на генетический аппарат преимплантационных эмбрионов человека; разработать научно обоснованные принципы комплексной оценки эмбрионов, учитывающие морфологические характеристики, стадию клеточного цикла, способностью к возобновлению митоза, скорость морфогенетических процессов и результаты преимплантационной генетической диагностики для их использования во вспомогательных репродуктивных технологиях при лечении бесплодия.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие *задачи*.

1. Разработать принципы оценки состояния эмбрионов до и после криоконсервирования и использовать их как биомаркеры криоустойчивости;
2. Определить эффективность криоконсервирования эмбрионов человека, которые находятся на разных стадиях преимплантационного развития;

3. Провести сравнительный анализ жизнеспособности зигот, находящихся в разных фазах клеточного цикла;
4. Сравнить скорость морфогенетического развития нативных и криоконсервированных преимплантационных эмбрионов человека;
5. Выяснить состояние митозов в бластомерах эмбрионов человека до и после воздействия факторов криоконсервирования;
6. Провести цито- и молекулярно-генетический анализ нативных и криоконсервированных эмбрионов человека с целью выявления влияния факторов криоконсервирования на их генетический аппарат;
7. Провести цитогенетический анализ ооцитов и спермиев для определения вклада отцовского и материнского геномов в общую частоту хромосомной нестабильности эмбрионов;
8. Повысить жизнеспособность преимплантационных эмбрионов человека путем использования систем сокультивирования с преовуляторной сывороткой крови пациентки, фолликулярной жидкостью, клетками кумулюса и гранулезы.

Объект исследования. Процессы повреждения генетического аппарата преимплантационных эмбрионов человека в ходе криоконсервирования и их взаимосвязь с морфологической и функциональной целостностью эмбрионов человека, культивируемых *in vitro*.

Предмет исследования. Морфофункциональные, цитологические и молекулярно-генетические характеристики эмбрионов человека, находящихся на разных стадиях преимплантационного развития.

Научная новизна полученных результатов. Впервые глубоко исследованы морфофункциональные характеристики эмбрионов человека, находящихся на разных стадиях морфогенеза, определены оптимальный срок развития и морфологические параметры эмбрионов для криоконсервирования.

Впервые изучена скорость морфогенетического развития эмбрионов человека после криоконсервирования. При этом выявлено, что оценка жизнеспособности, основанная только на морфологических параметрах и темпах дробления *in vitro*, является недостаточной, поскольку не учитывает влияния факторов криоконсервирования на генетический аппарат эмбрионов. Поэтому важным является изучение генетической полноценности криоконсервированных эмбрионов с привлечением цитогенетических и молекулярно-генетических исследований. Впервые показано, что факторы криоконсервирования снижают митотический индекс последующего после криоконсервирования деления дробления, увеличивают количество патологических состояний митозов и индуцируют возникновение пикнотических ядер. В преимплантационных эмбрионах человека после криоконсервирования возрастает частота анеуплоидий хромосом группы G, увеличивается частота мозаицизма и полиплоидии. Убедительно продемонстрировано, что грубые хромосомные абберации в нативных и криоконсервированных эмбрионах выявляются в виде нарушений карио- и цитокинеза: образование полимультиплеклярных бластомеров, фрагментов бластомеров, которые содержат неравномерные массы хроматина.

Доказана необходимость изучения вклада отцовского и материнского геномов в частоту хромосомной нестабильности преимплантационных эмбрионов.

Впервые показана эффективность сокультивирования с биологически активными жидкостями, клетками кумулюса и гранулезы для повышения жизнеспособности деконсервированных эмбрионов человека.

Практическое значение полученных результатов.

Морфологическая и генетическая оценка криоконсервированных эмбрионов, изучение скорости морфогенетического развития – гарантия переноса в полость матки пациентки полноценных эмбрионов. Поэтому предложенные методики могут быть рекомендованы для лечебных учреждений, применяющих методы вспомогательных репродуктивных технологий, а также в научных институтах, которые исследуют преимплантационное развитие эмбрионов.

Материалы диссертационного исследования используются в учебном процессе кафедры медицинской биологии, генетики и паразитологии Харьковского медицинского университета, кафедры генетики Львовского государственного университета им. И.Франко, на кафедре химии и биохимии Харьковской зооветеринарной Академии, в Центре репродукции человека «Имплант» г.Харьков, в клиниках по лечению бесплодия «Надия», г.Киев, «Интерсоно», г.Львов.

Личный вклад соискателя. Вынесенные на защиту положения и результаты получены диссертантом лично. Работы, которые относятся к теме диссертационной работы, опубликованы в соавторстве с научным консультантом темы академиком НАН Украины В.И.Грищенко и другими сотрудниками отдела криобиологии системы репродукции, отражают результаты общего

планирования и проведения экспериментов, анализ полученных результатов и подготовку материалов в печать. Сформулированы основные положения и сделаны окончательные выводы диссертации. В опубликованных совместно с соавторами работах личный вклад соискателя состоит :

- в работах [1-6, глава 3.1] в самостоятельном проведении культивирования нативных и криоконсервированных эмбрионов и их морфофункциональном анализе, участии при обсуждении результатов и вынесении окончательных выводов;
- в работах [1-3, глава 3.2] в выполнении цитогенетических и молекулярно-генетических исследований, интерпретации, статистической обработке и обобщении полученных данных;
- в работах [1-3, глава 3.3] в проведении цитогенетического анализа неоплодотворенных ооцитов, изучении процессов конденсации хроматина спермиев;
- в работах [1-6, глава 3.4] в подборе систем сокультивирования эмбрионов человека.

Апробация результатов диссертации. О результатах исследований было проинформировано на научных форумах: 33-м (Испания, 1996 г.), 38-м (Шотландия, 2001 г.), 40-м (Португалия, 2003 г.), 41-м (Китай, 2004 г.); ежегодных Международных съездах общества криобиологии; на симпозиуме с международным участием "Бесплодие. Вспомогательные Репродуктивные технологии" (Киев, 1995, 1997, 1999, 2000 гг.), съезде украинского Научного общества криобиологов (Харьков, 1995, 1998, 2001, 2003 гг.), на Международном симпозиуме "Биоэтика на пороге третьего тысячелетия" (2000 г.), III Парнасовской конференции (Львов, 2000г.); конференции молодых ученых "Медицина третьего тысячелетия"

(Харьков, 2001, 2002 гг.); конференции общества молекулярной биологии и генетики (Киев, 2001 г.); научно-практической конференции Ассоциации репродуктивной медицины Украины с международным участием (Киев, 2002, 2003 гг.), V (Адлер, 1995 г.), VI (Санкт-Петербург, 1996 г.), VII (Сочи, 1997 г.), XI (Самара, 2002 г.), XII (Санкт-Петербург, 2003 г.), XIV (Самара, 2004 г.) и XV (Чебоксары, 2005 г.) Международных конференциях Российской Ассоциации Репродукции Человека "Репродуктивные технологии сегодня и завтра", а так же на Международной конференции "Сохранение генетических ресурсов" (Санкт-Петербург, 2004 г.).

Публикации. Основные положения диссертации изложены в 53-х научных работах: в научных профильных изданиях – 17, статьях зарубежной печати – 4, статьях сборников научных трудов – 7, тезисах докладов на научных форумах – 23 (21 из них - на международных). Получено 2 патента Украины на изобретение.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Преимплантационное развитие эмбрионов человека в условиях *in vitro* - фундаментальный и практический аспекты

Существенный прогресс в понимании тонких механизмов раннего эмбриогенеза человека был достигнут с внедрением вспомогательных репродуктивных технологий, в число которых входят методы оплодотворения ооцитов *in vitro*, культивирование эмбрионов, интрацитоплазматическая инъекция спермия в ооцит, преимплантационная генетическая диагностика.

Частота наступления беременности в программах ВРТ составляет не более 30% [36,37]. Это связано, по-видимому, с чрезвычайной сложностью каждого из этапов программы. Важную роль в эффективности лечения данными методами занимает этап культивирования эмбрионов *in vitro*.

У человека преимплантационный период продолжается 5-6 дней и начинается с момента оплодотворения (табл. 1.1). Ооцит человека окружен внеклеточной оболочкой – *zona pellucida*, состоящей из трех гликопротеинов: ZP1, ZP2, ZP3. Она играет важную роль в процессах оплодотворения, так как на ее поверхности расположены видоспецифические рецепторы узнавания и связывания со сперматозоидами, выполняет защитную функцию, ограждая и предохраняя эмбрион во время его прохождения по маточным трубам [38].

Ооциты человека овулируют, находясь на стадии метафазы второго деления созревания. За несколько часов до овуляции ядро ооцита теряет оболочку и превращается в плотную хроматиновую массу, которая быстро движется к периферии ооплазмы. Уже через 5-10 мин после проникновения спермия в ооплазму мейотические хромосомы ооцита проходят стадию анафазы, а через 75 мин - телофазы. Уже через 10 мин после попадания спермия в ооцит в нем становятся видимыми морфологические изменения. Они сводятся к постепенной утрате четкости контуров, увеличению размеров, отделению перфораториума и появлению мелких ядрышкоподобных гранул. Трансформация спермия в мужской пронуклеус завершается на стадии анафазы и телофазы второго мейотического деления ооцита [39]. Образование женского пронуклеуса начинается после выделения второго полярного тела. G1- фаза начинается с момента выделения второго полярного тела и завершения второго мейотического деления (примерно через 3 ч после инсеминации). Фаза G1 длится 6 ч. Данные о начале синтеза ДНК и его продолжительности весьма скудны. Пожалуй, единственная работа, посвященная этой проблеме, описывает, что синтез ДНК (фаза S) начинается через 9-10 ч после инсеминации [40]. В это время наблюдается активный рост пронуклеусов. При этом развитие мужского пронуклеуса происходит быстрее женского [41]. В отличие от других млекопитающих, у человека, пронуклеусы имеют одинаковую величину. Завершается синтез ДНК через 17-18 ч после инсеминации. Вскоре после завершения синтеза ДНК, пронуклеусы сближаются в центре ооплазмы, однако их полного слияния не происходит. Примерно за 30 мин до кариогамии пронуклеусы утрачивают мелкие ядрышки и несколько уменьшаются в размерах. Кариогамия происходит в то время, когда хромосомный материал в обоих пронуклеусах находится

на стадии профазы [42]. Полный клеточный цикл заканчивается через 24-26 ч после инсеминации.

Таблица 1.1

Временная характеристика различных стадий развития преимплантационных эмбрионов человека

Стадия развития	Часы после оплодотворения $M \pm m$
Первый клеточный цикл (1-клеточная стадия)	$2,2 \pm 0,1$
Период G1	$3,8 \pm 0,2$
Выделение второго ПТ	$7,6 \pm 0,6$
Период S	$9,8 \pm 0,9$
Период G2/M	$10,7 \pm 0,8$
Второй клеточный цикл (2–клеточная стадия)	$34,9 \pm 1,9$
Третий клеточный цикл (4–клеточная стадия)	$51,2 \pm 1,9$
Четвертый клеточный цикл (8–клеточная стадия)	$67,9 \pm 2,5$
Пятый клеточный цикл (16–клеточная стадия)	$84,6 \pm 3,4$
Шестой клеточный цикл (32–клеточная стадия)	$100,2 \pm 3,0$
Последующие клеточные циклы (полностью сформировавшаяся бластоциста)	$112,7 \pm 3,8$

Первый клеточный цикл является самым длинным и занимает около 24 ч. Впоследствии бластомеры могут делиться асинхронно, образуя стадии 3 – 5-ти и более бластомеров. Длительность цикла сокращается до 18 ч. В течение митотического деления зиготы, называемого дроблением, эмбрион не растет и размер эмбриональных клеток постепенно уменьшается, приближаясь к размеру соматических клеток организма. Бластомеры представляют собой круглые, изначально идентичные по структуре, биохимии и потенциалу развития клетки. Они обладают важным свойством – тотипотентностью, то есть способностью образовывать любые клетки организма. Однако это свойство исчезает после 4–8-клеточной стадии, так как бластомеры приобретают специализацию [43]. Второй клеточный цикл начинается с окончанием первого митотического деления. Наличие эмбрионов с ускоренным темпом дробления является прогностическим критерием в исходе программы ЭКО [44]. Описано наличие десмосомоподобных соединений между бластомерами и специфическое расположение цитоплазматических органелл [45]. В течение четырех клеточных циклов форма и размеры зародыша не меняются, что обусловлено сохранением блестящей оболочки. При достижении 16- клеточной стадии зародыш становится морулой. Последующая стадия характеризуется превращением морулы в бластоцисту.

После стадии 8–ми бластомеров зародыш претерпевает важные изменения, называемые компактизацией. Компактизация характеризуется изменением структуры и свойств цитоплазматических мембран [46]. Отдельные бластомеры становятся неотличимы друг от друга, и их упаковка становится очень компактной. Эти перестройки в цитоструктуре совпадают со значительными изменениями в ультраструктуре цитоплазмы и

цитоплазматических органелл [47]. В результате компактизации возникают поляризованные бластомеры, которые делятся симметрично или асимметрично, давая две полярные или одну полярную, а другую аполярную дочерние клетки в течение следующих двух клеточных циклов. В результате возникают две популяции клеток: наружная полярная и внутренняя аполярная. Аполярные полюса клеток после деления всегда оказываются снаружи, они являются инструктивными для глобальной реорганизации клеток в поляризованный фенотип. В дальнейшем полярные клетки дают трофэктодерму, а аполярные – внутреннюю клеточную массу. В трофэктодермальном клоне появляются плотные соединения, необходимые для направленного транспорта жидкости во время образования бластоцеля. Компактизация включает в себя и другие значительные изменения в ультраструктуре слоя трофобластных клеток. В корковой зоне бластомеров происходит перераспределение клеточного скелета, выражающееся в том, что в точках контакта параллельно мембране располагаются микротрубочки. Их функцией может быть стабилизация и укрепление мембраны. Образование микротрубочек является необходимым компонентом компактизации. Кроме того, при образовании плотных соединений были обнаружены модификации мембран. Десмосомы бластоцисты между соседними клетками трофобласта очень сложны, связаны с микрофиламентами и поддерживают структуру зародыша [48].

Межклеточная адгезия – обязательное условие формирования бластоцист [49]. Компактизация ведет к тому, что после четвертого клеточного цикла в зародыше млекопитающих появляются две принципиально разные популяции бластомеров - "внутренние" и "внешние" - и возрастает "радиальная" асимметрия эмбриона [50].

Асинхронность деления к этому времени возрастает до 4 ч. На этой стадии между бластомерами появляются плотные соединения - десмосомы. Происходят модификации в структуре и свойствах трофэктодермы, включающие синтез поверхностных гликопротеинов, появление систем мембранного транспорта и изменения в метаболизме липидов клеточных мембран [51].

В последнее время в литературе появились данные о том, что традиционная схема контроля оплодотворения по наличию пронуклеусов через 18 ч после инсеминации ооцитов, с последующим прижизненным наблюдением за развитием эмбриона через 24 и 48 ч, позволяет достаточно надежно выявить различия в темпах дробления эмбрионов в культуре. Показано, что уже через 25 ч после инсеминации в культуре можно наблюдать появление эмбрионов на стадии 2-х бластомеров. Эти эмбрионы, названные авторами «эмбрионами с ранним дроблением», при последующем переносе имплантируются чаще, чем те, у которых дробление начинается позднее [52].

В отличие от некоторых других видов млекопитающих (кролик, свинья), бластоциста человека не претерпевает значительного увеличения в размерах [53, 54].

Дифференцировка зародыша млекопитающих сопровождается значительными изменениями его ультраструктуры, причем многие изменения цитоплазмы и органелл отражают растущую сложность обмена веществ зародыша. Некоторые цитоплазматические структуры унаследованы от яйцеклетки и представляют собой запасы РНК и белков матери, но они быстро исчезают во время дробления [55].

Возрастная гетерогенность эмбрионов объясняется асинхронностью оплодотворения, а вариации стадий клеточного цикла, по-видимому, связаны с внутренними генетическими

различиями между бластомерами. Примерно к 120 ч при культивировании *in vitro* зародыш "вылупляется" из блестящей оболочки, готовый к имплантации [56]. Процесс "вылупления" осуществляется за счет трипсиноподобных протеолитических ферментов, выделяемых клетками трофобластической оболочки, а также благодаря дальнейшему увеличению бластоцеля.

За низкую частоту имплантации эмбрионов после ЭКО-ПЭ отвечает ряд факторов, включая отсутствие естественного «вылупления» («хэтчинга») у переносимых эмбрионов. Показано, что рассечение *zona pellucida* ведет как к более раннему «вылуплению», так и к увеличению его частоты у бластоцист, культивируемых *in vitro*. Также было отмечено, что после переноса эмбрионов, полученных при помощи вспомогательного оплодотворения (частичное рассечение зоны), частота имплантации выше [57].

Однако «хэтчинг» не оказал существенного влияния на исход циклов ICSI в плане как частоты наступления беременности (30% против 32,0% в контроле) и частоты имплантации (8,5% против 13,5% в контроле). Тем не менее, в группе женщин старше 35 лет применение вспомогательного «вылупления» на эмбрионах, полученных после ICSI, значительно увеличило частоту наступления клинической беременности и частоту имплантации (35,5 и 10,3% соответственно против 11,1 и 3,1% в контроле) [58].

Проспективное исследование о влиянии «хэтчинга» на частоту имплантации в различных группах пациенток показало, что наибольшая эффективность была выявлена у пациенток старше 41 года, имеющих 3 неудачные попытки переноса эмбрионов. Отмечено, что несколько повторных неудачных попыток переноса эмбрионов не является показанием к его выполнению. А у пациенток моложе 36 лет данная процедура даже может снизить частоту имплантации [59].

Следует отметить, что «хэтчинг» не оказал существенного влияния на исход циклов ЭКО-ПЭ даже в группе женщин старше 38 лет. В общей сложности 839 эмбрионам от 211 пациенток была проведена данная процедура. Контролем служили 540 эмбрионов, которые перенесли 174 пациенткам. Частота наступления беременности составила соответственно 8,9 и 5,1%, а частота имплантации - 3,75 и 3,55%. Частота рожденных живых детей практически не различалась - 3,8% в группе с проведенным «хэтчингом» и 3,4% в контроле [60].

Существенной особенностью развития эмбрионов человека является то, что, начиная с самых первых стадий, развитие идет не под жестким контролем материнских факторов ооплазмы, а целиком зависит от генома эмбриона [61]. Накапливающиеся в течение оогенеза продукты обеспечивают нормальный ход оплодотворения и последующие дробления зиготы, вплоть до момента включения эмбрионального генома.

Следует отметить, что эмбрионы человека в преимплантационном периоде характеризуются высоким уровнем апоптоза. Он может затрагивать как отдельные бластомеры, так и все клетки эмбриона, приводя к нарушению процессов развития и имплантации. Генотип эмбрионов определяет их морфологию и потенциал развития, но также контролирует вероятность развития запрограммированной клеточной гибели в одном или нескольких бластомерах.

О высокой чувствительности развивающихся эмбрионов к повреждающим экзо- и эндогенным воздействиям свидетельствует тот факт, что большое число эмбрионов человека останавливается на различных стадиях преимплантационного развития как *in vitro*, так и *in vivo*.

Считают, что в ооцитах после овуляции апоптоз является механизмом элиминации и предотвращения оплодотворения клеток, несущих хромосомные дефекты [62]. Установлено, что анеуплоидия клеток инициирует развитие апоптоза. Вместе с тем при этом хромосомном нарушении эмбрион может остановиться в развитии и без активации апоптоза, вероятно, вследствие нарушения баланса в синтезе мРНК, а впоследствии и в синтезе белков, что нарушает процессы пролиферации и дифференцировки [63]. У многих эмбрионов постфертилизационная анеуплоидия возникает в течение первых митотических делений клеток.

Несмотря на неясность механизмов влияния анеуплоидии на жизнеспособность эмбрионов, она, по мнению некоторых авторов, может быть индикатором развития клеточной гибели, поскольку часто сочетается с выраженной фрагментацией бластомеров, причинами которой считают недостаточное количество ряда цитоплазматических факторов в бластомерах (мРНК, ферменты, структурные белки), наличие дисфункции митохондрий, нарушение активности транскрипционных факторов или белков, регулирующих клеточный цикл [64].

Поскольку изменения такого рода напрямую влияют на качество развивающегося эмбриона и, в дальнейшем, плода, изучение роли факторов, влияющих на процессы апоптоза в преимплантационном эмбриогенезе, становится одной из наиболее актуальных тем проблем теоретической и прикладной эмбриологии и репродуктивной медицины.

Таким образом, благодаря широкому внедрению в последнее десятилетие технологии экстракорпорального оплодотворения ооцитов человека и культивирования *in vitro* удалось изучить раннее развитие эмбрионов человека, которое представляет собой сложное,

хорошо скоординированное единство таких процессов, как деление клеток, их миграция, взаимодействие, генная регуляция и дифференциация. Какое-либо воздействие, нарушающее эти процессы, может оказать негативное влияние на развитие эмбриона.

1.2. Криоконсервирование преимплантационных эмбрионов человека и вспомогательные репродуктивные технологии

Метод индукции суперовуляции с последующим оплодотворением ооцитов позволяет получать преимплантационные эмбрионы человека и изучать особенности их развития *in vitro* [65]. В результате применения индукторов суперовуляции стало возможным аспирировать не единичные ооциты, как при естественной овуляции, а получать гораздо большее их количество [66]. Усовершенствование эмбриологического этапа увеличило частоту оплодотворения, тем самым появилась возможность получать эмбрионов больше, чем необходимо для переноса в полость матки пациентки.

Криоконсервирование эмбрионов человека открыло новые преимущества в циклах лечения бесплодия методом ЭКО [67–69].

Во-первых, в лечебном цикле, как правило, в полость матки пациентки переносят 3-4 эмбриона. При переносе большего количества эмбрионов возрастает риск многоплодной беременности. Оставшиеся эмбрионы в условиях *in vitro* остаются жизнеспособными 6-7 суток и, достигая стадии экспандированной бластоцисты, погибают. Применение криоконсервирования позволило использовать эмбрионы, при необходимости, в следующих менструальных циклах, без применения гормональной стимуляции [70, 71].

Естественный менструальный цикл контролируется с помощью ультразвукового и гормонального мониторинга, и в соответствующее время эмбрионы переносятся в матку. Использование криоконсервированных эмбрионов, во-первых, снижает количество врачебных манипуляций, время пребывания в лечебном учреждении и стоимость процедуры. Во-вторых, в случае, когда в лечебном цикле переносить полученные эмбрионы в полость матки пациентки является заведомо неэффективным (например, при синдроме гиперстимуляции яичников, незрелости эндометрия). Одной из проблем в технике ведения пациенток, взятых в цикл лечения бесплодия методом ЭКО, является трудность ведения лютеиновой фазы после введения экзогенных менопаузального и хорионического гонадотропинов. Большое содержание чХГ или прогестерона вызывает искусственную лютеиновую фазу, несовместимую с ростом плода криоконсервирование эмбрионов позволяет производить перенос эмбрионов в любом следующем цикле, при котором нормализуется эндокринный статус женщины [72]. В-третьих, криоконсервирование эмбрионов открывает новые возможности в методах эмбриодонации и суррогатного материнства [73].

Первая беременность после переноса деконсервированного эмбриона была получена в 1983 году [74]. Появились сообщения о получении многоплодных беременностей, так в 1995 году впервые после переноса трех эмбрионов была диагностирована монохориальная триамниотическая беременность, закончившаяся рождением трех здоровых нормальных мальчиков [75], а в 1998 - была получена пятиплодная беременность [76]. Особый интерес представляет работа о рождении ребенка после двойного криоконсервирования ооцита и эмбриона на стадии пронуклеусов [77]. Средняя эффективность метода криоконсервирования

определяется по частоте наступления беременности и составляет по данным различных центров от 11 [78,79] до 37 % [80].

Созданию способов криоконсервирования эмбрионов человека предшествовал большой цикл теоретических и экспериментальных исследований, проведенных, как представителями зарубежных школ (Mazur, Leibo, Wittingham), так и харьковской школой криобиологов (Бугров О.Д., Грищенко В.И., Катков И.И., Осташко Ф.И., Пушкарь Н.С., Смирнов И.В.), посвященных изучению проницаемости цитоплазматической мембраны клеток для воды, ионов, криопротекторов, позволивший на этой основе обосновать состав криоконсерванта, способы его добавления к эмбрионам, параметры эквilibрации, режима охлаждения и отогрева [81–87].

Повреждение эмбриона при замораживании происходит в основном, не во время хранения, а в течение процесса охлаждения или размораживания. Повреждения чаще всего происходят в связи с формированием внутри клеток кристаллов льда, или изменением осмотического давления в результате потери воды из клетки [88].

После инициации кристаллизации и начального роста кристаллов температура повышается к точке плавления и остается относительно постоянной при этой температуре в течение последующей стадии формирования льда (латентное плато высокой температуры), затем температура быстро изменяется до температуры окружающей среды.

Управляемая инициация кристаллизации в процессе замораживания является ключевым фактором для обеспечения выживаемости эмбрионов после криоконсервирования. В ряде экспериментов, образцы, в которых кристаллизация была инициирована ниже - 9°C имели низкую жизнеспособность, однако образцы с инициацией кристаллизации при более высоких

температурах от -5°C до $-7,5^{\circ}\text{C}$ имели намного более высокий процент выживаемости эмбрионов [89]. Анализ самопроизвольного процесса кристаллизации в соломинке демонстрирует, что, если кристаллизация не управляется, выживаемость эмбрионов будет очень низкой. Физический смысл этого явления становится ясным при изучении изменений температуры в образце в процессе замораживания. В норме, соломинку охлаждают примерно до -7°C и оставляют при этой температуре для стабилизации, затем проводят инициацию кристаллизации, дотрагиваясь до наружного конца соломинки охлажденным в жидком азоте предметом. Температура в соломинке повышается до точки плавления и затем, после завершения формирования кристаллов, снижается со скоростью $2,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -7°C . Дегидратация клетки происходит в течение последующего медленного охлаждения. Соломинка, в которой не проводилась управляемая кристаллизация, может переохлаждаться до -15°C , при этом так же происходит повышение температуры и, затем, после завершения самопроизвольной кристаллизации, падение температуры со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -15°C . Комбинация высокой скорости охлаждения и большого снижения температуры не позволяет произойти дегидратации клетки и поэтому неизбежно формирование внутриклеточных кристаллов, приводящее к гибели клетки. В последнее время экспериментаторами уделяется внимание не только выбору оптимальной температуры кристаллизации, но и определению временного интервала стабилизации, поскольку это может существенным образом повлиять на результативность криоконсервирования [90].

Существует несколько основных способов глубокого замораживания эмбрионов: медленное, быстрое охлаждение и витрификация [91].

Достижения в области криоконсервирования эмбрионов связаны с открытием и дальнейшим развитием представления о защитных веществах – криопротекторах. К криопротекторам относятся компоненты синтетических сред, играющие роль стабилизаторов воды и способствующие предотвращению или уменьшению изменений, наступающих при замораживании биологических объектов.

В соответствии с характером взаимодействия с биологическими объектами, криопротекторы делятся на эндоцеллюлярные (ДМСО, 1,2-пропандиол, этиленгликоль, глицерин) и экзоцеллюлярные (сахароза, глюкоза, амид, фиколл, протеины и липопротеины). Эндоцеллюлярные или проникающие криопротекторы снижают точку замерзания раствора, взаимодействуют с мембранными структурами клетки, предотвращают высокие концентрации внутри- и внеклеточных электролитов, частично замещая воду [92].

Непроникающие криопротекторы увеличивают осмотический градиент, благодаря которому происходит дегидратация клетки перед процедурой охлаждения. Кроме того, механизм действия экзоцеллюлярных криопротекторов объясняется способностью связывания значительной части свободной воды и уменьшением повреждений кристаллами льда.

На сегодняшний день нет единого мнения в выборе криопротектора. Считают, что осмотический шок эмбрионов при использовании этиленгликоля и пропандиола будет минимальным, ввиду низкой молекулярной массы данных веществ – 62,07 г/моль и 76,10 г/моль, соответственно [93]. Интересным является тот факт, что разные стадии эмбрионов млекопитающих, проявляют различную криоустойчивость при применении различных криопротекторов. Так,

для стадии зиготы оптимальным является добавление в среду эквивилибрации 1,5М раствора 1,2-пропандиола [94], а для стадии 4-х бластомеров показана эффективность применения 1,5М раствора этиленгликоля [95].

Скорость охлаждения эмбрионов зависит от состава и проницаемости клеточной мембраны для воды, соотношения объема клетки к площади поверхности и разницы осмотического давления по обе стороны мембраны.

Стандартным методом криоконсервирования эмбрионов человека остается метод медленного охлаждения по специальным программам, с использованием, как правило, проникающих криопротекторов [96]. Использование этого метода может обеспечить высокую степень дегидратации клеток, что позволяет устранить вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда. Эмбрионы человека криоконсервируют в средах, предназначенных для культивирования гамет и эмбрионов человека в условиях *in vitro*. Криопротектором служит преимущественно ДМСО или 1,2-ПД. Эмбрионы последовательно помещают в серию растворов с увеличивающейся концентрацией криопротекторов. Охлаждение производят от комнатной температуры со скоростью 1-2°C/мин. Вблизи точки депрессии создается значительное переохлаждение, что требует инициирования кристаллизации, которое производят при температуре 6–7°C. Установлено, что внутриклеточное образование льда в эмбрионах происходит интенсивно в интервале температур –30–50°C, поэтому последующее охлаждение производится очень медленно (0,2–0,5°C /мин). После достижения температуры –50°C скорость увеличивают до 1°C/мин. При –150°C эмбрионы переносят в жидкий азот [97].

Для жизнедеятельности эмбрионов не менее важен процесс оттаивания. Преимущественно используется высокая скорость отогрева, поскольку при медленном оттаивании эмбрионы погибают, вследствие развития внутриклеточной рекристаллизации.

Следующим важным этапом является удаление криопротектора, что достигается путем последовательного помещения эмбрионов в растворы с уменьшающейся концентрацией криопротекторов.

Одной из основных причин повреждения при замораживании и оттаивании является образование кристаллов льда внутри клетки. Главная задача, которую нужно решить при замораживании, заключается, поэтому, в обезвоживании клетки. Однако, удаление слишком большого количества воды также губительно для нее. Точка замерзания воды, содержащей различные ионы, находится ниже 0°C и зависит от концентрации растворенных веществ. При замораживании клетки часть молекул воды в ней начинает кристаллизоваться, и это еще больше повышает концентрацию раствора, что в свою очередь снижает точку замораживания. Возрастание осмотического давления является также губительным для клетки [98].

Температура, при которой заканчивается медленное замораживание и материал переносится в жидкий азот, влияет на степень дегидратации клеток. Так, клетки, охлажденные медленно до температуры -60°C имеют высокую степень дегидратации и требуют медленного оттаивания ($8-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) с целью обеспечения адекватной регидратации. Наоборот, клетки, охлажденные медленно только до -30°C , необходимо оттаивать быстро ($275-500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). При оттаивании клеток фактически решают две задачи - это регидратация клетки и удаление криопротектора, находящегося в клетке. Чтобы избежать осмотического шока от быстрой

регидратации, размороженный эмбрион помещается поэтапно в несколько растворов, содержащих все более низкие концентрации криопротектора.

В зависимости от интенсивности поражения, его длительности и характера судьба клетки может быть различна. Измененные в результате повреждения клетки могут адаптироваться к повреждающему фактору, репарировать повреждения, реактивироваться после снятия повреждающего воздействия или измениться необратимо и погибнуть. Исходя из этого, функциональные и морфологические картины клеток в этих состояниях, очень разнообразны. На различные факторы при обратимом повреждении клетки отвечают рядом изменений. Проявлением общеклеточной реакции на повреждение является изменение способности клетки связывать различные красители. Так, нормальные клетки, поглощая из внеклеточной среды растворенные в ней красители, откладывают их в виде гранул. Такое гранулообразование происходит в цитоплазме, ядро при этом остается бесцветным. При повреждении клеток многими физическими или химическими факторами гранулообразование прекращается, цитоплазма и ядро диффузно окрашиваются, проникшим в клетку красителем. Если действие фактора обратимо и при устранении его клетка возвращается к норме, то снова восстанавливается ее способность к гранулообразованию. При различных повреждениях клеток значительно падает окислительное фосфорилирование: прекращается синтез АТФ и растет потребление кислорода. Для поврежденных клеток характерно усиление гликолитических процессов, падение количества АТФ, активация протеолиза [99].

К наиболее часто встречающимся изменениям ядерной оболочки относятся расширение перинуклеарного пространства,

извитость ее контура, что нередко сочетается с пикнозом ядра. На ранних этапах повреждения клетки часто приобретают шаровидную форму и теряют многочисленные клеточные выросты и микроворсинки. При серьезных повреждениях, изменения плазмолеммы сводятся к появлению на поверхности клеток различных выростов или мелких пузырей. На начальных стадиях нарушения окислительного фосфорилирования происходит сжатие митохондриального матрикса и некоторое расширение межмембранного пространства. В дальнейшем этот тип реакции митохондрий может смениться их набуханием, что особенно часто встречается при самых различных патологических изменениях клеток. Митохондрии при этом принимают сферическую форму и увеличиваются в размерах, происходит обводнение матрикса, он становится светлым. Система эндоплазматического ретикулума чаще всего подвергается вакуолизации и распаду на мелкие пузырьки. При этом на мембранах гранулярного ретикулума уменьшается число рибосом, что однозначно указывает на падение белкового синтеза. Цистерны комплекса Гольджи также могут увеличиваться в объеме или распадаться на мелкие вакуоли. В поврежденных клетках происходит активация их лизосом, увеличивается число аутофагосом. При тяжелых клеточных повреждениях мембраны лизосом разрываются и лизосомные гидролазы начинают разрушать сами клетки — происходит лизис [100].

У поврежденных клеток резко снижается митотическая активность, часто происходит задержка на разных стадиях митоза главным образом из-за нарушения митотического аппарата, очень чувствительного к изменениям внутриклеточной среды [101]. Наиболее чувствителен к повреждающему действию криоконсервирования цитоскелет ооцитов [102].

Развитие процесса повреждения клеток может остановиться после окончания неблагоприятного воздействия. Если изменения в клетке не зашли слишком далеко, происходит репарация клеточных повреждений, возврат клетки к нормальному функциональному уровню. Так, в ряде случаев, повреждения клеток, связанные с набуханием митохондрий и с фрагментацией эндоплазматического ретикулума, оказываются обратимыми [103].

В последнее десятилетие было предпринято много попыток модернизации общепринятого метода криоконсервирования эмбрионов человека [104], с целью повышения его эффективности и упрощения ряда процедур.

Большие надежды возлагаются на разрабатываемый в настоящее время метод сверхбыстрого замораживания. Этот подход получил значительное развитие и, возможно, в ближайшие годы, он будет приобретать все большее значение в репродуктивных технологиях. Метод требует высоких концентраций хорошо проникающего сквозь мембрану криопротектора в сочетании с малопроницающими, для дегидратации клеток. Большинство работ по сверхбыстрому замораживанию выполнены на зародышах мышей. Интересна в данном аспекте работа, выполненная на 1582 преимплантационных эмбрионах человека. На достаточно большом экспериментальном материале авторы демонстрируют, что, несмотря на использование высокой концентрации криопротектора (3,5М ДМСО), выживаемость эмбрионов составила 65%. Обращает на себя внимание низкая частота наступления беременности после переноса деконсервированных эмбрионов (11%) и высокая частота абортированных плодов (до 20%). К сожалению, в работе не представлены данные о хромосомном анализе абортусов, что не

позволяет делать какие-либо выводы о влиянии факторов криоконсервирования на их генетический аппарат[105].

На сегодняшний день не существует общепринятых схем замораживания эмбрионов человека сверхбыстрым методом. Продолжается поиск криопротекторов, определение их оптимальных концентраций, условий эквilibрации и выведения из клетки, подбор режимов охлаждения-оттаивания. В литературе встречается множество публикаций по сверхбыстрому замораживанию эмбрионов мыши, в которых в основном, в качестве криопротекторов использовали растворы глицерина и сахарозы. Время пребывания зародышей в растворах варьировало от 1 до 20 мин. Противоречивы и результаты, полученные разными школами, что затрудняет анализ эффективности данного способа криоконсервирования. Так, при использовании аналогичных режимов и составов криоконсерванта жизнеспособность эмбрионов составляла 90% [106] и 40% [107].

Представлены единичные сообщения о применении ДМСО и этиленгликоля в программах сверхбыстрого охлаждения. В литературе имеются данные о том, что хотя выживаемость эмбрионов после сверхбыстрого замораживания может быть очень высокой, частота имплантации таких эмбрионов после переноса в полость матки пациентки невелика [108].

В последнее время появился обширный ряд публикаций по внедрению нового способа криоконсервирования - витрификации [109-111]. Данный метод основан на предварительной экспозиции эмбрионов в растворах высоких концентраций криопротекторов - проникающих (ДМСО, ацетамид, пропиленгликоль) и непроникающих (полиэтиленгликоль, фиколл, сахароза) [112]. При этом, как правило, вообще не образуется кристаллов льда ни внутри клеток, ни в окружающем их растворе [113].

При использовании витрификации эмбрионы помещаются в смесь криопротекторов и, после того, как цитоплазма обезводится, суспензию эмбрионов витрифицируют путем помещения в жидкий азот. Скорость охлаждения должна быть достаточно высока для того, чтобы предотвратить кристаллизацию. Единственный недостаток витрификации - химическая токсичность растворов криопротекторов, которая прямо пропорциональна концентрации, времени и температуре экспозиции эмбриона в данных растворах.

В последнее время витрификация применяется к эмбрионам, находящимся на стадии морулы-бластоцисты, поскольку традиционные методы консервирования на этих эмбрионах не дают удовлетворительных результатов [114].

Большие трудности при витрификации возникают на этапе отогрева. Во-первых, велик риск рекристаллизации, во-вторых, сказывается токсичность криопротекторов. Во избежание дополнительных разрушений эмбриона необходимо обеспечить его быстрое согревание с одновременным отмыванием от протекторов [115]. Витрификация облегчает и упрощает процесс замораживания эмбрионов. Преимущество этого метода в том, что эмбрионы не повреждаются кристаллами льда, как это происходит при контролируемой медленной криоконсервации. Коэффициент проницаемости находится в прямой связи с молекулярным весом и является мерой скорости проникновения криопротектора в эмбрион или, наоборот, выхода из него. Низкий молекулярный вес является преимуществом, так как криопротектор имеет более высокую скорость попадания внутрь и выхода из эмбриона. Таким образом, индуцируется меньшая химическая интоксикация, так как время экспозиции эмбриона, в витрификационном растворе, может быть сокращено. В опытах с мышами [116] оптимизировали

витрификационный метод, в котором использовали 40% этиленгликоль, 30% фиколл и 0,5М сахарозу. Отмечают необходимость проводить эквilibрацию при более низкой концентрации криопротектора, и только после этого экспозицию в течение короткого времени при более высокой концентрации [117]. Витрификация применяется к полученным *in vitro* бластоцистам, так как традиционные методы криоконсервации на этих эмбрионах не дают удовлетворительных результатов по сравнению с эмбрионами, развивавшимися *in vivo* в опытах с животными. Методы, которые применялись по отношению к эмбрионам, образовавшимся *in vivo*, были адаптированы для созданных *in vitro* эмбрионов. При этом оказалось, что данные эмбрионы были значительно чувствительнее по отношению к процессу криоконсервации. Повышенной чувствительности, полученных *in vitro* эмбрионов, к повреждениям из-за охлаждения можно избежать, используя достаточно высокую скорость охлаждения. Долгое время считалось, что эмбрионы, полученные *in vitro* и находящиеся на продвинутой стадии развития, обладают более высокой устойчивостью к витрификации, чем эмбрионы, находящиеся на более ранних стадиях развития. Недавно появилось сообщение об успешной витрификации эмбрионов человека, находящихся на стадии пронуклеусов [109].

До сегодняшнего дня дискуссионным остается вопрос оптимальной стадии развития эмбриона, способной перенести условия глубокого охлаждения.

Авторы демонстрируют, что после криоконсервирования эмбрионов на стадии пронуклеусов, жизнеспособными остаются 72 % эмбрионов, на стадии 2-х бластомеров - 60 %, а на стадии бластоцисты - 38% [118, 119]. Частота беременности после переноса

заморожено оттаянных эмбрионов - 47, 14 и 0 %% соответственно [120].

Общеизвестно, что первый клеточный цикл у эмбрионов человека является самым длинным и продолжается до 24 ч [121].

Кариология раннего эмбриогенеза человека изучена достаточно хорошо, однако мы встретили совершенно противоположные выводы о криоконсервировании эмбрионов человека на стадии зиготы. Так, одни авторы рекомендуют криоконсервирование эмбрионов человека проводить именно на данной стадии [122–124], причем, убедительно демонстрируя эффективность применение медленных скоростей охлаждения [125]. Другие, обобщая результаты исследований, считают проведение криоконсервирования данной стадии бесперспективным [126].

Отдельные авторы считают оптимальной стадией для криоконсервирования 8-клеточный эмбрион [127].

Мы встретили лишь одно сообщение о криоконсервировании эмбрионов человека, находящихся на стадии морулы [128]. Однако авторы делают неоднозначные выводы о возможности проведения замораживания-отогрева на данной стадии развития эмбрионов человека.

Успешное криоконсервирование эмбрионов на стадии бластоцисты продемонстрировано в работе [129]. Авторами на достаточно большом материале показана эффективность хранения при низких температурах эмбрионов на стадии кавитированной бластоцисты [130]. Лучшие результаты получены при криоконсервировании бластоцист путем витрификации [131]. Селективный перенос деконсервированной бластоцисты позволяет исключить возникновение многоплодной беременности [132]. Описан случай развития беременности и родов после переноса бластоцисты,

замороженной дважды [133]. Однако криоконсервирование бластоцист является более трудной задачей, нежели криоконсервирование эмбрионов на стадии дробления. Причины этого явления полностью не определены, и поэтому поиск решения этой проблемы идет лишь эмпирическим путем. Предполагают, что трофобласта как эпителиальный слой эмбриона препятствует проникновению криопротекторов в полость и клетки бластоцисты. В пользу этого тезиса говорит тот факт, что механический прокол трофобласта повышает эффективность криоконсервирования бластоцист [134]. Поздние стадии легче переносят условия криоконсервирования, поскольку с развитием эмбриона объем клетки не увеличивается, происходит компактизация бластомеров и даже если один или несколько бластомеров все же были повреждены, то остальные могут дать начало развитию целого организма [135]. Этим выводам противоречат результаты [136], поскольку автор демонстрирует сложность криоконсервирования бластоцист в стадии “вылупления”.

Очевидным является тот факт, что на частоту беременности после переноса деконсервированных эмбрионов играет сохранность их морфофункционального состояния. Однако и здесь нет единодушного мнения специалистов. Так, одни авторы [137] считают, что эмбриоперенос следует производить сразу же после оттаивания клеток. Другие - подчеркивают необходимость проследить темпы дробления эмбрионов в культуре [138]. Интересной в данном направлении является работа, в которой автор сравнивал две группы эмбрионов: с последующим дроблением после деконсервации и без такового [139]. Считают, что возобновление митоза после криоконсервирования является надежным критерием сохранности эмбрионов [140].

Одни авторы считают, что при сохранности хотя бы одного бластомера, эмбрион можно считать перенесшим криоконсервирование [141], другие - тщательно анализируют сохранность бластомеров, целостность мембраны и *zona pellucida* [142]. По данным большинства авторов, эмбрион является жизнеспособным, если, по крайней мере, половина бластомеров остаются целыми [143].

Остается дискуссионным вопрос криоконсервирования эмбрионов человека, полученных после цитоплазматической инъекции спермия в ооцит. Прокол *zona pellucida* увеличивает проницаемость мембраны эмбриона, что усложняет проведение процедуры насыщения криопротектором и дегидратации [144]. В работах [145, 146] убедительно продемонстрирована эффективность медленного метода криоконсервирования эмбрионов, перенесших процедуру ICSI. Показано образование внутриклеточных кристаллов льда в зоне нарушения целостности мембраны. Приведены данные о снижении эффективности процедуры криоконсервирования эмбрионов, полученных после ICSI [147]. Отдельного внимания заслуживает работа по успешному криоконсервированию эмбрионов человека, полученных после деконсервирования ооцитов и проведения микроинъекции тестикулярных спермиев [148]. Проблематичным остается криоконсервирование эмбрионов человека, перенесших биопсию полярных телец либо бластомеров для преимплантационной генетической диагностики [149]. Сравнивая различные методы, предлагается использовать витрификацию, причем только с непроникающими криопротекторами [150].

Интересными являются разработки по внутриклеточному введению растворов криопротекторов, для стабилизации цитоскелета. Введение в ооцит мыши 1мкМ таксола обеспечивает высокую частоту

выживаемости и высокую степень достижения стадии вылупившейся бластоцисты, по сравнению со стандартным способом витрификации [151]

Сравнивается жизнеспособность эмбрионов, подвергнутых криоконсервированию после биопсии нескольких бластомеров. Биопсия подразумевает механическое повреждение *zona pellucida* и удаление одного, двух бластомеров. Подчеркивается, что данная процедура снижает эффективность криоконсервирования [152, 153].

В настоящее время нет однозначного мнения по поводу критериев оценки морфологических параметров эмбрионов, перенесших криоконсервирование. Эмбрион считают выжившим при сохранности половины бластомеров [154]. По другим данным [155] необходимо, чтобы хотя бы один бластомер был неповрежденным. По данным [20] частота наступления беременности при переносе частично поврежденных эмбрионов снижается в три раза. Встречаются противоположные выводы о жизнеспособности эмбрионов после потери бластомеров. Так, показано, что это не влияет на частоту образования бластоцист и имплантационный потенциал. [156]. Считают, что бластомеры, поврежденные в ходе криоконсервирования, обладают токсическим эффектом в отношении оставшихся, снижая тем самым их имплантацию [157].

Механизм возникновения фрагментации в преимплантационном эмбриогенезе остается невыясненным. Известно, что у 75% эмбрионов выявляется фрагментация различной степени выраженности преимущественно в период от 2- до 8-ми клеточной стадии развития [158]. Известно, что фрагментация контролируется некоторыми генетическими механизмами и развивается в первом клеточном цикле. Очевидно, резкое возрастание цитоплазматической фрагментации происходит за счет разрушения отдельных бластомеров

в ходе криоконсервирования. Некоторые авторы предполагают, что фрагментация эмбрионов - это отражение генетически детерминированной гибели на ранних этапах дробления, либо она является следствием неблагоприятного воздействия внешних факторов [159].

Изучение хромосомного баланса фрагментированных эмбрионов показало, что более 30 % таких эмбрионов несут те или иные хромосомные аномалии: мозаицизм встречается в 19,8 % клеток, а полиплоидия в 5,5 %. Хромосомные аномалии встречаются в 2 раза чаще во фрагментированных эмбрионах, по сравнению с нормальными. Эмбрионы с признаками фрагментации в большинстве случаев не имплантируются, а если имплантация происходит, то до 60 % таких эмбрионов все же абортирует. Считают, что фрагментация цитоплазмы бластомеров является результатом неравномерного распределения ядерного материала в процессе деления бластомеров [160].

Встречаются работы, в которых делается вывод о том, что фрагментация эмбрионов происходит из-за неоптимальных условий культивирования. После переноса эмбрионов в условия *in vivo* остается возможным их дальнейшее развитие и имплантация [161]. Если фрагментация не затрагивает ту часть бластомеров, в которой локализованы наиболее существенные для развития компоненты сигнальных путей (рецепторы факторов роста, регуляторные домены апоптозспецифических белков), она не является летальной для эмбриона. Соответственно эмбрионы с различными типами пространственной фрагментации имеют разный потенциал развития и последующей имплантации.

Кроме того, предполагают, что в процессе фрагментации, бластомеры теряют важную составляющую часть цитоплазмы, а вместе с ней клеточные органоиды, мРНК и белки.

Показано, что критерием имплантационного потенциала эмбрионов является наличие клеточных органелл, которые обнаруживаются при световой микроскопии в виде гранул [162]. Гиперплазия мембран эндоплазматической сети с расширением ее канальцев и систем может отражать различные по интенсивности и разные по своей сути процессы. Во-первых, это усиление метаболической активности ряда веществ, во-вторых, это нарушенный внутриклеточный транспорт метаболизируемых продуктов, которые накапливаются в расширенных канальцах и цистернах сети. При нарушении внутриклеточного транспорта метаболизируемых продуктов в расширенных цистернах эндоплазматической сети накапливаются белки и вода или липиды и липопротеиды. Синтетическая деятельность пластинчатого комплекса, тесно связанная с эндоплазматической сетью, завершается образованием секреторных гранул и вакуолей. Поэтому морфология нарушенной деятельности пластинчатого комплекса отражает и нарушения секреции, т.е. нарушения продукции клеточных включений - гранул и вакуолей. При этом увеличивается количество секреторных гранул и везикул в цитоплазме и за пределами пластинчатого комплекса. Гипертрофия пластинчатого комплекса в таких случаях сочетается с гиперплазией эндоплазматической сети. В тех случаях, когда синтез тех или иных веществ опережает их секрецию и выведение, эти вещества избирательно накапливаются в гипертрофированном пластинчатом комплексе и могут повреждать его [163].

Прогностическим критерием выживания эмбрионов после криоконсервирования является наличие гладкой мембраны. Разрыв, проколы, выпячивания – снижают потенциал дробления. Образование брешей, макропор свидетельствует о нарушении проницаемости мембраны [164].

Утолщение *zona pellucida* возникает по ряду причин и может влиять на мембранную проницаемость. Одной из причин является уменьшение количества ионов кальция во внеклеточной жидкости, при этом изменяется проницаемость мембраны для ионов натрия и калия, в клетке накапливается жидкость [165].

Плотный межклеточный контакт бластомеров, наряду с другими морфологическими характеристиками, является прогностическим критерием жизнеспособности эмбрионов. Так, чем больше плотность контакта, тем выше частота имплантации эмбрионов [166].

Таким образом, на сегодняшний день существует несколько направлений в криоконсервировании преимплантационных эмбрионов человека. Прежде всего, они основаны на различных скоростях охлаждения и состава криоконсерванта. Это метод медленного охлаждения, витрификация и быстрое охлаждение.

За последнее десятилетие произошла эволюция всех этих методов. От методов с использованием больших концентраций криопротекторов до их минимальных концентраций либо полного отсутствия в составе криоконсерванта. Однако целый спектр проблем остается открытым. Не определены морфологические критерии целостности эмбрионов после криоконсервирования. Нет однозначного мнения по поводу оптимальной стадии развития для проведения данной процедуры. Не получено убедительных доказательств безопасности процедуры криоконсервирования, длительного хранения и отогрева для генетического аппарата

эмбрионов человека. Данные литературы носят разобщенный характер, порой противоречат друг другу.

1.3. Новые направления в изучении структурно-функциональной организации хромосом преимплантационных эмбрионов человека

Первая беременность после переноса в полость матки пациентки криоконсервированных эмбрионов была получена в 1983 году [167]. На сегодняшний день во всем мире насчитывается более 5 000 таких детей. Однако встречаются сообщения о негативном влиянии криоконсервирования на последующее развитие эмбрионов человека. Так, описаны случаи увеличения постимплантационных потерь [168], снижения общего веса детей [169].

Несмотря на высокие показатели выживаемости криоконсервированных эмбрионов человека, частота их имплантации, по сравнению с нативными, остается на довольно низком уровне - 9% [170]. Причиной этому могут быть генетические нарушения, возникшие после процедуры замораживания-оттаивания. Поэтому необходимым является проведение преимплантационной генетической диагностики.

Преимплантационная генетическая диагностика является самой ранней формой пренатальной диагностики, цель которой состоит в том, чтобы не допустить перенос и имплантацию эмбрионов с серьезными хромосомными дефектами и генетическими аномалиями. По мнению многих ученых преимплантационную диагностику следует применять в программах ЭКО для всех эмбрионов [171, 172].

Установлено, что морфологически аномальные эмбрионы, полученные после проведения ЭКО, имеют значительное повышение анеуплоидий, которые могут приводить к спонтанным абортам или отсутствию имплантации [173].

Преимплантационная диагностика осуществляется с помощью различных методов исследования, среди которых классическим является анализ метафазных пластин бластомеров, методы гибридизации *in situ* (FISH) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) [174, 175].

Флюоресцентная гибридизация *in situ* является методом быстрого проведения цитогенетической диагностики, основанным на специфичной гибридизации флюоресцентно-меченных зондов с определенными участками хромосом (обычно это расположенные в районе центромеры хромосомо-специфические альфоидные повторы) [176]. Интерфазная гибридизация имеет преимущества перед метафазным анализом, в случае, когда клетки плохо культивируются *in vitro*.

В качестве исследуемого материала для ПГД могут быть использованы: ядро бластомера эмбриона, первое полярное тельце (1ПТ), второе полярное тельце (2ПТ). К выбору биологического материала подходят индивидуально, учитывая анамнез супружеских пар и возможности появления того или иного генетического заболевания у будущего ребенка [177].

Первыми ПЦР для преимплантационной генетической диагностики в клинической практике применили [178]. С помощью ПЦР они детектировали специфические последовательности для хромосомы Y при определении пола эмбрионов у супружеских пар с X-сцепленными заболеваниями. Однако из-за риска постановки неправильного диагноза при определении пола эмбрионов от ПЦР

постепенно стали отказываться в пользу флюоресцентной гибридизации *in situ*. Его преимущество заключалось в том, что можно было одновременно детектировать как X, так и Y-хромосомы, и, как следствие, появилась возможность определять не только пол эмбрионов, но и анеуплоидии половых хромосом [179]. С тех пор за достаточно короткое время разработано много модификаций ПЦР и FISH, расширяется область применения этих методов в преимплантационной генетической диагностике.

В настоящее время более чем в 50% случаев ПГД проводят с использованием молекулярно-цитогенетических методов с целью обнаружения анеуплоидии по хромосомам 13, 16, 18, 21, 22, X и Y, как наиболее частым генетическим аномалиям, выявляемых у эмбрионов. Более сложной задачей является обнаружение патологий кариотипа, возникающей в результате сбалансированных структурных хромосомных аномалий (транслокаций, инверсий, инсерций) у родителей [180]. Эта задача решается путем получения специфических ДНК-зондов практически на все хромосомные районы.

Оплодотворение и предшествующие ему события можно без преувеличения назвать кульминационными моментами репродуктивного процесса, во многом определяющими судьбу эмбриона, плода и новорожденного. Дефекты, которые передаются потомству, имевшие место в половых клетках или появившиеся вновь, вызывают наследственные заболевания, в основе которых лежат хромосомные и геномные мутации, возникающие в половых клетках в процессе гаметогенеза, при оплодотворении и на первых этапах дробления зиготы [181]. Установлено, что до 50 % и более зародышей, погибающих на преимплантационных стадиях, а также во время имплантации, несут те или иные хромосомные аномалии

[182,183]. Под действием естественного отбора уже во внутриутробном периоде отмечается подавляющая часть зигот с хромосомными аномалиями - до 99 % в виде преимплантационных потерь, спонтанных абортов и мертворождений [184]. Показано, что более 15 % беременностей завершаются ранними или поздними выкидышами, из которых 45 % - вследствие эффекта хромосомных аномалий [185]. Вполне обоснованным является тот факт, что многие эмбрионы (29 % в одном исследовании) при проведении ЭКО имеют хромосомные аномалии, что обусловлено высокой сложностью проведения каждого из этапов программы [186].

На стадии презембриона, которая длится от момента оплодотворения до 14 дня развития зародыша, имеется принципиальная возможность вмешательства с целью совершенствования результатов проведения репродуктивной технологии, условий инкубации, предупреждения рождения плода с хромосомными аномалиями. К ним относятся: улучшение условий культивирования в соответствующей среде, криоконсервирования, постановка генетического диагноза, генная терапия.

Важным является выяснение причин неудач вспомогательных методов репродукции, в том числе ЭКО. При этом оценивают морфологические, цитогенетические и функциональные свойства получаемых гамет, определяют этап, на котором остановилось развитие эмбрионов, анализируют аномалии процессов оплодотворения и дробления [187].

При наличии хромосомных aberrаций эмбриогенез часто или вообще невозможен, или резко нарушается с самых ранних стадий развития [188]. Проявления таких нарушений выражены в гораздо большей степени в случае аутосомных моносомий, когда развитие зиготы останавливается в первые дни после зачатия, но и в случае

трисомий хромосом, имеющих ключевое значение для эмбриогенеза, развитие также прекращается в первые дни после зачатия [189]. Так, например, трисомия 17 обнаруживается только у зигот, остановившихся в развитии на самых ранних стадиях. Кроме того, многие хромосомные аномалии связаны с пониженной способностью к делению клеток, как показывает изучение культур таких клеток *in vitro* [190].

Отдельного внимания заслуживает проблема учета наследственных заболеваний, связанных с полом, с целью недопущения переноса генетически неполноценных эмбрионов [191, 192].

Структурные изменения гамет, связанные с хромосомными аномалиями, выявляются только при начавшихся дегенеративных, очевидно, необратимых изменениях. Они заключаются в деформации ооплазмы, резком расширении перивителлинового пространства, нарушении структуры цитоплазмы с лизисом отдельных участков и вакуолизацией.

Можно предположить, что многие нарушения развития при хромосомных абберациях связаны именно с пониженной способностью клеток к делению. При этом возникает резкая десинхронизация процессов развития эмбриона.

Материалом для цитогенетического исследования служат неоплодотворенные ооциты и эмбрионы, не обнаруживающие признаков деления через 48 ч после инсеминации, а также не использующиеся для трансплантации в программе ЭКО.

Генетические исследования, проведенные на неоплодотворенных ооцитах, показали наличие хромосомных аббераций от 22 [193] до 47,7 % клеток [194].

Высокое преобладание хромосомных аномалий, вероятно, возникает в результате режима гиперстимуляции яичников, возраста женщины, подбора метода получения ооцитов или техники культивирования *in vitro* [195, 196].

В изложении основ и современных представлений о гаметогенезе, формировании мужского и женского пронуклеусов, отмечено, что из-за особенностей мейоза женские гаметы значительно сильнее, чем мужские, предрасположены к хромосомным абберациям [197]. Считают, что анализ контролирующих механизмов гаметогенеза и раннего эмбриогенеза необходим для дальнейшего усовершенствования эффективных методов лечения бесплодия [198].

Показано, что 66,7 % всех ооцитов, которые не оплодотворились *in vitro*, являлись анеуплоидными. Авторы выделяют возрастной фактор, как играющий основную роль в возникновении мутаций [199]. Так, с возрастом женщины достоверно увеличивается число ооцитов с хромосомными аномалиями. Если в группе женщин 25-29 лет 17 % неоплодотворенных яйцеклеток - анеуплоидны, то с увеличением возраста до 30-39 лет их число возрастало до 60 %. У женщин старше 39 лет 100 % неоплодотворенных ооцитов были несбалансированы по кариотипу. Вместе с тем была выявлена прямая зависимость частоты пороков развития от возраста матери и количества перенесенных эмбрионов [200]. Увеличение частоты хромосомной патологии с возрастом имеет тенденцию, аналогичную таковой в общей популяции, однако показатели в 2 раза выше, чем популяционные.

При рассмотрении корреляции между увеличением возраста отца и возникновением хромосомных аномалий у потомства оказалось, что риск различных хромосомных перестроек и, в

частности, синдрома Дауна в случае возраста отца выше 55 лет увеличивается [201].

На возникновение хромосомных аномалий влияет не только возраст родителей. Считают, что после трех неудачных попыток оплодотворения вне организма необходимо кариотипирование супружеской пары [202]. Так, у женщин с мозаицизмом Тернера только 45 % беременностей заканчивается рождением нормального потомства. Цитогенетический анализ ооцитов женщины с кариотипом 45X/46XX/47XXX позволил обнаружить хромосомные аномалии во всех неоплодотворенных ооцитах (89 ооцитов было получено в трех циклах и лишь 2, 1, и 2 яйцеклетки, соответственно, оплодотворились) После эмбриотрансплантации беременность не наступила ни в одном случае. Автор работы считает необходимым проведение предварительного медико-генетического консультирования супружеских пар в программе ЭКО для предотвращения рождения неполноценного потомства [203].

После анализа метафазных пластинок неоплодотворенных яйцеклеток, показано, что среди 1500 ооцитов, взятых от женщин в возрасте 22 - 40 лет – 24,0 % имели структурные аномалии, анеуплоидия наблюдалась у 22,8 % и другие структурные аберрации в 1,2 % случаях [204]. Гипогаплоидия ооцитов наблюдалась по хромосомам групп C, D, E и F, а в группах A, B и G наблюдалось приблизительное равенство гипо- и гипергаплоидии. Достоверных различий в возникновении хромосомных аномалий в зависимости от препаратов, применяемых для индукции овуляции, авторы не находят [205, 206].

Считают, что частота спонтанных аборт при проведении процедур экстракорпорального оплодотворения выше, чем при естественном зачатии и составляет около 26 % [207]. Изучение

абортивного материала показало, что 50 % плодов, развитие которых прекратилось до 12-й недели гестации, несут хромосомные aberrации, среди которых большая часть - анеуплоидии и триплоидии, встречаются мозаичные формы, трисомия половых хромосом и моносомия аутосом [208]. Причем, моносомия встречается гораздо реже, чем трисомия, и, по-видимому, является более грубой генетической патологией для развивающегося эмбриона, что ведет к естественному отбору таких эмбрионов в преимплантационной стадии или же на ранних этапах постимплантационного развития.

Некоторые авторы считают основной причиной возникновения трисомии ошибку в прохождении I мейотического деления и связывают повышение частоты возникновения этой аномалии с увеличением возраста женщины. Трисомия встречается более чем в 4 % хромосомной патологии при проведении программы ЭКО [209].

Причиной преждевременной конденсации хромосом спермия является нарушение процесса созревания ооцита [210, 211]. Данный процесс подразумевает возобновление первого деления мейоза после его блокирования на стадии профазы еще во внутриутробном развитии. Прежде чем ооцит достигнет метафазы второго деления мейоза, в нем должны произойти процессы ядерного, цитоплазматического и мембранного созревания. Однако, зачастую, ядерное созревание опережает созревание цитоплазматическое. Факторы роста, которые находятся в цитоплазме, в частности, фактор роста мужского пронуклеуса и фактор активации мейоза (MPF-фактор), играют существенную роль в преждевременной конденсации хромосом спермия. MPF-фактор, стимулирующий созревание, позволяет ооциту возобновить мейоз. Концентрация MPF различна в зрелых и незрелых ооцитах. На стадии метафазы I или на стадии метафазы II цитоплазматически незрелого ооцита MPF может

индуцировать преждевременную конденсацию хромосом сперматозоида после его пенетрации в ооцит. Активная форма этого фактора появляется в цитоплазме ооцита незадолго до разрушения зародышевого пузырька и затем содержится на высоком уровне в течение всей метафазы I. В период перехода от анафазы к телофазе концентрация MPF падает, но при вхождении в фазу MII уровень этого вещества возрастает вновь и сохраняется вплоть до оплодотворения. Ядро спермия после проникновения в ооцит, содержащий в цитоплазме MPF, теряет ядерную оболочку и хромосомы конденсируются. Разрушение ядерной оболочки спермия и формирование ПКХ индуцируется высоким уровнем активности MPF в цитоплазме ооцита, если ооцит на стадии метафазы II не активирован перед слиянием со спермием и активация происходит во время или после слияния [212].

Считают, что причиной преждевременной конденсации хромосом спермия является неадекватная индукция суперовуляции, которая ведет к аномалиям созревания ооцитов [213]. Считая, что искусственная суперовуляция ведет к аспирации ооцитов невысокой степени зрелости, предложено увеличивать время дозревания ооцитов *in vitro*, тем самым, снижая явления ПКХ. Некоторые работы, противоречат этому заключению, поскольку показано, что частота возникновения ооцитов с ПКХ возрастает после дозревания ооцитов *in vitro* [214].

Открытие техники микроинъекции спермия в цитоплазму ооцита (ICSI) открыло возможности для объяснения многих тонких механизмов процесса оплодотворения. Оказалось, что после инструментальной инъекции единичного спермия частота ПКХ возрастает до 30%. Сокращение концентрации MPF с помощью

инструментальной откачки цитоплазмы является методом, предотвращающим возникновение ПКХ [215].

Известно, что в процессе проникновения через клетки *corona radiata*, блестящую оболочку и слияния с плазматической мембраной ооцита, в спермиях происходит процесс капацитации и акросомальной реакции. После проникновения спермия в цитоплазму ооцита в нем происходит процесс "активации". Так, активатором считают осциллоген, находящийся в экваториальной области головки спермия [216]. Другими авторами рассматривается тирозинкиназа - как важный компонент цитостатической системы [217].

Исследования хромосомного набора сперматозоидов человека показали, что частота хромосомных aberrаций в нормальной человеческой популяции составляет от 9,2 до 14 % [218]. Такие клетки элиминируются в процессе миграции по ампулярной части маточных труб. При методах ВРТ эта селекция, вероятно, нарушена, поэтому случаи оплодотворения сперматозоидами с несбалансированным кариотипом выше, чем при оплодотворении *in vivo*.

Отдельного внимания заслуживает проблема возникновения полиплоидных эмбрионов. Полиплоидия может возникнуть вследствие полиспермного оплодотворения (оплодотворение гаплоидного ооцита двумя и более гаплоидными спермиями), диплоспермии (оплодотворение гаплоидного ооцита диплоидным спермием) или дигинии (оплодотворение диплоидного ооцита гаплоидным спермием). Частота возникновения полиплоидных эмбрионов составляет от 2 до 14 % [219].

Однако если причиной дигинии являются нарушения прохождения мейоза, то полиспермия часто возникает при нарушении механизма оплодотворения, которое происходит в условиях *in vitro*.

Запаздывание момента оплодотворения приводит к тому, что в гамете происходят патологические изменения мейотического аппарата, заключающиеся в том, что ахроматиновое веретено в них разжижается. Некоторые хромосомы отсоединяются от метафазной пластинки, беспорядочно перемещаются и образуют микроядра. Этот процесс ведет к возникновению хромосомных мутаций. Кроме этого, при задержке момента оплодотворения возрастает вероятность полиспермного оплодотворения [220].

Старение гамет, как в женских, половых путях, так и в культуре снижает их способность участвовать в оплодотворении [221]. Продолжительность периода, приводящего к такому результату, для ооцитов исчисляется часами, а для сперматозоидов - сутками. При оплодотворении *in vitro* дегенеративные изменения ооцитов и избыток компетентных сперматозоидов может привести к полиспермному оплодотворению. Можно специфическим образом влиять на активацию ооцитов и предупреждать наступление дегенеративных изменений путем использования ооцитов, не достигших полной зрелости и своевременном их оплодотворении в процессе культивирования. Делается вывод о взаимосвязи между хромосомным балансом клетки, зрелостью ооцита, качеством спермы, ее способностью к оплодотворению и временем инсеминации *in vitro*. [222].

За начало оплодотворения принимают момент контакта сперматозоида с оболочками яйцеклетки. В оплодотворении различают несколько этапов. В первую очередь происходит проникновение сперматозоида между клетками лучистого венца к прозрачной оболочке. Как только головка одного из сперматозоидов внедряется в ооплазму, развивается кортикальная реакция. Под плазматической мембраной развиваются кортикальные гранулы

вследствие синтетической активности комплекса Гольджи. При проникновении сперматозоида в ооплазму происходит слияние их с наружной мембраной ооцита. При этом освобождающееся в перивителлиновое пространство содержимое индуцирует изменения в прозрачной оболочке, препятствующие проникновению других сперматозоидов. Однако в некоторых случаях этот механизм не срабатывает, в результате чего возникает полиспермное оплодотворение. Приводится случай образования зиготы с 20 пронуклеусами, причем такой ооцит продолжил свое развитие в культуре до стадии бластоцисты [223].

Некоторые авторы придерживаются мнения, что оплодотворение *in vitro* не индуцирует полиспермию [224]. Введение процедуры микроманипуляции повышает возможность получения беременности при крайне низких показателях спермограммы, что, однако, потенциально увеличивает процент хромосомных аномалий у эмбрионов [210]. Рассечение оболочки ооцита или ее полное удаление снимает барьер для полиспермии.

В некоторых случаях нарушения ploидности преимплантационных эмбрионов можно определить по морфологическим признакам, а именно по наличию трех и более пронуклеусов через 16-20 ч после инсеминации. Показано, что 50 % зигот с тремя пронуклеусами являются несбалансированными по кариотипу [225].

Корреляция между морфологией и ploидностью не является абсолютной. Так, среди 11 эмбрионов с двумя пронуклеусами только два имели нормальный кариотип, остальные были гиподиплоидными, а из 17 эмбрионов с тремя пронуклеусами два имели нормальный кариотип. Показано, что среди зигот с тремя пронуклеусами

триплоидия возникает только в 24 % случаев, остальные зиготы - гипо- и гипердиплоидные [226].

В результате слияний клеток или ошибок во время клеточного деления, иногда и целые организмы становятся полиплоидными.

Некоторые ткани (например, скелетные мышцы, гепатоциты, мегакариоциты, эпителий мочевого пузыря, миокард, синцитиотрофобласт) часто полиплоидны в результате эндодупликаций генома или слияния клеток во время нормального развития).

Имея множественные копии генома, клетки получают определенные преимущества, такие как устойчивость к повреждениям генома. Кроме того, увеличиваются размеры клеток в результате полиплоидии или политении, что предоставляет им большую гибкость и силу в ткани, подверженной механическим стрессам. Молекулярные механизмы, управляющие специфической для типа клеток резистентностью к полиплоидии остаются неизвестными.

Существует ограниченное количество доказательств по измерению генных продуктов в тетраплоидных клетках млекопитающих. немногие наблюдения подчеркивают, что тетраплоидность не дает в результате простое удвоение белка или уровня экспрессии РНК. Имеются также доказательства, подтверждающие, что два генома скомбинированные во время слияния бластомеров, могут не экспрессировать своих генов на одном и том же уровне.

Исследования дозы гена у тетраплоидных эмбрионов млекопитающих редки, комбинированные данные указывают на то, что тетраплоидность не вызывает простого удвоения клетки и всего её содержимого.

Хромосомные аномалии возникают как в гаметогенезе, так и в процессе раннего дробления зиготы. Поэтому хромосомные аномалии гаметического происхождения, как правило, обнаруживаются во всех клетках организма, тогда как аномалии хромосом зиготического (соматического) происхождения приводит к явлению мозаицизма, при этом степень мозаичности зависит от того, в какой стадии дробления зиготы произошла хромосомная аномалия. В некоторых случаях у эмбрионов, полученных после успешного оплодотворения ооцитов вне организма, наблюдается нарушение процесса дробления, что выражается в блокировании развития, либо в изменении морфологии: фрагментация, вакуолизация, дегенерация бластомеров. Приводятся результаты цитогенетического анализа эмбрионов, которые характеризуются как морфологически аномальные - 68,1 % таких эмбрионов имеют нормальный кариотип, а 31,9 % - хромосомные аномалии [227]. Причиной увеличения структурных аномалий может быть дегенерация бластомеров, возможно, в связи с неоптимальными условиями культивирования: нарушения в хромосомном аппарате, как правило, коррелируют с изменением морфологии преимплантационных эмбрионов [228].

Новые перспективы в клинической и преимплантационной цитогенетике открыла техника микроманипуляции биопсии полярного тела или бластомеров, которая позволила использовать часть эмбриона (изолированное полярное тело и трофэктодермальная биопсия) и зиготы (полярное тело) без вреда для его дальнейшего развития и использования в программе ЭКО [229].

У большинства млекопитающих и человека полярное тело состоит из хромосом, которые не участвуют в истинной метафазной пластинке и не имеют веретена деления. Хромосомы полярного тела обычно рассеиваются в цитоплазме при его деградации.

Цитогенетический анализ I полярного тела применяют для скрининга гамет, во избежание использования анеуплоидных ооцитов в программе ЭКО. Второе полярное тело выделяется после пенетрации спермием или партеногенетической активации. На протяжении времени выделения полярного тела его хромосомы находятся в ана-либо телофазе II мейотического деления. Кариотипирование первого и второго полярного тела безвредно для дальнейшего развития ооцита и эмбриона. При обнаружении же хромосомной патологии такой эмбрион не трансплантируется в матку, что позволяет снизить риск рождения детей с генетическими заболеваниями. Цитогенетический анализ полярного тела позволяет производить скрининг пациентов, принимающих участие в экстракорпоральном оплодотворении и выявлять наличие гамет, несущих хромосомные аномалии без нанесения вреда для дальнейшего развития эмбриона. В последнее время генетическому анализу подвергают один либо два бластомера преимплантационных эмбрионов человека, находящихся на 8-ми клеточной стадии развития [230].

Долгое время считалось, что в замороженном состоянии не происходит накопления мутаций, что обуславливает лучшую сохранность репродуктивных клеток и эмбрионов [231]. Полагают, что даже под влиянием ионизирующей радиации в эмбрионах, хранящихся при -196°C , не возникают генетические отклонения, которые регистрируют при облучении клеток при нормальной температуре. Это можно объяснить тем обстоятельством, что свободные радикалы при облучении клеток в криоконсервированном состоянии не взаимодействуют с ДНК. В условиях глубокого холода свободные радикалы теряют способность мигрировать и, следовательно, влиять на генетический аппарат.

Вместе с тем, в последнее время появились сообщения о нарушениях генетического аппарата клеток, вызванных как самим процессом криоконсервирования, так и манипуляциями, проводимыми на этапах подготовки к замораживанию. Так, высказывалось мнение, что применение ДМСО при криоконсервировании эмбрионов человека вызывает повреждения хромосом [232]. У 60% эмбрионов, остановившихся в развитии *in vitro*, диагностировали хромосомные аномалии в виде анеуплоидий, полиплоидий, комплексных мозаиков [233]. Следует, однако, заметить, что большинство исследований выполнены на абортивном материале, что не позволяет оценить истинное количество хромосомных аномалий в эмбрионах человека, поскольку большинство эмбрионов, несущих хромосомные аномалии, либо не имплантируются, либо отторгаются в первые дни после имплантации.

Преимплантационную генетическую диагностику проводят для определения генетического статуса эмбриона до момента имплантации матку и начала беременности. Современные технологии позволяют без вреда для эмбриона, полученного в результате экстракорпорального оплодотворения ооцитов, на 3-й день его развития отделить 1-2 бластомера, которые можно использовать для диагностики генетической патологии [234].

Цитогенетические исследования преимплантационных эмбрионов в настоящее время выполнены на единичных бластомерах, что не позволяет сделать вывод об истинном хромосомном статусе эмбрионов человека. Данные о генетическом статусе деконсервированных эмбрионов носят ограниченный характер. Продемонстрировано отсутствие негативного воздействия факторов криоконсервирования на характер экспрессии генов в эмбрионах человека [235]. Изучение генетического статуса

криоконсервированных эмбрионов, используя метод флюоресцентной гибридизации *in situ* по 15, 17, 18, X и Y хромосомам, позволило констатировать увеличение диплоидных мозаиков до 57% после процедуры замораживания-оттаивания. Количество хаотичных мозаиков после криоконсервирования увеличивалось до 34,1%, по сравнению с 6,3% в контроле [236]. В то же время приводятся данные о рождении здоровых детей после переноса эмбрионов, которые были заморожены дважды [133].

Использование FISH-диагностики может быть полезным для выявления неблагоприятных параметров гормональной стимуляции, факторов культивирования *in vitro* и условий криоконсервирования [237].

Феномен возникновения полиплоидных бластомеров после замораживания-оттаивания в доступной нам литературе не описан. Имеются сведения об образовании полиплоидии после замораживания ооцитов мыши [238]. Авторы, однако, считают, что причиной этого является, скорее всего, полиспермное оплодотворение.

С целью понимания причин неудач при проведении программ экстракорпорального оплодотворения, улучшения "качества" гамет и эмбрионов, используемых в ЭКО, снижения риска рождения детей с генетическими и хромосомными аномалиями, считаем целесообразным проведение генетического анализа гамет и изучение хромосомного статуса эмбрионов, перенесших процедуру криоконсервирования.

1.4. Повышение жизнеспособности эмбрионов человека путем применения систем сокультивирования

Общеизвестно, что на протяжении 80 ч после оплодотворения эмбрион находится в полости маточных труб и только на стадии вылупившейся бластоцисты попадает в полость матки [239]. Поэтому в циклах лечения бесплодия методом ЭКО перспективным является перенос в полость матки пациентки эмбрионов, которые достигли стадии бластоцисты. Однако в условиях *in vitro* этой стадии достигает не более 20% всех эмбрионов [240]. Большинство из них прекращает свое развитие на более ранних стадиях. Свой вклад в снижение жизнеспособности эмбрионов вносят субоптимальные условия культивирования. Поэтому ведется широкий поиск совершенных условий культивирования, позволивших получить эмбрионы высокого качества. Одним из путей решения данной проблемы является поиск биологически активных сред и систем сокультивирования [241].

Принципы обоснования систем сокультивирования для разных видов млекопитающих различны. Так, общеизвестным является наличие 2-х клеточного блока у мышей [242]. У человека экспрессия эмбрионального генома начинается с 8-ми клеточной стадии, поэтому, эмбрионы при культивировании *in vitro*, чаще всего останавливают свое развитие на этой стадии. Блок развития во время активации эмбрионального генома связан, скорее всего, с блоком транскрипции и трансляции, замедлением метаболизма эмбрионов. У человека эмбрион до стадии морула-бластоцисты находится в просвете фаллопиевых труб. При культивировании *in vitro* эмбрион находится в синтетических средах. Отсутствие в среде культивирования клеток материнского происхождения, очевидно, является причиной снижения жизнеспособности эмбрионов. Поэтому ведение систем

сокультивирования на монослое именно этого типа клеток может обеспечить максимальную приближенность культивирования к условиям *in vivo* [243].

Клеточные культуры находят все более широкое применение в разных областях биологии и медицины. Их используют при решении таких общебиологических проблем, как выяснение механизмов дифференцировки и пролиферации, взаимодействия клеток со средой, адаптации, старения, биологической подвижности, злокачественной трансформации.

Ведутся исследования по сокультивированию преимплантационных эмбрионов на клетках линии Vero [244], эпителиальных клетках фаллопиевых труб [245]. Показана высокая эффективность аутологического эндометриального сокультивирования на гранулярных и стромальных клетках эпителия [246]. При культивировании на клетках кумулюса и гранулезы используют не только аутокринное, но и гетерокринное культивирование на криоконсервированных клетках [247].

В данном аспекте интерес представляет работа по совместному культивированию эмбрионов человека. Оказывается, культивирование нескольких эмбрионов предпочтительнее, по сравнению, с отдельным культивированием, поскольку в таком случае ускоряются темпы дробления эмбрионов и улучшаются их качественные характеристики [248].

Ведение клеточных линий требует постоянного увеличения количества клеток, поэтому выбор условий культивирования направлен на обеспечение максимальной скорости клеточной пролиферации. Эти условия, как правило, неблагоприятны для дифференцировки клеток, при которой их рост существенно ограничивается или полностью подавляется. К условиям,

способствующим размножению клеток, относятся их низкая плотность, невысокая концентрация Ca^{2+} , присутствие ростовых факторов, таких как фактор роста эпидермиса, фактор роста фибробластов и фактор роста, синтезируемый тромбоцитами. Углубленные исследования реакции клеток преимплантационных эмбрионов человека позволили выявить сложную систему местных специфических факторов, осуществляющих контроль их роста и дифференциации. Среди факторов межклеточного взаимодействия важную роль играют ростовые факторы. Факторы роста - это биологически активные соединения, стимулирующие или ингибирующие деление и дифференциацию различных клеток и являющиеся основными переносчиками сигнала клетки. Система факторов роста включает полипептидные ростовые факторы, специфические клеточные рецепторы, связывающие белки, регулирующие количество факторов роста, действующих на клетки-мишени [249].

Непременным условием реализации фитогенного эффекта факторов роста является их взаимодействие со специфическими рецепторами, локализованными на поверхности клеток, в цитоплазме и ядре [250].

Большинство наиболее изученных факторов роста (инсулиноподобный, эпидермальный, трансформирующий, колониестимулирующий и фибробластный фактор роста) оказывают влияние на преимплантационное развитие эмбрионов человека *in vitro*. Полагают, что инсулиноподобный фактор роста действует, в основном, в раннем эмбриогенезе и обладает метаболическим эффектом. Основным местом синтеза инсулиноподобного фактора роста являются клетки гранулезы, в меньшем количестве он выделен в фолликулярной жидкости. Считают, что ИФР увеличивает количество

клеток внутренней клеточной массы бластоцисты. Наиболее мощным стимулятором клеточной пролиферации и дифференцировки является эпидермальный фактор роста. ЭФР инициирует сложные биохимические процессы, приводящие к синтезу ДНК и митозам. ЭФР обнаружен в стромальных и эпителиальных клетках эндометрия. В литературе представлены результаты о повышении жизнеспособности эмбрионов после сокультивирования на монослое фибробластных и эпителиальных клетках яйцевода и эндометрия. Трансформирующий фактор присутствует в клетках гранулезы и, в меньшей степени, в фолликулярной жидкости человека. ТФР регулирует внутренний метаболизм клеток. Модулятором клеточной пролиферации и дифференциации является колониестимулирующий фактор роста, который в большей степени продуцируется стромальными клетками эндометрия [251].

Большинство факторов роста обеспечивают аутокринную и паракринную регуляцию развития эмбриона. В частности, стимуляция формирования бластоцисты достигается добавлением в среду культивирования лейкоemia-ингибирующего фактора, гепарин-связывающего эпидермального фактора роста и трансформирующего фактора роста.

Сыворотка нивелирует многие недостатки среды, которые могут проявляться в ее отсутствии. В состав питательных сред для культивирования преимплантационных эмбрионов млекопитающих вводят, как правило, сывороточный альбумин [252]. Однако включение сыворотки или сывороточного альбумина может приводить и к ухудшению результатов культивирования. Причины отрицательного действия белковых добавок на преимплантационные эмбрионы млекопитающих до конца не ясны. Неясным остается вопрос о необходимости белковых добавок, а также об их роли и

функциях. До сих пор не все компоненты добавок точно идентифицированы, а для известных, не всегда выяснено их действие на эмбрионы.

Поэтому актуальным остаются поиск и создание наиболее эффективных сред для культивирования преимплантационных эмбрионов млекопитающих. При этом в подавляющем большинстве опубликованных работ изучалась возможность использования альбумина в качестве белкового компонента. В то же время общеизвестные среды культивирования эмбрионов человека не являются оптимальными. Более того, имеются сообщения о том, что один из компонентов — гипоксантин, может оказывать отрицательное воздействие на развитие эмбрионов мышей [253] и человека [254].

Использование более сложных сред в отсутствие сыворотки имеет два преимущества: такие среды могут быть селективными для определенного типа клеток, а отсутствие сыворотки облегчает выделение из среды продуктов клеточного метаболизма.

Высокое качество среды для культивирования – основной залог успеха выполнения программы ЭКО. В среде культивирования эмбрионов *in vitro* присутствуют мертвые сперматозоиды и дегенерирующие клетки кумулюса, которые могут вызывать перекисное окисление липидов. В результате перекисного окисления липидов мембран клеток происходят необратимые изменения, выражающиеся в повышении степени фрагментации эмбрионов. Это, безусловно, подтверждает версию о свободнорадикальном повреждении клеток в процессе культивирования. Исследования показали уменьшение содержания одного из токсичных продуктов перекисного окисления липидов - малонового диальдегида после инкубации клеток в фолликулярной жидкости человека, что

свидетельствует о защитном эффекте человеческой фолликулярной жидкости [255].

Стероидные гормоны из группы эстрогенов действуют аналогично тому, что наблюдается в присутствии таких антиоксидантов, как токоферол и синтетические препараты, которые взаимодействуют с ведущими цепи окисления свободными радикалами. Эстрогены стимулируют пролиферацию клеток соответствующих органов [256], и если такое действие детерминировано именно антирадикальным их свойством, то это может служить доводом в пользу модели регуляции клеточного размножения. Однако ингибция этими гормонами перекисного окисления липидов является, по-видимому, лишь одним из возможных их эффектов.

Влияние эстрадиола на развитие зародышей млекопитающих *in vitro* изучено достаточно подробно. Известно, что при культивировании их в среде с эстрадиолом и монослоем клеток матки существенно улучшались характеристики их развития: больший процент эмбрионов достигал стадии вылупившейся бластоцисты в случае добавления в среду эстрадиола [257]. При культивировании мышинных эмбрионов в присутствии низких концентраций эстрадиола ускорялось включение в эмбрионы меченых предшественников аминокислот. Однако более высокие концентрации эстрадиола действуют на ранние эмбрионы угнетающе.

Глюкоза и фосфаты присутствуют в естественном окружении эмбриона в маточных трубах. Однако почему данные вещества являются токсичными в условиях *in vitro*, неизвестно. Полагают, что одновременное присутствие глюкозы и неорганических фосфатов ингибирует митохондриальную активность эмбриона. В процессе метаболизма эмбрион превращает глюкозу в молочную кислоту.

Последняя ингибирует гликолиз, который в свою очередь снова ингибирует митохондриальную активность. Эмбрионы человека продуцируют *in vitro* большое количество молочной кислоты, намного больше, чем *in vivo*. Аминокислоты необходимы для нормального развития эмбриона. Однако в процессе метаболизма аминокислот высвобождается аммоний.

Организм человека имеет буферную систему, которая способна предотвращать вред, наносимый радикалами кислорода клеткам и тканям. Емкость этой буферной системы (TRAP) у здорового человека более чем 1200 моль/л. Величина TRAP во всех средах менее чем 100 моль/л. Создание сред с TRAP, близким к физиологическому значению, возможно, улучшит частоту имплантации за счет исключения или уменьшения повреждающего действия радикалов на эмбрион, клеточные органеллы и мембраны, а также предотвращения затвердевания зоны пеллюцида.

Включение сыворотки или сывороточного альбумина в состав культуральных сред может приводить и к ухудшению результатов культивирования. Причины такого отрицательного действия белковых добавок на преимплантационные эмбрионы млекопитающих до конца не ясны, при этом они, вероятно, не сводятся к качеству различных партий самих реагентов. Так, эмбриотоксичность сыворотки может зависеть от физиологического состояния донора крови, причем отмечена связь с состоянием его репродуктивной системы. В частности, сообщалось о токсическом влиянии на культивируемые *in vitro* зародыши мышей сыворотки крови женщин, страдающих эндометриозом [258] и повторяющимися спонтанными абортами [259].

Вместе с тем среды, наряду с другими компонентами, содержат природное производное пурина — гипоксантин, который в

живых организмах является промежуточным продуктом катаболизма пуриновых оснований. Гипоксантин оказывает отрицательное влияние на развитие двухклеточных мышинных зародышей *in vitro*, а при культивировании *in vitro* зигот мышей некоторых линий гипоксантин может блокировать их развитие на первых делениях дробления [260]. Гипоксантин может оказывать отрицательное воздействие и на гаметы человека, выражающееся в снижении оплодотворяемости яйцеклеток и увеличении частоты цитоплазматической фрагментации эмбрионов. При этом исключение гипоксантина из сред, похоже, улучшает результаты культивирования зигот человека в этой среде [261]. Установлено также блокирующее действие гипоксантина на мейотическое созревание ооцитов крыс и мышей [262]. Добавление белка к средам улучшает результаты культивирования, и авторы предположили, что белок, возможно, связывает некоторые “лишние” компоненты, устраняя, таким образом, их отрицательный эффект [263]. К числу таких “лишних” для преимплантационных эмбрионов млекопитающих компонентов помимо гипоксантина относится, возможно, и никотинамид, входящий в состав многих сложных коммерческих культуральных сред. На это указывает работа, в которой было показано отрицательное влияние никотинамида на культивируемые *in vitro* мышинные эмбрионы [264]. Способность сформировавшихся *in vitro* бластоцист вылупляться *in vitro* из *zona pellucida* является достаточно строгим критерием, позволяющим судить о полноценности этих бластоцист, а, следовательно, и о качестве культуральных сред. В то же время некоторые авторы предлагают использовать для оценки жизнеспособности зародышей способность вылупившихся бластоцист прикрепляться к субстрату, формировать выраженную внутреннюю клеточную массу и обеспечивать разрастание клеток трофэктодермы

[265]. Ранее было показано, что процесс прикрепления также зависит от наличия некоторых аминокислот, однако в использовавшихся в этих опытах средах присутствовала и сыворотка [266]. Таким образом, для прикрепления и разрастания клеток, в отличие от вылупления, необходимо наличие в культуральной среде белка. Вместе с тем сообщалось, что вылупившиеся бластоцисты способны прикрепляться и давать разрастание в среде Хэма F-10 без белка [267].

Изучение развития зародышей млекопитающих в химически определенных средах углубляет наши знания о преимплантационном эмбриогенезе, а с практической точки зрения способствует созданию более эффективных систем культивирования ранних зародышей млекопитающих *in vitro*.

Исследования многих авторов направлены на выяснение механизмов преимплантационного развития эмбрионов. Поскольку их изучение *in vivo* связано с большими техническими и этическими трудностями, исследования многих авторов направлены на изучение данных процессов *in vitro*. Для достижения поставленной цели необходимым является поиск оптимальных систем культивирования, поскольку на сегодняшний день большинство предложенных сред являются субоптимальными и не позволяют добиться 100 % развития до стадии "вылупившейся" бластоцисты.

В последнее время внимание многих исследователей привлекают биологические среды организма, непосредственно влияющие на развитие женских половых клеток, активизирующие процессы капацитации в мужских гаметях, увеличивающие частоту оплодотворения и влияющие на преимплантационное развитие эмбрионов. Это влияние обусловлено гормональным и биохимическим составом биологических сред. Так, для преовуляторной сыворотки характерно высокое содержание ряда

микроэлементов: калия, кальция, магния, фосфора, железа. Высокий уровень ретинола, тиамина, токоферола, никотиновой кислоты. Преовуляторная сыворотка содержит набор специфических белков, гормонов, ростовых факторов, цитокинов, интерлейкинов, ферментов [268].

Общеизвестно, что потребности культивируемых эмбрионов и оптимальные условия для их развития *in vitro* окончательно не определены. Актуальным является вопрос реабилитации эмбрионов человека после процедуры криоконсервирования, в связи с чем появляется необходимость изучения морфофункциональных характеристик эмбрионов человека, после их культивирования в стандартных средах с добавлением биологически-активных жидкостей.

На основании проведенного анализа литературы можно сделать следующие выводы. Преимплантационное развитие эмбрионов человека - сложный, многоэтапный процесс, включающий в себя ряд событий. Изучение механизмов, лежащих в основе развития эмбрионов человека связано с большими техническими и этическими трудностями. Поэтому исследования многих авторов направлены на изучение процессов оплодотворения и раннего развития эмбрионов человека *in vitro*. Развитие методов вспомогательных репродуктивных технологий позволило получать достаточное количество преимплантационных эмбрионов человека и наблюдать за особенностями их развития *in vitro*.

На сегодняшний день нет определенно точного мнения о безопасности растворов криопротекторов для генетического аппарата эмбрионов человека. Нет четких критериев оценки морфологии эмбрионов, перенесших процедуру криоконсервирования. Сегодня невозможно однозначно ответить на вопрос, какой стадии развития

эмбрионов человека отдать предпочтение при замораживании – зиготам, ранним дробящимся эмбрионам или бластоцистам. В настоящее время замораживание и перенос эмбрионов на стадии бластоцисты остаются предметом дискуссий, поскольку эмбрионы *in vitro* находятся в субоптимальных условиях и вопрос создания систем культивирования, обеспечивающих нормальное их развитие, остается открытым. Вопрос о состоянии генетического аппарата эмбрионов человека после процедуры замораживания-оттаивания на сегодняшний день не изучен. Экстенсивная многоцентровая оценка риска врожденной патологии у детей после выполнения программ криоконсервирования ждет своих исследователей.

Таким образом, проблема криоконсервирования эмбрионов человека требует интенсивного изучения. Необходимы дальнейшие углубленные исследования влияния режимов криоконсервирования на морфологические и функциональные свойства данного биообъекта. Полученные данные определяют тактику использования криоконсервированных эмбрионов с учетом их морфологических и функциональных особенностей и безопасности для их генетического аппарата во вспомогательных репродуктивных технологиях для лечения бесплодия.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Общие методические положения

Работа была проведена на базах Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, Центра репродукции и генетики «Имплант» и Института генетики и клеточной биологии Университета Лимбург (Маастрихт, Нидерланды). Работа выполнялась на протяжении 2000 - 2005 гг.

2.2. Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали спермии, яйцеклетки и эмбрионы человека.

Спермии получали из эякулятов мужчин супружеских пар, проходивших курс лечения бесплодия методом ЭКО с ПЭ.

Яйцеклетки аспирировали пункцией яичников у женщин, участвующих в программе ЭКО с ПЭ.

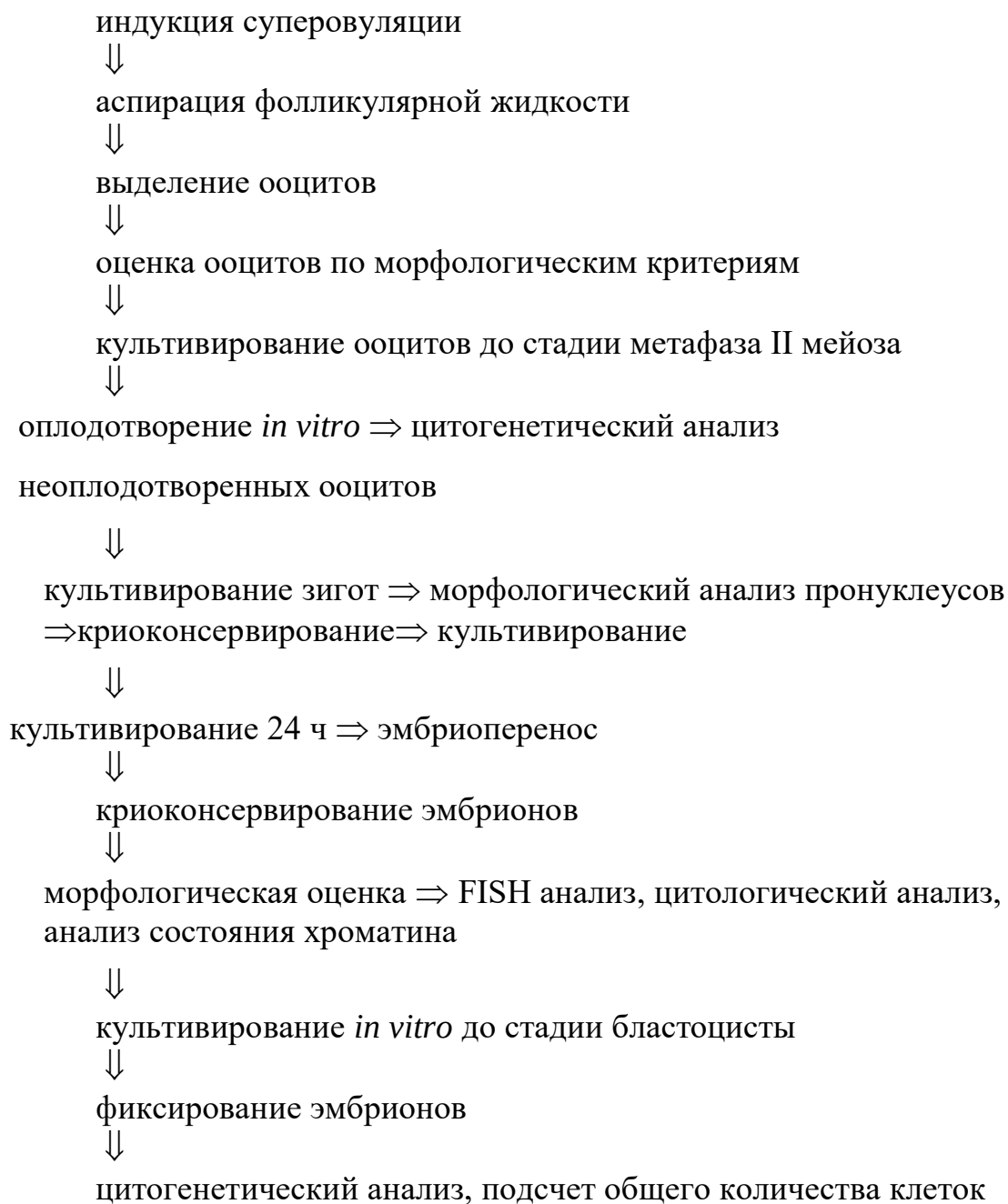
Эмбрионы были получены после инсеминации зрелых ооцитов *in vitro* активноподвижными спермиями, выделенными из эякулята в градиенте плотности Percoll [269].

2.3. Этические аспекты исследования

Все исследования выполнены с соблюдением правил биомедицинской этики [270]. Эмбрионы были использованы по остаточному принципу, после селекции и переноса не более четырех

эмбрионов в полость матки пациентки [271]. На проведение исследований было получено письменное, свободное и информированное согласие пациентов.

2.4.Общая схема исследований



2.5. Методика экстракорпорального оплодотворения и культивирования эмбрионов *in vitro*

2.5.1. Выделение ооцитов из аспирата. Ооциты аспирировали путем трансвагинальной пункции фолликулов через 34-35 ч после инъекции 5000-10000 ед. человеческого хорионического гонадотропина (Profasi “Serono”).

Аспират помещали в предварительно нагретые чашки Петри до 37°C и осуществляли поиск ооцит-корона-кумулюсного комплекса. После его обнаружения, производили предварительную оценку степени зрелости ооцитов по наличию либо отсутствию первого полярного тела и плотности и растяжимости кумулюсного комплекса.

2.5.2. Оценка степени зрелости ооцитов. Визуальную оценку степени зрелости ооцитов проводили под бинокулярной лупой Olympus SZ 11. Ооциты классифицировали по [272], учитывая состояние ооцит - корона - кумулюсного комплекса.

К I степени относили глубоко незрелые ооциты - клеточное окружение необъемное, клетки кумулюса плотно прилегают друг к другу;

II степень - незрелые ооциты, у которых клетки corona radiata окружают ооцит плотным слоем, клетки кумулюса плохо растяжимые;

III степень - ооциты, с дисперсным, хорошо растяжимым кумулюсом, клетки corona radiata плотно прилегают к ооциту;

IV степень - кумулюс расширен, corona radiata окружает яйцеклетку дисперсным венцом. Для ооцита характерна круглая, ровная, гомогенная ооплазма;

V степень - яйцеклетка просматривается в виде тусклой сферы с глыбчатым кумулюсом (рис.2.1).

Рис. 2.1. Ооциты разных степеней зрелости:

а – незрелый ооцит – II-я степень зрелости,

б – зрелый ооцит с плотным кумулюсом – III-я степень зрелости,

в – зрелый ооцит – IV-я степень зрелости,

г – перезревший ооцит – V степень зрелости),

нативный препарат, ув. х 400.

2.5.3. Цитологическое исследование эякулятов.

Эякуляты получали у мужчин после 3-5-ти-дневной сексуальной абстиненции путем мастурбации. Приемником спермы служила стерильная чашка Петри. Эякулят помещали в термостат (при температуре 37°C) до полного разжижения. Объем эякулята измеряли в мерной пробирке; pH определяли сразу же после получения эякулята. Время разжижения оценивали с момента эякуляции до полного разжижения.

После разжижения производили микроскопическую оценку эякулята при увеличении $\times 240$; $\times 480$; $\times 1200$. Для определения концентрации сперматозоидов использовали камеру MacIer (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel, 1980) - специальную камеру для подсчета сперматозоидов, не требующую разведения спермы. При этом 0,01 мл неразбавленного образца спермы помещали на счетную область камеры и закрывали покровным стеклом, имеющим на своей поверхности специальную сетку из ста квадратов. Число сперматозоидов, содержащихся в любых 10 малых квадратах, представляло концентрацию сперматозоидов в млн/мл. Определяли процентное содержание спермиев с быстрой прогрессивной подвижностью (активноподвижные) и с медленной прогрессивной подвижностью (подвижные). Кинезисграмму составляли на основании градации спермиев по скорости движения в камере следующим образом:

группа "а" (с быстрым прогрессивным прямолинейным движением; активноподвижные) – спермии, которым для преодоления расстояния по диагонали одного квадрата требуется менее 4-х сек;

группа "в" (с медленным прогрессивным движением; подвижные)- спермии, преодолевающие путь по диагонали квадрата за 4-10 сек;

группа "с" (без прогрессивного движения) – спермии, затрачивающие на указанный путь 10-30 сек.

Неподвижные спермии по указанной классификации составляют группу "d".

Нормоспермии соответствовали следующие показатели спермограммы: объем: 2-6 мл; pH: 7,2 - 8,0; разжижение: 20-40 мин; концентрация: более 20 млн/мл; содержание спермиев группы "а": более 25 %; группы "в": более 30 %; жизнеспособных: более 75 %; спермиев с нормальной морфологией: более 30 %; лейкоцитов: не более 6 млн/мл; агглютинатов: не более 3-х в поле зрения.

Для описания типов отклонений использовали следующую классификацию:

- Нормоспермия;
- Олигозооспермия - концентрация ниже 20×10^6 /мл;
- Астенозооспермия - менее 50 % спермиев с поступательным движением или менее 25 % с быстрым линейным поступательным движением;
- Тератозооспермия - менее 30 % спермиев с нормальной морфологией;
- Олигоастенотератозооспермия - нарушение всех показателей;
- Азооспермия - нет сперматозоидов в эякуляте;
- Аспермия - нет эякулята.

В работе использовали эякуляты с нормозооспермией и астенозооспермией.

2.5.4. Методика выделения подвижной фракции спермиев из эякулята. При проведении программы экстракорпорального оплодотворения проводили выделение из эякулята фракции спермиев с быстрым прогрессивным прямолинейным движением. Для этого использовали метод “всплывания” - swim up с трехкратным центрифугированием [273]. Для выделения использовали среду Хенкса. Одну часть спермы смешивали с 10 частями среды и центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин. Затем удаляли надосадочную жидкость, осадок смешивали с 4-5 мл среды, многократно пипетировали и повторно центрифугировали в том же режиме, после чего удаляли надосадочную жидкость. На осадок спермиев осторожно наслаивали среду Menepzo B2 в объеме 0,5-0,7 мл, помещали в CO₂-инкубатор с 5 % CO₂ и температурой 37⁰C на 1 ч, установив пробирку под углом 45°. Затем надосадок отбирали в стерильную пробирку и центрифугировали 5 мин со скоростью 2000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, наслаивали 0,3 мл среды Menepzo B2 и помещали в инкубатор на 3 мин. Затем с помощью камеры Makler определяли подвижность и концентрацию сперматозоидов. Полученную суспензию гамет использовали в исследованиях.

2.5.5. Инсеминация ооцитов человека *in vitro*. Полученные ооциты тщательно отмывали от фолликулярной жидкости и клеток крови путем механического пипетирования. Ооциты извлекали из фолликулярной жидкости с помощью капилляра и помещали их в четырехлуночные чашки «Nunc», заполненные средой культивирования ооцитов и ранних эмбрионов человека – IVF-medium (Medi-Cult, Дания). Чашки помещали в CO₂-инкубатор

(«Forma Scientific», США) с температурой 37⁰С, 5 % содержанием CO₂ и влажностью атмосферы 90 %.

Через 4 ч в лунку с ооцитами добавляли аликвоту хорошо диспергированных подвижных спермиев до конечной концентрации 1х10⁶ спермиев в мл. Чашки инкубировали 16-20 ч в CO₂ –инкубаторе [274].

2.5.6. Контроль оплодотворения. Контроль оплодотворения осуществляли через 20 ч после инсеминации под инвертированным микроскопом Olympus IX-60. Клетки кумулюса с поверхности блестящей оболочки удаляли осторожным пипетированием. Учитывали количество пронуклеусов и полярных телец. При нормальном оплодотворении в ооплазме зиготы визуализировали два пронуклеуса. Кроме того, оплодотворенные ооциты характеризовались присутствием первого и второго полярных телец.

2.5.7. Сортировка эмбрионов человека по стадиям развития. Зиготы переносили в чистую среду Medi-Cult. Эмбрионы человека культивировали в среде IVF Medi-Cult в CO₂-инкубаторе при постоянных режимах температуры 37⁰С, влажности 90 % и газового состава (5 % CO₂ в атмосфере инкубатора). Контролировали развитие эмбрионов через каждые 24 ч на протяжении 7-ми суток. Отмечали количество бластомеров, степень их фрагментации, компактность, плотность и прозрачность.

Морфологическую оценку эмбрионов проводили под контролем инвертированного микроскопа Olympus по следующей шкале:

первая категория качества - эмбрионы без каких-либо признаков фрагментации, имеющие бластомеры сферичной формы, плотно

прилегающие друг к другу, со светлой мелкозернистой цитоплазмой, интактной *zona pellucida*, без цитоплазматических фрагментов;

вторая категория качества - наличие бластомеров разной величины и незначительной фрагментацией цитоплазмы (до 10 %);

третья категория качества - присутствие не более 50 % цитоплазматических фрагментов;

четвертая категория качества - более 50% фрагментации цитоплазмы [275].

Через 24 ч культивирования эмбрионы характеризовались наличием 2-4-х бластомеров.

Через 48 ч эмбрионы характеризовались, как правило, наличием 8-ми бластомеров, между которыми значительно увеличивалась площадь контакта, и они образовывали компактный клеточный слой.

После очередного деления (приблизительно через 72 ч культивирования) наблюдали стадию 16-ти бластомеров.

32-клеточная морула образовывалась на 4 сут (96 ч) культивирования.

По мере дробления в центральной части зародыша бластомеры удалялись друг от друга, по периферии они располагались более компактно, и к пятым суткам культивирования преобразовывались в бластоцисту.

2.5.8. Культивирование эмбрионов человека до стадии вылупившейся бластоцисты. Оставшиеся после эмбриопереноса эмбрионы культивировали в среде M-1 Blast-Assist System и, через 48 ч, переносили в среду M-2 Blast-Assist System. Показатель формирования бластоцист рассчитывали как отношение эмбрионов, сформировавших бластоцисты, к общему числу полученных в данной группе эмбрионов.

Бластоцисты классифицировали следующим образом:

ранняя бластоциста - компактизированный эмбрион с началом кавитации;

кавитированная бластоциста - бластоцель занимает менее половины объема эмбриона;

экспандированная бластоциста - бластоцель занимает более половины объема эмбриона с хорошо выраженной трофобластической оболочкой и внутренней клеточной массой;

бластоциста в стадии "вылупления"- истончение и разрыв *zona pellucida*, при котором трофобластическая оболочка выходит из оболочки [241].

Эмбрионы отличного качества (не более 4-х) через 48 ч культивирования переносили в полость матки пациентки. Оставшиеся эмбрионы криоконсервировали, либо культивировали до стадии бластоцисты.

2.5.9. Перенос эмбрионов в полость матки. Заполняли стерильный шприц объемом 1 мл средой для культивирования. Извлекали из стерильного пакета катетер для переноса (Bourn - Wallace; HG Wallace Ltd). Присоединяли шприц со средой к катетеру и промывали. Втягивали небольшой пузырек воздуха в конец катетера, после чего набирали эмбрионы в 10 мкл среды и, затем снова набирали небольшой пузырек воздуха для маркирования положения эмбрионов в катетере. Пользуясь наружным футляром, как стабилизатором, осторожно вводили катетер через канал шейки матки в полость и производили трансплантацию эмбрионов. Контроль эффективности эмбриопереноса осуществляли микроскопическим исследованием оставшейся в катетере среды.

2.6. Методы приготовления цитогенетических препаратов из преимплантационных эмбрионов человека

2.6.1. Приготовление препаратов для световой микроскопии. Цитологические препараты преимплантационных эмбрионов человека готовили по методу Тарковского [276]. Эмбрионы помещали в часовое стекло, содержащее 1 мл гипотонического раствора 1 % трехзамещенного цитрата натрия. Время воздействия гипотонического раствора на эмбрионы варьировало в зависимости от стадии их развития: эмбрионы на стадии ранней морулы - 10 мин, на стадии бластоцисты - 20 мин. В этих условиях эмбрионы заметно разбухали, поэтому для их переноса на предметное стекло использовали микропипетку с отверстием большого диаметра. Эмбрион в капле гипотонического раствора помещали на предметное стекло, осторожно оттягивали фильтровальной бумагой раствор цитрата натрия так, чтобы капля остаточного раствора не превышала в диаметре 2 мм, и быстро наносили 1 каплю (0,02 мл) свежеприготовленного фиксатора, состоящего из смеси 3 частей метанола и 1 части ледяной уксусной кислоты. Во избежание действия на эмбрион паров фиксатора его капали с высоты не менее 2 см. Потоки воздуха способствовали высыханию фиксатора. Затем стекло с зафиксированными эмбрионами опускали на 10 мин в краситель Романовского - Гимза. После окрашивания препараты промывали в дистиллированной воде и высушивали на воздухе.

2.6.2. Приготовление препаратов для цитогенетического анализа хромосом. Гипотоническая обработка эмбрионов проводилась аналогично методу Тарковского.

Эмбрионы в минимальном количестве гипотонического раствора помещали в часовое стекло с холодным фиксатором (смесь ледяной уксусной кислоты с метанолом в пропорции 1:3). После десятиминутной фиксации эмбрион переносили на стекло и наносили размягчающий фиксатор (смесь уксусной кислоты и метанола в соотношении 0,75:1), а затем окончательно фиксировали раствором ледяной уксусной кислоты и метанола в соотношении 1:1.

2.6.3. Цитогенетический анализ фиксированных препаратов методом кариотипирования. После фиксации препараты высушивали. Окрашивание проводили 1% раствором красителя Романовского-Гимза в течение 10 мин. Анализ состояния хромосом проводили при увеличении $\times 900$, с помощью программы анализа изображений MetaScan. Производили раскладку хромосом по группам, согласно Денверской классификации [277].

2.6.4. Молекулярно-генетический метод анализа хромосом с флюоресцентной гибридизацией *in situ*. Нативные и криоконсервированные эмбрионы переносили из стандартных условий культивирования на 10 мин в раствор проназы (5 mg/ml (Sigma, США) для удаления блестящей оболочки. Только после полного протеолиза *zona pellucida*, эмбрионы переносили в среду культивирования. Бластомеры промывали от остаточного действия проназы осторожным пипетированием. Каждый бластомер фиксировали HCL/TWEEN-20 буфером (0,01 M). Предметные стекла дегидратировали в солевом растворе фосфатного буфера, после чего пропускали через серию растворов с повышающейся концентрацией этанола: 70-90-99 % (выдерживали препарат по 20 сек в каждом

растворе). Высушивание препаратов проводили при комнатной температуре [278].

Для флюоресцентной гибридизации *in situ* использовали зонды (Multi Vysion PB) для детекции теломерных участков хромосом 13, 21, 22 и центромерных участков хромосом 16 и 18. Зонды различали по области гибридизации на хромосоме и флюоресцентном ярлыке:

LSI 13 (область 13q14, спектр красный);

CEP 16 (вторичный спутник, D16Z3, спектр aqua);

CEP 18 (спутник альфы D18Z1, спектр синий);

LSI 21 (область 21q22. 13-21q22. 2, спектр зеленый);

LSI 22 (область 22q. 11.2, спектр золотой).

0,5 мкл пробы наслаивали на эмбрион. Сверху помещали покровное стекло. Стекла инкубировали 8 ч при температуре 37°C.

Постгибризационное отмывание включало 2-мин инкубирование препаратов в растворе 2xSSC/0,05% Tween20 при 42°C, 7- мин отмывание в растворе 0,6xSSC при 60°C и финальное 2-х минутное отмывание в растворе 2xSSC/0,05% Tween при комнатной температуре.

Для окончательной дегидратации помещали стекла в растворы с повышающейся концентрацией этанола.

Перед идентификацией хромосом на препарат наносили противовыцветающий реагент Dapi II.

Микроскопический анализ проводили при увеличении 100x10 с использованием инвертированного микроскопа Olympus BX 100 с флюоресцентной насадкой и системой анализа изображений FISH Vysis PB.

Оценка включала документацию числа ядер в каждом бластомере, классификацию каждого бластомера как нормального

(диплоидного), патологического или не поддающегося оценке (ядра были найдены, но сигналы FISH не визуализировались).

2.6.5. Цитологический анализ фиксированных эмбрионов. После приготовления фиксированных препаратов подсчитывали общее количество бластомеров, отмечали степень их базофильности, расположение, состояние и количество ядрышек. Подсчитывали общее количество бластомеров, находящихся в интерфазе и профазе, метафазе, анафазе и телофазе митоза. Количество митотически делящихся клеток представляли как отношение количества бластомеров, находящихся в митозе к общему количеству клеток, выраженное в процентах.

Бластомеры, находящиеся в метафазе, рассматривали под иммерсией при увеличении $\times 1000$. При анализе прохождения бластомерами этапа деления использовали классификацию Алова И.А. [279]. Рассматривали следующие виды патологий митоза:

1. Патологии, связанные с повреждением митотического аппарата.
2. Патологии, связанные с повреждением хромосом.
3. Нарушение цитотомии.

2.7. Постановка криобиологического эксперимента

2.7.1. Методика эквilibрации эмбрионов с растворами криопротекторов.

Эквilibрацию в растворах криопротекторов осуществляли одноступенчато. Для этого эмбрионы в минимальном объеме культуральной среды помещали в каплю (100 мкл) с растворами (0,5M, 1M, 1,5 M, 2M) криопротекторов в культуральной среде на

разные промежутки времени 5, 10, 20 мин. Данная процедура была проведена при разных температурах: - 0,22°C и 37°C. После эквilibрации эмбрионы переносили в 0,5М р-р сахарозы на 10 мин при 22°C для удаления криопротектора. Из раствора сахарозы эмбрионы переносили в стандартную среду культивирования, трехкратно отмывали от криопротектора и помещали в CO²-инкубатор.

2.7.2. Методика криоконсервирования эмбрионов с использованием медленного охлаждения. Перед охлаждением эмбрионы насыщали раствором криопротекторов. Для этого эмбрионы из культуральной среды переносили в растворы с повышающейся концентрацией 1,2-пропандиола: 0,5 М, 1М, 1,5М. Общее время эквilibрации составляло 20 мин. Затем эмбрионы помещали в соломинки (CryoBioSystem, Франция). Сначала соломинку заполняли 20 мкл среды, затем втягивали небольшой пузырек воздуха, после чего набирали эмбрионы в 10 мкл среды и, снова набирали небольшой пузырек воздуха для маркирования положения эмбрионов в катетере.

Соломинки помещали в предварительно стабилизированную камеру замораживателя CryoSon.

Эмбрионы охлаждали со скоростью 2 C°/мин от 22 до -5,5° C. После «сиддинга» охлаждение вели со скоростью 0,3° C/ мин до – 32°C, после чего пайеты погружали в жидкий азот (ЖА).

2.7.3. Методика отогрева криоконсервированных эмбрионов. Оттаивание эмбрионов производили быстро, путем 30 сек инкубирования соломинок при комнатной температуре и

последующим их выдерживанием в водяной бане при температуре 37°C. После исчезновения кристаллов льда образец выдерживали при комнатной температуре 5 мин. Эмбрионы высвобождали из пайеты и осуществляли их перенос в среды с убывающей концентрацией растворов криопротекторов. Проводили морфологическую оценку эмбрионов при помощи световой микроскопии. Затем эмбрионы помещали в стандартную среду культивирования (Medi-Cult), в пластиковых четырехлуночных планшетах, которые помещали в CO²-инкубатор. Оценка морфологии эмбрионов проводили повторно через 1 ч культивирования.

2.7.4. Удаление криопротекторов после оттаивания. Удаление растворов криопротекторов из проб, замороженных медленно, осуществляли следующим образом. Поскольку охлаждение образцов проводили под защитой проникающего криопротектора, после размораживания клеток его необходимо было удалить, во избежание повреждения бластомеров в результате осмотического шока. После удаления эмбрионов из соломинки их переносили в среды, содержащие уменьшающиеся концентрации криопротекторов.

2.8. Оценка жизнеспособности эмбрионов человека

2.8.1. Прижизненная световая микроскопия эмбрионов. Оценка морфологии производили под инвертированным микроскопом Olympus BX 100 (ув. x600). Использовали систему анализа изображений Scion Image for Windows, 2000. Учитывали количество бластомеров, их диаметр и плотность межклеточного контакта;

степень фрагментации, прозрачность и гомогенность цитоплазмы, наличие цитоплазматических вакуолей и состояние *zona pellucida*.

При морфологической оценке эмбрионов, перенесших криоконсервирование, применяли визуальный метод морфологической сохранности [280]. Отмечали следующие особенности морфологии эмбрионов:

Состояние бластомеров (полностью сохранены, разбухли, лизировали, дегенерировали).

Состояние *zona pellucida* (целая, разорвана, утрачена, утолщена).

Состояние цитоплазмы (цвет, прозрачность, плотность, гомогенность).

Форма эмбрионов (компактность, симметричность).

2.8.2. Изучение состояния хроматина эмбрионов методом флюоресцентного окрашивания красителем Hoechst 33342. Приготовление окрашивающего раствора. Раствор №1 - 25 мг красителя Hoechst 33342 (Sigma В 2261) растворяли в 2,5 мл дистиллированной воды. Хранили при 4°C. Раствор №2 - в день использования 5 мл раствора №1 растворяли в 10 мл среды культивирования, содержащей 1 мг/мл поливинилпироллидона. Концентрация раствора 5µг/мл. Рабочий раствор - 200µл раствора №2 растворяли в 800µл среды культивирования с ПВП до конечной концентрации 1 µг/мл.

Для окрашивания эмбрионы помещали в каплю (50 µл) рабочего раствора на 10 мин. Отмывали эмбрионы поэтапно, перенося клетки в чистую среду культивирования с ПВП.

Подсчет ядер и их морфометрию осуществляли на инвертированном микроскопе с флюоресцентной насадкой USIO USH 102 D, используя фильтр NU в области спектра 334-465 нм [281].

2.8.3. Определение конденсации нуклеарного хроматина спермиев. Оценку состояния хроматина спермиев проводили по [282].

Базисный раствор красителя готовили из 1 г акридина оранжевого в 1000 мл дистиллированной воды. Краситель готовили, добавляя к 10 мл базисного раствора 40 мл 0,1 М раствор лимонной кислоты и 2,5 мл раствора 0,3 М $\text{NaHPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$.

К эякуляту добавляли равное количество р-ра Хенкса, ресуспендировали и дважды центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин. На обезжиренном предметном стекле готовили средней толщины мазок и оставляли для высыхания в течение 20 мин. Мазок фиксировали в растворе Carneys (метанол/уксусная кислота 3:1). На мазок наносили 2 мл красителя и экспонировали 5 мин. После этого стекла промывали дистиллированной водой.

Мазки изучали немедленно на инвертированном микроскопе с флюоресцентной насадкой USIO USH 102 D, используя фильтр NU в области спектра 490 нм и барьерный фильтр с длиной волны 530 нм.

2.8.4. Качественный анализ мРНК генов *bcl-2* и *baх* в нативных и криоконсервированных преимплантационных эмбрионах человека. Для выделения мРНК эмбрион человека помещали в лизирующий раствор (400 мкл 6М гуанидин тиоционата с добавлением β -меркаптоэтанола до конечной концентрации 2%). Образец гомогенизировали. Супернатант после центрифугирования

при 9000g в течении 15 мин переносили в чистую пробирку, содержащую биотинилированный поли- (dT) праймер (70 пМ на пробу).

После центрифугирования (14000 g, 15 мин) к супернатанту добавляли 30 мкл магнитных частиц (1 мг/мл) с иммобилизированным стрептовидином. После инкубации в течение 10 мин магнитные частицы промывались четырехкратно 70% этанолом и мРНК элюировалась в 50 мкл воды, свободной от РНКаз при 70°C в течение 5 мин.

Качество выделения мРНК контролировали при помощи электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом.

Синтез кДНК проводили с использованием олиго(dT)-праймера (Силекс М, Россия) по протоколу производителя.

Для проведения ПЦР использовали праймеры, специфичные к нуклеотидным последовательностям генов *bax*:

прямой: 5'-ATCCAGGATCGAGCAGGGCG-3',

обратный: 5'-CGCCGCTCCCGGAGGAAGTCC-3'

и *bcl-2*:

прямой: 5'-ACGACTTCTCCCGCCGCTAC-3'

обратный: 5'-ATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3'

Для усиления RT-PCR, использованы праймеры:

bax -5'-CTGCACAGGGCCTTGAGCAC-3'

bcl-2-5'-GGCGATGTTGTCCACCAGGG-3'

Праймеры были синтезированы в НПО Литех (Россия).

ПЦР проводили в объеме 25 мкл на термоциклере Терцик М-2 (ДНК-технология, Россия). Реакционная смесь содержала 2,5 мкл 10x буфера для ПЦР, 1 ед Taq-полимеразы, по 100 мкМ каждого dNTP и 2,5мМ MgCl₂.

Содержание праймеров – 0,2 мкМ на каждую пробу.

Температура отжига праймеров - 64°C, количество циклов – 35.

Полученный в ходе амплификации продукт (специфические фрагменты ДНК) определялись после проведения электрофореза в агарозном геле и окрашивания этидием бромидом [283].

2.9. Сокультивирование эмбрионов человека

2.9.1. Получение фолликулярной жидкости и выделение клеток кумулюса и гранулезы. Фолликулярную жидкость получали на 12-14-й день менструального цикла у женщин в возрасте 20 - 42-х лет путем аспирации фолликулов через 34-35 ч после инъекции 50000-10000 ед. человеческого хорионического гонадотропина. После выделения ооцитов, фолликулярную жидкость разделяли на две части. Первый образец центрифугировали при 200g 10 мин, после чего собирали надосадочную жидкость. Вторым образцом использовали для выделения клеток кумулюса и гранулезы. Для этого фолликулярную жидкость помещали в конические центрифужные пробирки и оставляли при комнатной температуре на 1 ч. После осаждения клеток (без центрифугирования), надосады удаляли. Оставшиеся клетки ресуспендировали в 3 мл культуральной среды. Производили трехкратную отмывку клеток кумулюса и гранулезы от эритроцитов и других клеток дебриса. Клетки помещали в лунку и наслаивали 1 мл культуральной среды под минеральным маслом. Клетки культивировали 16 -20 ч. Отмечали адгезию и рост клеток на поверхности чашек. При наличии 3-4 пассажей и покрытии 40% площади лунок на монослой пересаживали эмбрионы для последующего культивирования [284].

2.9.2. Получение преовуляторной сыворотки крови. Преовуляторную сыворотку крови готовили из крови пациенток, взятой за 48 ч до предполагаемой аспирации фолликулов. Кровь помещали в центрифужные пробирки, центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Отбирали надосадочную жидкость [285].

2.10. Биохимические методы исследования

2.10.1. Определение концентрации общего белка в сыворотке крови. Содержание общего белка исследовали унифицированным методом по биуретовой реакции, определяли фракции сывороточного белка с помощью метода электрофоретического разделения на ацетат-целлюлозной пленке [286].

2.10.2. Количественное определение свободных аминокислот в сыворотке крови. Количественное определение свободных аминокислот в сыворотке крови проводили по методу PICO-TAG на аминокислотном анализаторе «Waters». Анализ аминокислотного состава включал: гидролиз белков для получения свободных аминокислот, предколоночную дериватизацию образцов и анализ, с помощью метода обращенной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для получения свободных аминокислот образцы сывороток (25 мкл) выпаривали в вакуумной сушке. Затем к пробам добавляли сушащий раствор (метанол: ацетат натрия: TiA, 2:2:1) 10 мкл и вновь помещали в вакуумную сушку на 60 мин. Дериватизацию образцов проводили с помощью внесения дериватизационного

раствора (метанол, TiA, Pits, бидистиллят) по 20 мкл, после чего пробы выпаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха (40°C) в течение 20 мин. Сухой остаток дериватизированного образца растворяли в 100 мкл растворителя (Sample Set Diluent). Затем образцы помещали в инжектор хроматографа. Объем микроинъекции составил 4 мкл стандартов и экстракта биопробы, что соответствует 0,001 мл сыворотки [287].

2.10.3. Методики исследования содержания гидроперекиси липидов и антиоксидантной активности фолликулярной жидкости и преовуляторной сыворотки крови. Гидроперекиси липидов определяли в среде, содержащей 0,2 М глициновый буфер, pH 3,6, 0,3 мМ FeCl₃, 0,3 мМ ионола. Окрашивание проводили с 2-тиобарбитуровой кислотой. Количество продуктов реакции определяли по оптической плотности при разности длин волн 535-580 нм, принимая коэффициент экстинкции $1,56 \times 10^5 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Активность глутатионпероксидазы определяли методом по окислению NADPH в сопряженной глутатионредуктазной системе.

Селензависимая глутатионпероксидазная активность определялась с субстратом H₂O₂, а селен-независимая - по разности между общей глутатионпероксидазной активностью (с субстратом гидроперекись кумола) и селензависимой.

Глутатионпероксидазную активность регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Specord UV VIS при 340 нм в среде, содержащей 50 мМ калий-натрий фосфатный буфер, pH 7,4, 1 мМ ЭДТА, 0,15 мМ NADPH, 1 мМ GSH, 0,5^{ед}/мЛ глутатионредуктазы из дрожжей, 0,4 мМ H₂O₂ или 1,2 мМ гидроперекиси кумола. В случае определения селензависимой глутатионпероксидазы (с субстратом

H_2O_2) реакционная среда дополнительно содержала 3мМ азида Na для ингибирования каталазы. Активность регистрировали при 37°C и постоянном перемешивании. Глутатионпероксидазную активность выражали в нмоль NADPH на 1 мл фолликулярной жидкости за 1 мин, принимая коэффициент молярной экстинкции равным $6.22 \cdot 10^3 \text{ м}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Глутатион-S-трансферазную активность определяли спектрофотометрически при 310 нм по образованию продукта конъюгации 1-хлор-2,4-динитробензола (ХДНБ) с GSH.

При определении глутатион-S-трансферазной активности в фолликулярной жидкости среда содержала 0,1 м калий-фосфатный буфер, pH 6,5, 5 мМ GSH, 1 мМ ХДНБ. Активность выражали в нмоль образовавшегося продукта конъюгации ХДНБ с GSH на 1 мл фолликулярной жидкости за 1 мин, принимая коэффициент молярной экстинкции равным $9,6 \cdot 10^3 \text{ м}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Глутатионредуктазную активность определяли спектрофотометрически при 340 нм по убыли NADPH в 50 мМ калий фосфатном буфере, pH 7,4, 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ NADPH, 1 мМ GSS, температура 37° С. Активность выражали в нмоль NADPH на 1 мл фолликулярной жидкости за мин, используя коэффициент молярной экстинкции равным $6,22 \cdot 10^3 \text{ м}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Определение эффективности перехвата $\text{OH}\cdot$ радикалов фолликулярной жидкостью и сывороткой кордовой крови человека определяли по методу [286]. $\text{OH}\cdot$ радикал, генерируемый в Фентоновской системе, превращал деоксирибозу в продукт, который образовывал окрашенный комплекс с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Используемая среда содержала 25 мМ калий фосфатный буфер, pH 7,4, 100 мкМ FeCl_3 , 104 мкМ ЭДТА, 100 мкМ аскорбата, 1 мМ H_2O_2 , 3 мМ деоксирибозы. Инкубацию проводили

в течение 1 ч при температуре 37°C. Определение окрашенного продукта проводили, записывая спектр поглощения продукта на спектрофотометре Specord UV VIS и регистрируя оптическую плотность при разности длин волн 532-580 нм. Эффективность перехвата $\text{OH}\cdot$ радикалов ловушками $\text{OH}\cdot$ радикалов и биологически активными средами оценивали по степени ингибирования (в % к контролю) и в единицах оптической плотности.

2.10.4. Исследование концентрации стероидных гормонов в фолликулярной жидкости и преовуляторной сыворотки крови. Гормональный спектр биологически активных жидкостей исследовали с помощью Bio-Rad NovaPath Test по стандартной методике [286]. Исследование уровней половых гормонов (эстрадиола, прогестерона, тестостерона) в фолликулярной жидкости проводили методом трехфазного иммуноферментного анализа по определению количества связанного конъюгата соответствующего фермента. Количество исследуемого гормона в пробе было обратно пропорционально количеству конъюгата фермента, связавшегося в результате реакции. В результате фермент-субстратной реакции образовывался окрашенный продукт. Стандартная кривая показывала зависимость интенсивности окрашивания от концентрации исследуемого гормона в исследуемой жидкости. Концентрацию гормона в пробе вычисляли исходя из этой калибровочной кривой.

2.11. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку экспериментальных данных производили по методу Стьюдента и на IBM PC Pentium-II с использованием пакета программ Microsoft Excel.

Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия с уровнем значимости 5% [288].

РАЗДЕЛ 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Морфофункциональные характеристики нативных и криоконсервированных эмбрионов человека

Криоконсервирование эмбрионов является важной интегральной составляющей вспомогательных репродуктивных технологий, от эффективности которой зависит кумулятивная частота наступления беременности в программе экстракорпорального оплодотворения. Изучение фундаментальных аспектов и совершенствование методов криоконсервирования с целью получения компетентных к развитию эмбрионов человека являются залогом успешной реализации программы ЭКО.

Процесс криоконсервирования биологических объектов – комплексный, первым этапом которого является замещение физиологической среды, которая в норме окружает эмбрионы, средой, содержащей криопротекторы и экспозиция эмбрионов на протяжении определенного времени при заданной температуре. В связи с этим на первом этапе нашего исследования изучали уровень жизнеспособности эмбрионов в условиях *in vitro* после обработки их растворами криопротекторов.

3.1.1. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов человека после эквilibрации с растворами криопротекторов. Технология глубокого замораживания и оттаивания зародышей предусматривает следующие этапы: выбор

типа криопротектора и его оптимальной концентрации; приготовление криозащитных растворов; качественная оценка зародышей, насыщение их криопротектором; постепенное охлаждение эмбрионов; перенос эмбрионов в жидкий азот и их хранение; оттаивание при определенной температуре; удаление криопротектора; морфологическая оценка эмбрионов на пригодность к трансплантации.

В первой серии экспериментов обратил на себя внимание феномен, что уже на этапе переноса эмбрионов, находящихся в культуральной среде при 37°C в среду с температурой 22°C происходят повреждения осмотической природы (сжатие blastomeres, изменение межклеточной адгезии). Поэтому в дальнейшем эмбрионы охлаждали в среде культивирования при 37 – 22°C со скоростью 0,7°C/мин, затем переносили в растворы криопротекторов. В данной серии экспериментов нами был выбран раствор 1,2-пропандиола в концентрациях 1, 1,5 и 2М, приготовленный на фосфатно-буферной среде. Эмбрионы, которые экспонировали в стандартной культуральной среде фирмы Medi-Cult при 0, 22 и 37°C в течение 5 и 10 мин без раствора криопротектора, использовали в качестве контроля (рис.3.1).

Выживаемость эмбрионов после экспозиции с растворами криопротекторов оценивали по их способности к прохождению следующего деления дробления.

I группу составили 4-х клеточные эмбрионы, этап насыщения у которых проводили с 1М, II – с 1,5М и III - с 2М раствором 1,2-ПД.

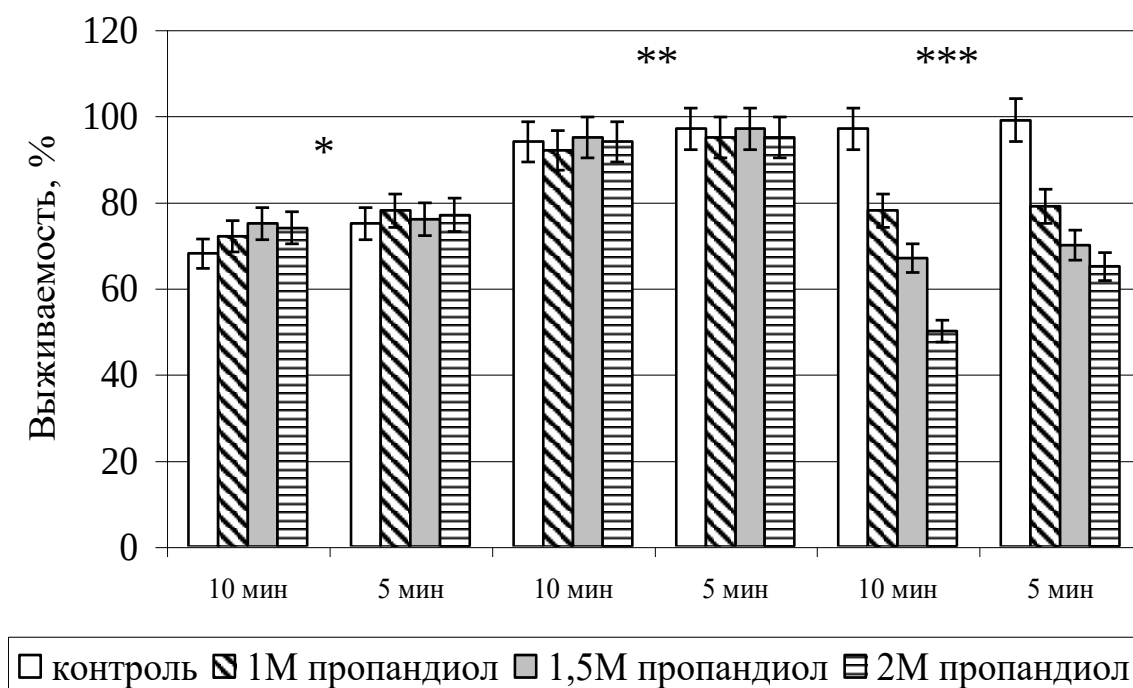


Рис. 3.1. Выживаемость 4-клеточных эмбрионов человека после экспозиции 5 и 10 мин в растворах различных концентраций 1,2-ПД (* – 0°C, ** – 22°C, *** – 37°C).

После 10 мин экспозиции эмбрионов контрольной группы при физиологических условиях (37°C) выживаемость составила $97,6 \pm 2,3$ % случаев, при температуре 22°C – $94,4 \pm 3,5$ % и жизнеспособность эмбрионов достоверно ($p < 0,01$) снижалась при

температуре 0°C – только $68 \pm 4,9\%$ эмбрионов дробились после переноса в стандартную среду культивирования *in vitro*.

Введение в среду эквilibрации растворов криопротекторов при 37°C приводило к снижению выживаемости эмбрионов ($p < 0,01$).

Очевидно, это является свидетельством цитотоксичности данного криопротектора по отношению к 4–клеточным эмбрионам человека при 37°C.

Десятиминутная экспозиция 4–клеточных эмбрионов при 22°C, которая моделирует процедуру насыщения криопротектором в технологическом процессе, не влияла на их выживаемость и составила для контроля, I, II и III групп соответственно $94,4 \pm 3,5$; $92,9 \pm 3,4$; $95,9 \pm 2,7$ и $94,3 \pm 3,7\%$.

Была осуществлена 10-мин экспозиция эмбрионов в растворах криопротекторов при 0°C. Выживаемость контрольных эмбрионов при этом достоверно снижалась, по-сравнению с выживаемостью эмбрионов при 22 и 37°C и имела лишь тенденцию к повышению при добавлении растворов криопротекторов ($p > 0,05$).

Таким образом, первая серия исследований позволила установить, что существует зависимость между жизнеспособностью и температурой экспозиции эмбрионов человека.

Снижение времени экспозиции до 5 мин существенным образом не повлияло на жизнеспособность ранних эмбрионов. Однако, учитывая тот факт, что уменьшение времени экспозиции эмбрионов в растворе криопротектора с целью снижения его цитотоксического влияния не дает возможности полного насыщения, было принято решение применить 10-мин экспозицию на этапе насыщения эмбриона раствором криопротектора.

Таким образом, первый этап исследований показал, что экспозиция в растворах криопротекторов как первого этапа криоконсервирования влияет на жизнеспособность эмбрионов. Существует зависимость жизнеспособности эмбрионов человека от температуры экспозиции, концентрации криопротектора и времени экспозиции.

Следовательно, насыщение 4-х клеточных эмбрионов человека следует проводить при температуре 22°C. При этом, во избежание температурного шока необходимо постепенное снижение температуры среды культивирования от 37 до 22°C со скоростью 0,7°C/мин.

3.1.2. Морфологические характеристики 4-клеточных эмбрионов человека до и после криоконсервирования. Целью данного этапа работы явился сравнительный анализ морфологии преимплантационных эмбрионов человека до и после криоконсервирования при использовании комплексной системы оценки качества эмбрионов после 48 ч культивирования для разработки критериев отбора эмбрионов для криоконсервирования и при последующем их использовании во вспомогательных репродуктивных технологиях при лечении бесплодия.

Наиболее известный способ криоконсервирования эмбрионов человека основан на инкубации ранних эмбрионов человека в криоконсервирующем растворе при комнатной температуре [104]. Раствор содержит 1,5 М раствор 1,2-ПД и 0,1 М раствор сахарозы. Охлаждение ведется от комнатной температуры (22°C) до -7°C со скоростью 2°C/мин, ручная инициация кристаллизации при -7°C, охлаждение со скоростью 0,3°C/мин до -30°C с последующим

погружением образцов в жидкий азот. Предполагается дальнейший быстрый отогрев образцов на водяной бане при температуре 30°C. Эмбрионы I группы были криоконсервированы с применением данного метода.

В этой серии экспериментов определили температуру кристаллизации криоконсервирующего раствора, которая составила -5°C. Исходя из этого, было сделано предположение, что при снижении температуры инициации кристаллизации («сиддинг») до -7°C возможна спонтанная кристаллизация раствора. Поэтому II исследуемую группу составили эмбрионы, которые криоконсервировали по следующей программе: 10-минутная экспозиция эмбрионов в 1,5 М растворе 1,2-ПД; охлаждение от комнатной температуры до -5°C со скоростью 0,7°C/мин, инициация кристаллизации при -5°C; медленное охлаждение со скоростью 0,3°C/мин до -32°C; опускание образцов в жидкий азот.

III группу эмбрионов криоконсервировали следующим образом: 10-минутная экспозиция в 1,5 М растворе 1,2-ПД; охлаждение от 22 до -5°C со скоростью 0,7°C/мин; 10-минутная стабилизация - для выравнивания температуры по всему объему образца, ручной «сиддинг» при -5°C, медленное охлаждение со скоростью 0,3°C/мин до -32°C; погружение образцов в жидкий азот.

Отогрев образцов проводили быстро на водяной бане при температуре 30°C.

В ходе исследования сравнивали эффективность разных способов криоконсервирования эмбрионов человека после 48 ч культивирования *in vitro*. I группу составили 163, II - 166 и III группу - 157 эмбрионов. Морфологическую и морфометрическую оценку

проводили непосредственно перед криоконсервированием и после оттаивания.

Показанием к ЭКО у всех больных явилось трубно-перитонеальное бесплодие вследствие непроходимости или отсутствия маточных труб. Показатели спермограммы у мужей соответствовали нормоспермии. Возраст больных, среднее количество аспирированных ооцитов и полученных эмбрионов были сравнимы во всех исследуемых группах ($p>0,05$). (табл. 3.1).

Таблица 3.1

**Средний возраст, количество ооцитов и эмбрионов у
пациенток исследуемых групп**

Клинические показатели	Исследуемые группы, $M \pm m$		
	I группа	II группа	III группа
Возраст пациенток, годы	31,3 $\pm$ 0,42	30,7 $\pm$ 0,33	29 $\pm$ 0,49
Количество аспирированных ооцитов	9,05 $\pm$ 0,26	10,2 $\pm$ 0,27	9,84 $\pm$ 0,24
Количество эмбрионов	8,53 $\pm$ 0,23	9,04 $\pm$ 0,25	8,52 $\pm$ 0,18

Примечание: разница между группами недостоверна, $p>0,05$.

Морфологическими признаками при оценке жизнеспособности эмбрионов служили объем бластомеров, прозрачность и гомогенность цитоплазмы, расположение клеток, величина перивителлинового

пространства и состояние *zona pellucida*. Идеальный эмбрион должен быть компактным, сферической формы, с однородной окраской, с клетками одинаковой величины, с гладкой и равномерно сформированной зоной пеллюцида, без включений в перивителлиновом пространстве.

Биологически полноценными считали эмбрионы правильной шарообразной формы, имеющие гомогенную светлую цитоплазму, прозрачную неповрежденную оболочку, одинаковый размер, а также бластомеры с плотным межклеточным контактом.

Эмбрионы всех анализируемых групп до криоконсервирования находились на одной стадии развития, характеризовались наличием интактной блестящей оболочки, правильными, плотно прилегающими друг к другу бластомерами и светлой, мелкозернистой цитоплазмой с отсутствием вакуолярных и цитоплазматических включений (табл. 3.2).

В данной серии экспериментов изучали следующие морфологические характеристики эмбрионов:

- интактность бластомеров;
- размер бластомеров;
- наличие цитоплазматической фрагментации;
- прозрачность и гомогенность цитоплазмы;
- наличие цитоплазматических вакуолей;
- разрыв *zona pellucida*;
- плотность контакта бластомеров.

Анализировали динамику изменения указанных морфологических признаков после процедуры замораживания-отогрева.

Таблица 3.2

Морфологические характеристики эмбрионов человека до и после криоконсервирования

Характеристики эмбриона	Эмбрионы, М±m					
	I группа n =163		II группа n =166		III группа n =157	
	До замораживания	После оттаивания	До замораживания	После оттаивания	До замораживания	После оттаивания
Бластомеры интактны	96,7±0,7	52,1±5,1	97,1±0,9	60,5±0,5	96,3±0,3	85,4±0,6**
Одинаковый размер бластомеров	85,9±0,1	62,8±2,8	88,6±0,7	65,2±0,8	89,7±1,7	67,8±2,1*
Наличие не более 25% внеклеточной фрагментации	83,1±3,2	43,8±1,0	85,4±0,6	68,8±1,0	82,2±0,2	78,9±0,9*
Прозрачность и гомогенность цитоплазмы	96,2±0,2	69,7±1,7	67,8±2,1	59,5±0,8	98,1±0,1	96,5±1,5**
Наличие цитоплазматических вакуолей	-	12,2±0,2	-	4,7±0,7***	-	-
Разрыв <i>zona pellucida</i>	-	8,1±0,1	-	1,2±1,2	-	-
Плотный межклеточный 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

Примечания:

- 1.* – в сравнении с эмбрионами после криоконсервирования I и II групп, $p < 0,05$;
- 2.** – в сравнении с эмбрионами после криоконсервирования I и II групп, $p < 0,01$;
- 3.*** – в сравнении с первой группой, $p < 0,001$;
4. – признак отсутствует.

В ходе исследования было установлено, что эмбрионы до криоконсервирования характеризовались высокой степенью интактности бластомеров. Бластомеры нативных эмбрионов всех трех групп имели одинаковый диаметр, правильную круглую форму и симметричное расположение относительно друг друга (рис. 3.2).

Рис. 3.2. Эмбрионы человека III группы (до криоконсервирования), находящиеся на стадии 4-х бластомеров с интактными, ровными, симметричными бластомерами. Нативный препарат, х 200.

При оценке качества эмбрионов принята 4-х-бальная шкала с учетом следующих параметров: первая категория качества – равномерные, симметричные бластомеры без фрагментации, вторая категория качества – легкая асимметрия бластомеров и небольшая цитоплазматическая фрагментация, третья категория качества – увеличение асимметрии между бластомерами и цитоплазматической фрагментации, четвертая категория качества – наличие одного интактного бластомера и интенсивная цитоплазматическая фрагментация эмбриона.

Количество поврежденных бластомеров возрастало со снижением температуры инициации кристаллизации. Большинство эмбрионов I и II групп характеризовались разрушением от одного, до полного лизиса всех бластомеров (рис. 3.3, 3.4, 3.5).

Рис. 3.3. Деконсервированный 4-клеточный эмбрион человека II группы. Повреждение одного бластомера. Нативный препарат, х 400.

Вне зависимости от протокола криоконсервирования $62,8 \pm 2,8$, $65,2 \pm 0,8$ и $67,8 \pm 2,1$ % эмбрионов I, II и III групп соответственно имели одинаковый размер бластомеров. Однако во всех группах встречались макробластомеры, возникшие, очевидно, за счет слияния двух соседних клеток.

Рис. 3.4. Деконсервированные четырехклеточные эмбрионы человека I группы. Повреждение 50% бластомеров. Нативный препарат, х 300.

Учет фрагментации один из обязательных компонентов оценки качества эмбрионов. Данный показатель может варьировать от количества безъядерных фрагментов. Мы отметили факт наличия фрагментации, как в нативных эмбрионах, так и после криоконсервирования.

Рис. 3.5. Деконсервированный четырехклеточный эмбрион человека I группы. Повреждение всех бластомеров. Нативный препарат, х 400.

Так, если до криоконсервирования количество эмбрионов с низким процентным отношением (до 25%) цитоплазматической фрагментации составляло $83,1 \pm 3,2$, $85,4 \pm 0,6$ и $82,2 \pm 0,2\%$ для I, II и III групп соответственно, то после криоконсервирования этот показатель снижался до $43,8 \pm 1,0\%$ в I группе, $68,8 \pm 1,0\%$ – во второй и составлял $78,9 \pm 0,9\%$ – для третьей группы.

Цитоплазма бластомеров нативных эмбрионов характеризовалась прозрачностью и гомогенностью. После криоконсервирования, в эмбрионах I и II групп возникали дегенеративные изменения в цитоплазме в виде агрегации гладкого эндоплазматического ретикулума и одного или нескольких вакуолеобразных образований, располагающихся в центре бластомера (рис.3.6).

Рис. 3.6. Деконсервированный эмбрион I группы. Наличие крупной вакуоли в бластомере. Нативный препарат, х 600.

У эмбрионов I группы отмечали образование крупных брешей и разрыв *zona pellucida* (рис. 3.7).

Рис. 3.7. Повреждение *zona pellucida* и бластомеров в 4-клеточном эмбрионе I группы после криоконсервирования. Нативный препарат, х 600.

В нативных эмбрионах среднее количество бластомеров на эмбрион составило $3,92 \pm 0,01$, $3,99 \pm 0,02$ и $3,97 \pm 0,01$ для I, II и III групп соответственно ($p > 0,05$). В единичных эмбрионах всех исследуемых групп отмечали вовлечение целого бластомера в процессы фрагментации.

В нашем исследовании $96,9 \pm 1,1\%$, $95,7 \pm 0,3$ и $97,6 \pm 0,4$ % нативных эмбрионов всех исследуемых групп, соответственно, характеризовались плотным межклеточным контактом, который существенно снижался в замороженно-оттаянных эмбрионах I группы (рис.3.8).

Рис. 3.8. Эмбрион человека I группы после деконсервирования. Слабый межклеточный контакт. Нативный препарат, х 600.

После криоконсервирования среднее количество бластомеров составило $2,64 \pm 0,09$, $3,57 \pm 0,06$ и $3,75 \pm 0,04$, соответственно для I, II и III групп. Снижение общего количества бластомеров в исследуемых группах связано с частичным или полным повреждением от одного бластомера до полного лизиса всех бластомеров в эмбрионе. Кроме того, морфометрический анализ продемонстрировал существенное уменьшение диаметра бластомеров у эмбрионов, перенесших процедуру замораживания-оттаивания (табл. 3.3).

Таблица 3.3

**Морфометрические характеристики нативных и
криоконсервированных эмбрионов человека**

Морфологические критерии	Исследуемые группы эмбрионов, (M $\pm$ m)					
	I		II		III	
	нативные	криоконсервированные	нативные	криоконсервированные	нативные	криоконсервированные
Количество бластомеров	$3,97 \pm 0,01$	$2,64 \pm 0,09^*$	$3,99 \pm 0,02$	$3,57 \pm 0,06$	$3,92 \pm 0,01$	$3,75 \pm 0,04$
Диаметр бластомеров, мкм	$64,2 \pm 0,02$	$62,2 \pm 0,02^*$	$64,5 \pm 0,02$	$63,5 \pm 0,04$	$64,2 \pm 0,03$	$64,1 \pm 0,03$
Толщина <i>zona pellucida</i> , мкм	$21,9 \pm 1,5$	$24,6 \pm 2,1$	$22,1 \pm 1,7$	$23,9 \pm 1,8$	$22,2 \pm 1,8$	$24,8 \pm 2,1$

Примечание: * – $P < 0,05$ - в сравнении с I и III группами.

Обратил на себя внимание факт изменения толщины *zona pellucida* в эмбрионах человека, перенесших процедуру криоконсервирования.

Таким образом, учет морфологии эмбрионов до криоконсервирования позволяет учитывать вклад индивидуальных характеристик в жизнеспособность эмбрионов, перенесших процедуру замораживания-оттаивания.

Основным показателем жизнеспособности эмбрионов после криоконсервирования служит их способность к восстановлению основных морфологических признаков, поскольку практически все нарушения, вызванные процедурой замораживания-оттаивания проявляются в раннем эмбриогенезе.

3.1.3. Жизнеспособность криоконсервированных преимплантационных эмбрионов человека с разной степенью фрагментации цитоплазмы. При оценке качества эмбрионов основным морфологическим критерием является учет цитоплазматической фрагментации участков цитоплазмы [289]. Поэтому целью данного этапа работы явилось выяснение влияния степени фрагментации эмбрионов человека на их выживаемость после процедуры замораживания-оттаивания.

Эмбрионы были разделены на две группы: нативные и подвергнутые процедуре криоконсервирования по медленной программе с 1,2-ПД. В каждой группе эмбрионы были отнесены к одному из четырех типов по процентному содержанию цитоплазматических фрагментов:

первый – эмбрионы, имеющие бластомеры сферичной формы, плотно прилегающие друг к другу, со светлой, мелкозернистой

цитоплазмой, интактной *zona pellucida* без цитоплазматических фрагментов (рис. 3.9);

второй – наличие неровных бластомеров с более 10% фрагментацией (рис. 3.10);

третий – присутствие не более 50% фрагментации цитоплазмы и интактной *zona pellucida* (рис. 3.11); четвертый – более 50% фрагментации цитоплазмы (рис.3.12).

Рис. 3.9. Эмбрион человека до криоконсервирования на стадии 4-х бластомеров с отсутствием цитоплазматических фрагментов. Нативный препарат, х 600.

Контрольную группу составили 52, исследуемую - 53 преимплантационных эмбриона человека. Все эмбрионы подвергали морфологической оценке через 24 ч культивирования, после чего эмбрионы исследуемой группы криоконсервировали.

Рис. 3.10. Эмбрион человека до криоконсервирования с 10% фрагментацией цитоплазмы. Нативный препарат, х 600.

После деконсервации производили морфологическую оценку сохранности эмбрионов методом световой микроскопии. Для оценки жизнеспособности эмбрионы культивировали 24 ч, отмечали морфологические характеристики и подсчитывали количество бластомеров.

Рис. 3.11. Эмбрион человека до криоконсервирования с 50% фрагментацией цитоплазмы. Нативный препарат, х 600.

Рис. 3.12. Эмбрион человека до криоконсервирования со 100% фрагментацией цитоплазмы. Нативный препарат, х 600.

Количество эмбрионов с каждым типом фрагментации сравнимо в обеих группах (табл.3.4).

Таблица 3.4

**Частота встречаемости эмбрионов с различных типом
фрагментации до и после криоконсервирования**

Тип фрагментации эмбрионов человека	Контроль, %	Исследуемая группа, n=53	
		До криоконсервирования, %	После криоконсервирования %
Первый	22,7±2,7	26,2±2,5	23,2±2,8
Второй	28,7±2,3	24,6±2,3	20,8±2,2
Третий	32,3±2,3	32,1±1,9	35,8±1,5*
Четвертый	16,3±2,3	17,1±1,2	20,2±1,2*

Примечания:

1. * – достоверные отличия от контроля и эмбрионов до криоконсервирования, $p < 0,05$;

Эмбрионы без фрагментации цитоплазмы характеризуются высокой жизнеспособностью после криоконсервирования. Паттерн фрагментации эмбрионов первого типа статистически не отличается до и после криоконсервирования ($p > 0,05$).

После криоконсервирования достоверно возрастает количество эмбрионов с третьим и четвертым ($p < 0,05$) типом фрагментации, в основном за счет лизиса бластомеров, окруженных фрагментированными участками (рис.3.13).

Рис. 3.13. Деконсервированные эмбрионы человека с разным характером фрагментации:

а – первый,

б – второй,

в – третий,

г – четвертый.

Нативный препарат, х 400.

Через 48 ч культивирования общее количество бластомеров в нативных и криоконсервированных эмбрионах первого и второго

типов статистически сопоставимо, тогда как эмбрионы третьего и четвертого типов групп имеют разную картину развития (табл. 3.5).

Таблица 3.5

Общее количество бластомеров в эмбрионах человека с различным типом фрагментации цитоплазматических участков

Тип фрагмента ции	Контроль		Исследуемая группа		
	Часы культивирования				
	24 ч	48 ч	24 ч	24 ч	48 ч
			до криоконсервирования	после криоконсервирования	
Первый	3,7±0,3	6,7±0,6	3,7±0,3	3,2±0,7	6,1±1,5
Второй	3,6±0,3	6,2±0,9	3,6±0,4	2,9±0,9	5,4±1,9
Третий	3,4±0,4	5,5±0,7	3,2±0,4	2,2±0,8*	3,9±1,7*
Четвертый	2,0±0,6	2,6±0,9	2,6±0,6	0,8±0,6**	1,0±0,8**

Примечания:

1. * – достоверные отличия от контроля и эмбрионов до криоконсервирования, $p < 0,05$;

2.** – достоверные отличия от контроля и эмбрионов до криоконсервирования. $p < 0,001$.

Среднее число бластомеров в эмбрионах с отсутствием фрагментации составило 3,7±0,3. После криоконсервирования общее количество бластомеров снизилось за счет разрушения отдельных бластомеров, либо за счет дополнительной фрагментации участков цитоплазмы. В связи с этим достоверно возросло общее количество эмбрионов с третьим и четвертым типом фрагментации. Обращает на

себя внимание снижению общего количества бластомеров с повышением степени фрагментации и снижением выживаемости эмбрионов после криоконсервирования. Так, среднее количество бластомеров составило $3,2 \pm 0,7$, $2,9 \pm 0,9$, $2,2 \pm 0,8$ и $0,8 \pm 0,6$, для эмбрионов с первым–четвертым типом фрагментации соответственно.

Мы изучили влияние процесса фрагментации эмбрионов на частоту наступления беременности у пациенток при переносе в полость матки нативных и криоконсервированных эмбрионов.

На рис 3.14 представлены результаты исследования, по изучению частоты наступления беременности, в зависимости от количества перенесенных эмбрионов с фрагментацией и без таковой.

Прежде всего, следует отметить, что частота наступления беременности положительно коррелирует с числом перенесенных эмбрионов.

При переносе в полость матки пациентки одного, 2 – 4-х эмбрионов (без учета их морфологических особенностей) частота наступления беременности составила 23, 30, 30,6 и 31,7% соответственно. При переносе эмбрионов без признаков фрагментации частота наступления беременностей была довольно высокой и составляла - 29,6 % при переносе одного эмбриона, 33,3 % - двух, 35,3% - трех и 34,5% - четырех эмбрионов.

При «смешанном» эмбриопереносе, т.е. при переносе эмбрионов с признаками фрагментации и без таковых, вероятность наступления беременности увеличивалась с возрастанием числа эмбрионов без фрагментации. При переносе эмбрионов с четвертым типом фрагментации ни в одном случае не наступила беременность. Если из общего числа клеток первой категории качества соответствовало 2 эмбриона, то результативность программы возрастала до 33,3 %, трех - до 54,5%, всех - 57,9 %.

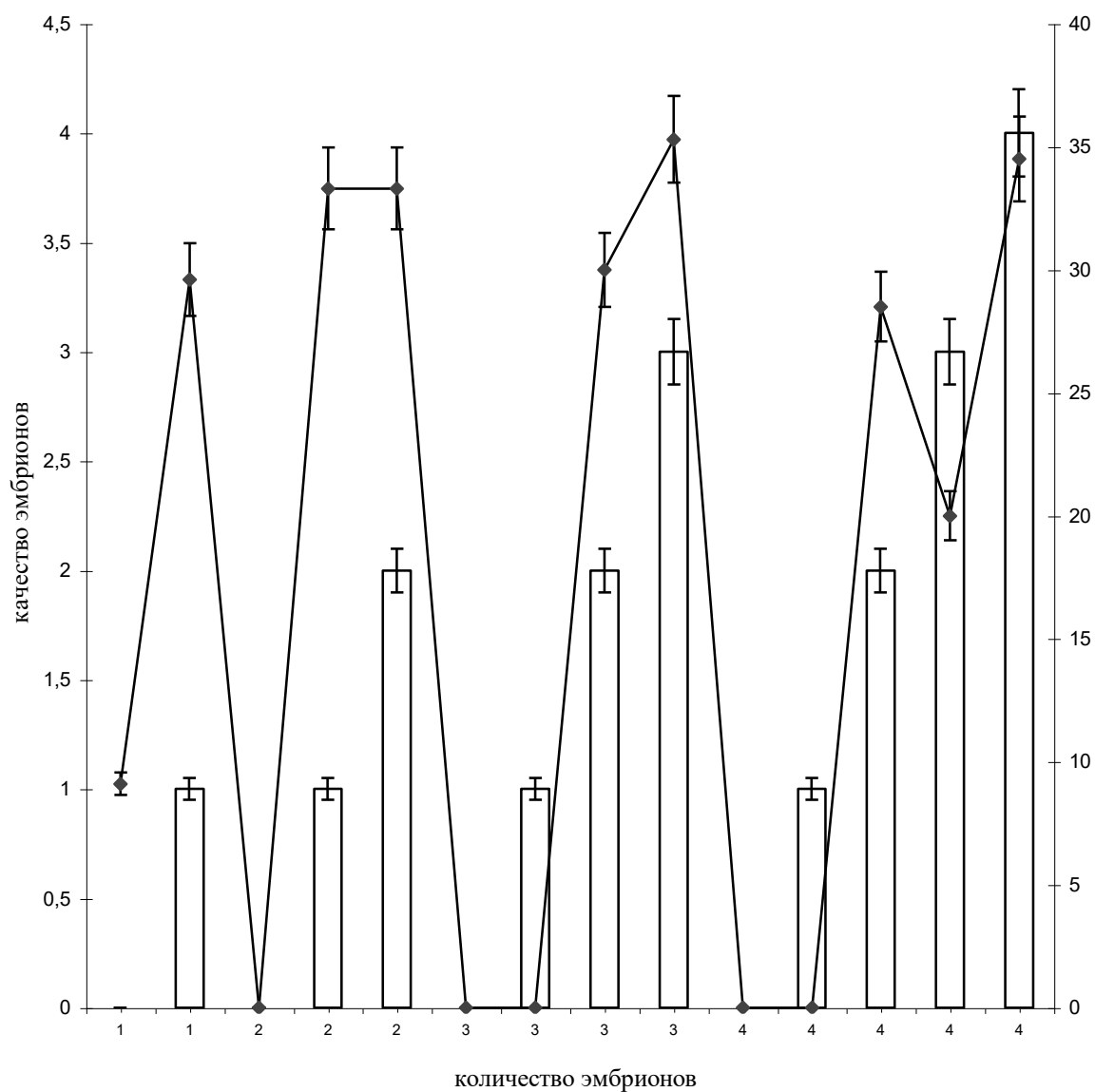


Рис. 3.14. Частота наступления беременности в зависимости от количества и качества перенесенных эмбрионов.

Таким образом, морфология эмбрионов до криоконсервирования позитивно коррелирует с выживаемостью

эмбрионов после оттаивания. С увеличением степени фрагментации цитоплазмы снижается выживаемость эмбрионов, в основном за счет лизиса бластомеров вокруг которых локализованы цитоплазматические фрагменты, очевидно препятствующие нормальному насыщению клетки раствором криопротектора. Факторы криоконсервирования индуцируют увеличение цитоплазматической фрагментации. Темпы дробления и общее число клеток через 48 ч культивирования достоверно ниже у эмбрионов с третьим и четвертым типом фрагментации, что очевидно, связано с негативным воздействием цитоплазматических фрагментов на дальнейшее развитие эмбрионов *in vitro*.

3.1.4. Роль фаз клеточного цикла и морфологии пронуклеусов в жизнеспособности нативных и криоконсервированных зигот. Поскольку фрагментация цитоплазматических участков 4-клеточных эмбрионов влияет на их жизнеспособность, а так же учитывая тот факт, что первые деления дробления эмбрионов человека имеют асинхронный характер, что может оказывать влияние на их выживаемость после криоконсервирования, объектом дальнейших исследований были выбраны зиготы.

Целью настоящего этапа исследований явилось изучение морфофункциональных характеристик зигот, находящихся в разных фазах клеточного цикла и характеризующихся разным типом морфологии пронуклеусов до и после криоконсервирования.

Зиготы были разделены на 4 группы. Изучали морфологические характеристики пронуклеусов контрольной группы и эмбрионов через 24 ч культивирования. Контроль - клетки без криоконсервирования.

Зиготы I группы криоконсервировали через 18, II - через 22 и III - через 26 ч после инсеминации.

Морфологические особенности пронуклеусов классифицировали по Scott [290]:

первый тип - зигота с равным количеством нуклеолей (3-7), которые выстроены для слияния в зоне контакта пронуклеусов;

второй тип - зигота с равным количеством нуклеолей, которые рассеяны по площади нуклеусов;

третий тип – зигота с пронуклеусами, отличающимися по количеству и размеру нуклеусов;

четвертый тип - зиготы с неравными пронуклеусами, которые располагаются по периферии зиготы (рис. 3.15).

Учет морфологии ядрышек имеет существенное значение в морфофункциональной оценке состояния клетки, так как с ядрышками связаны процессы транскрипции и трансформации рибосомальной РНК [291]. Размеры и структура ядрышек в большинстве случаев коррелирует с объемом клеточного белкового синтеза, выявляемого биохимическими методами. Размеры ядрышек зависят также от функции и типа клеток.

В нормальных условиях размеры и структура ядрышек в большинстве случаев адекватны интенсивности клеточного белкового синтеза.

В условиях патологии высокая функциональная (секреторная) активность клетки часто сопровождается увеличением объема, а иногда и количества ядрышек с их вакуолизацией.

Дезинтеграция (сепарация) ядрышковых структур на гранулы и фибриллы РНК отражает нарушение функционального состояния как ядрышек, так и клетки, и встречается при действии различных

агентов, таких как актиномицин, афлатоксин, ионизирующая радиация и сопровождается изменением синтеза РНК.

Рис 3.15. Морфологические особенности зигот с разным типом организации пронуклеусов:

а - зигота (первый тип) с равным количеством нуклеолей, которые выстроены для слияния в зоне контакта пронуклеусов,

б - зигота (второй тип) с равным количеством нуклеолей, которые рассеяны по площади пронуклеусов,

в - зигота (третий тип) с пронуклеусами, отличающимися по количеству и размеру ядрышек,

г - зигота (четвертый тип) с неравными пронуклеусами, расположенными по периферии. Нативный препарат, х 600.

В данном исследовании контрольную группу составили 149, I и II - по 113, III - 80 зигот. В соответствии с морфологией пронуклеусов, зиготы были распределены следующим образом (рис 3.16): первый тип морфологии зигот был сравним во всех группах и составил 27,5, 26,6, 21,2 и 17,4%; второй - 32,9, 38,9, 24,8, 28,8%; третий - 22,8, 20,3, 30,1 и 28,8%; четвертый - 16,8, 14,2, 23,9 и 25% в контроле, I, II и III группе соответственно.

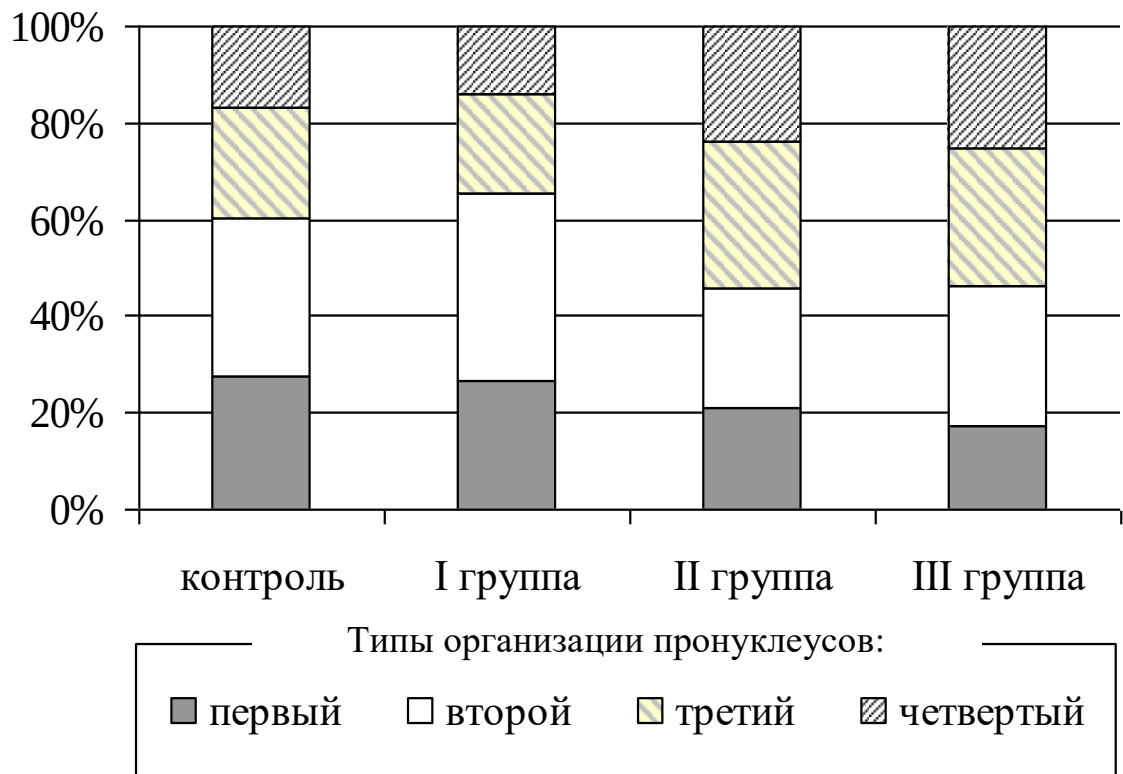


Рис. 3.16. Частота зигот с различным типом организации пронуклеусов в исследуемых группах.

Через 24 ч культивирования в контрольной группе нормально развивались $87,8 \pm 5,1\%$ эмбрионов с первым типом морфологии

пронуклеусов (табл. 3.6). У эмбрионов II группы этот показатель находился на уровне контроля ($80,0 \pm 5,5$), в то время, как эмбрионы, криоконсервированные через 18 ч после инсеминации (I группа) и 26 ч после инсеминации (III группа) развились в эмбрионы, соответствующие высокой категории качества только в $25,0 \pm 1,5$ и $14,3 \pm 0,9\%$ случаев, остальные были либо заблокированы на стадии зиготы, либо характеризовались высокой степенью фрагментации цитоплазмы. Аналогичные результаты были продемонстрированы для второго типа организации пронуклеусов. Что касается третьего типа зигот, то в контрольной группе только $58,8 \pm 4,2\%$ всех зигот развились в полноценные эмбрионы. После криоконсервирования этот показатель достоверно снизился в I и III группах. Зиготы с четвертым типом организации пронуклеусов после криоконсервирования не возобновляли деление (I и III группа) и характеризовались высокой степенью фрагментации цитоплазмы (в контроле и II группе).

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности криоконсервирования зигот через 22 ч после инсеминации, когда четко визуализируются 2 пронуклеуса. В это время зигота находится в G2 фазе клеточного цикла. Ранние зиготы более чувствительны к процессу замораживания-оттаивания, чем зиготы, находящиеся в фазе G2. Зиготы, находящиеся в стадии, предшествующей митозу (26 ч после инсеминации), наиболее восприимчивы к повреждающему действию факторов криоконсервирования, что выражается в дальнейшем блокировании их развития. Наши данные позволяют объяснить противоречивые результаты о преимуществах либо бесперспективности криоконсервирования эмбрионов человека на стадии зиготы.

Таблица 3.6

Морфологические характеристики эмбрионов после 24 час культивирования нативных и криоконсервированных зигот человека с разным типом морфологии пронуклеусов и различными сроками оплодотворения

Тип зигот	Нативные эмбрионы (контроль)		Криоконсервированные эмбрионы п, %)					
	1 и 2 категория качества	2 и 4 категория качества/блок к	I группа (18 час после инсеминации)		II группа (22 час после инсеминации)		III группа (26 час после инсеминации)	
			1 и 2 категория качества	2 и 4 категория качества/блок	1 и 2 категория качества	2 и 4 категория качества/блок	1 и 2 категория качества	2 и 4 категория качества/блок
Первый	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
Второй	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
Третий	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
Четвертый	52,0±5,0	48,0±4,0	0**	100	12,5±0,8**	87,5±6,6	0**	100

Примечания:

1. * – отличия достоверны по сравнению с контролем и III группой, $p < 0,05$;
2. ** – отличия достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

3.1.5. Скорость морфогенетического развития эмбрионов человека после криоконсервирования. Визуальная оценка качества эмбрионов не может быть показателем их жизнеспособности.

Во-первых, не всегда повреждения эмбрионов, даже летальные, сразу же проявляются видимыми морфологическими изменениями: такие изменения морфологии, как помутнение цитоплазмы и контрастирование ядра появляются уже после того, как физиологические нарушения переходят в стадию деградации.

Во-вторых, гибель отдельных бластомеров не препятствует дальнейшему развитию эмбрионов. Каждый бластомер ранних эмбрионов способен развиваться в отдельный организм, обладая тотипотентностью. Поэтому при гибели даже нескольких бластомеров, вследствие влияния повреждающих факторов, в частности криоконсервирования, развитие эмбриона может продолжиться за счет бластомеров, которые сохранили функциональную полноценность.

Наиболее адекватным методом оценки жизнеспособности эмбрионов после экспериментальных воздействий является метод культивирования в условиях *in vitro*.

Целью данного этапа работы явилось изучение скорости морфогенетического развития и сопоставление числа бластомеров в эквивалентных стадиях формирования бластоцисты нативными и криоконсервированными эмбрионами.

Эмбрионы были разделены на две группы: I - эмбрионы культивировали 120 ч, II – эмбрионы криоконсервировали на стадии 4-х бластомеров, после оттаивания культивировали *in vitro*.

Показатель формирования бластоцист рассчитывали как отношение эмбрионов, сформировавших бластоцисты, к общему числу полученных в данной группе эмбрионов.

Эмбрионы были получены в 30 и 26 циклах ЭКО контрольной и исследуемой групп.

Средний возраст пациенток составил $29,7 \pm 0,9$ и $28,9 \pm 0,7$ соответственно. Всего было аспирировано 334 и 342 ооцита, что составило $11,5 \pm 0,8$ и $12,7 \pm 0,8$ ооцитов на пациентку ($p > 0,05$). Оплодотворение произошло в $81,2 \pm 1,7\%$ и $83,3 \pm 2,4\%$ ооцитах соответственно ($p < 0,05$).

Из 156 неиспользованных для переноса эмбрионов контрольной группы $50 \pm 1,2\%$ - достигли стадии бластоцисты (рис. 3.17).

После деконсервирования 163 эмбрионов второй группы, оставшихся после эмбриопереноса, наблюдали полный лизис бластомеров в $9,8 \pm 0,23\%$, в $11,0 \pm 1,4\%$ - выживаемость составила менее 50%, в остальных эмбрионах ($78,9 \pm 1,6\%$) были интактными более 50% бластомеров.

После культивирования этих эмбрионов *in vitro* стадии бластоцисты достигло $14,6 \pm 0,6\%$ эмбрионов, что достоверно ниже, чем в первой группе ($p < 0.001$). Причем, при 100% сохранности бластомеров выход бластоцист был наибольшим - $54,2 \pm 1,4\%$, что сопоставимо с количеством бластоцист, сформированными нативными эмбрионами.

Количество эмбрионов и число бластомеров в эквивалентных стадиях развития нативных и криоконсервированных эмбрионов через 120 ч культивирования представлены в табл. 3.7.

Как видно из таблицы, частота достижения стадии «вылупившейся» бластоцисты для нативных эмбрионов достоверно выше, чем для криоконсервированных. В то же время, эквивалентные стадии развития характеризуются разным количеством бластомеров.

Рис 3.17. Деконсервированные эмбрионы человека после культивирования до стадии бластоцисты:

а – кавитированная бластоциста;

б – экспандированная бластоциста;

в – блок на стадии зиготы;

г – блок на стадии 4-х бластомеров;

д – блок на стадии морулы. Нативный препарат, х 300.

Таблица 3.7

**Частота формирования различных типов бластоцист и количество бластомеров в эмбрионах
человека до и после криоконсервирования**

Морфология бластоцист	Количество эмбрионов, М±м		Количество бластомеров, М±м	
	контроль	после криоконсервирования	контроль	после криоконсервирования
Ранняя	20±3,3	33,1±3,6*	54±2,5	63,1±2,1*
Кавитированная	7,7±0,4	27,7±4,2**	65,4±2,1	82,2±3,6**
Экспандированная	15,4±0,8	33,1±3,6**	76±3,8	96,6±1,7**
В стадии "вылупления"	57,7±1,9*	8,3±0,0***	87±2,6	125,5±4,5***

Примечания:

1. * – достоверность отличий, по сравнению с контролем, $p < 0,05$;
2. ** – достоверность отличий, по сравнению с контролем, $p < 0,01$;
3. *** – достоверность отличий, по сравнению с контролем, $p < 0,001$.

Деконсервированные эмбрионы демонстрируют ускоренные темпы дробления по сравнению с нативными. Так, если ранняя бластоциста нативных эмбрионов характеризовалась наличием $54 \pm 2,5$ бластомеров, то после криоконсервирования количество бластомеров на бластоцисту возрастало до $63,1 \pm 2,1$ ($p < 0,05$) (рис. 3.18).

Если для кавитированной бластоцисты, культивируемой *in vitro*, среднее количество бластомеров составило $65,4 \pm 2,1$, то для деконсервированных эмбрионов этот показатель увеличился до $82,2 \pm 3,6$ ($p < 0,01$) (рис 3. 19).

Для бластоцист, находящихся в стадии «вылупления», развившихся из криоконсервированных эмбрионов, среднее количество бластомеров на бластоцисту составило $125 \pm 4,5$, что достоверно больше, чем количество бластомеров на бластоцисту у эмбрионов, культивируемых *in vitro* без криоконсервирования – $87 \pm 2,6$ ($p < 0,001$) (рис.3.20).

В то же время нами было отмечено, что на частоту образования бластоцист оказывает влияние сохранность бластомеров после деконсервации. Так, при 100%-й сохранности бластомеров частота формирования бластоцист составляла более 40%, при повреждении 50% клеток этот показатель снижался до 20%.

Важным показателем скорости морфогенетического развития преимплантационных эмбрионов человека является четкая корреляция между временем их культивирования *in vitro* и количеством бластомеров.

Рис. 3.18. а - стадия ранней бластоцисты. Нативный препарат, ув.600; б - общее количество бластомеров (32). Фиксированный препарат, х 600.

Рис. 3.19. а - стадия кавитированной бластоцисты. Нативный препарат, ув.600; б - общее количество бластомеров (63). Фиксированный препарат, х 600.

Рис. 3.20. а - стадия «вылупления» бластоцисты. Нативный препарат, ув.600; б - общее количество бластомеров (132). Фиксированный препарат, х 600.

Количество бластомеров является основным критерием для прижизненной оценки эмбрионов после замораживания-оттаивания. Однако темпы дробления и частота формирования бластоцист через 120 ч культивирования являются более надежным критерием жизнеспособности. Другой важный показатель полноценности бластоцисты - ее способность к высвобождению из *zona pellucida* (рис. 3.21).

Рис. 3.21. Выход бластоцисты из *zona pellucida*. Нативный препарат, х 600.

Таким образом, криоконсервирование влияет на скорость морфогенетического развития преимплантационных эмбрионов человека, что выражается в увеличении количества бластомеров в бластоцисте. Однако факторы криоконсервирования уменьшают способность эмбрионов к освобождению из *zona pellucida*, что требует проведения вспомогательного «хэтчинга».

3.1.6. Трансплантация криоконсервированных эмбрионов человека. В мировой литературе описаны случаи беременности и родов после переноса в полость матки пациентки эмбрионов, перенесших криоконсервирование различными методами [107]. Однако отмечается невысокая жизнеспособность деконсервированных эмбрионов [152]. Считается, что эмбрион успешно перенес процедуру замораживания-отогрева при повреждении менее 50 % бластомеров.

Запатентованный нами метод медленного охлаждения с 1,2-ПД позволил получить первую в Украине беременность после переноса деконсервированных эмбрионов.

У пациентки С. в цикле лечения бесплодия методом ЭКО, проведенном в июне 2002 г, было аспирировано 12 зрелых преовуляторных ооцитов. Через 16 ч после инсеминации в 9 клетках обнаружены цитологические признаки оплодотворения. Через 24 ч культивирования - семь эмбрионов находились на стадии 4-х и два - на стадии 6-ти бластомеров. Для эмбриопереноса в полость матки пациентки, были отобраны 4 эмбриона - 2 шестиклеточных и 2 четырехклеточных.

Оставшиеся эмбрионы были криоконсервированы. Морфологическая оценка эмбрионов позволила установить, что 3 эмбриона соответствовали первой категории качества - бластомеры

сферичные, четкие, ровные, цитоплазма - прозрачная, отсутствие фрагментов. Два эмбриона характеризовались наличием 10%-й фрагментации.

После замораживания эмбрионы хранились в Низкотемпературном банке биологических объектов ИПКиК НАН Украины.

У пациентки попытка ЭКО закончилась безуспешно. В декабре 2002 г ей было предложено перенести деконсервированные эмбрионы в естественном цикле. После удаления криопротекторов и 1 ч культивирования произведена оценка морфологии эмбрионов. Все эмбрионы характеризовались 100%-й сохранностью бластомеров (рис.3.22).

Рис. 3.22 Деконсервированные четырехклеточные эмбрионы человека (100%-я сохранность бластомеров). Нативный препарат, х 200.

Морфологические характеристики после криоконсервирования четко коррелировали с таковыми до замораживания. На 18-й день менструального цикла пациентке проведена трансплантация трех эмбрионов.

Назначена поддерживающая терапия. Через 2 нед тест на наличие хорионического гонадотропина - положительный. На 24-й день от эмбриопереноса под контролем УЗИ диагностирована маточная беременность, которая протекала с угрозой прерывания (рис. 3.23).

Рис. 3.23. Монохориальная моноамниотическая беременность после переноса деконсервированных эмбрионов.

Пациентка находилась на динамичном наблюдении в 5-м родильном доме г. Харькова. 25 августа 2003 г беременная была родоразрешена путем операции кесарева сечения в нижнем маточном сегменте по Гусакову. Извлечен живой доношенный мальчик массой 3100 г. На десятые сутки родильница с ребенком выписаны домой. Ребенок развивается нормально.

В данном случае перенос эмбрионов был проведен через 1 час после деконсервирования. Частота имплантации составила 33%.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующие предварительные выводы:

- Комплексная оценка морфологических характеристик путем анализа размера бластомеров, степени их адгезии, наличия фрагментации, цитоплазматических вакуолей и состояния *zona pellucida* позволяет учитывать вклад индивидуальных характеристик эмбриона и использовать их как биомаркеры криоустойчивости эмбрионов.

- Морфология эмбрионов до криоконсервирования позитивно коррелирует с выживаемостью эмбрионов после оттаивания. В связи с этим только эмбрионы, относящиеся при морфологической оценке к первому типу (эмбрионы без каких-либо признаков фрагментации, имеющие бластомеры сферичной формы, плотно прилегающие друг к другу, со светлой мелкозернистой цитоплазмой, интактной *zona pellucida*, без цитоплазматических фрагментов), пригодны для криоконсервирования.

- Установлено, что оптимальной стадией для криоконсервирования преимплантационных эмбрионов

человека является зигота. Криоконсервирование эмбрионов человека, находящихся на данной стадии, следует проводить через 20-22 ч после инсеминации. Поэтапное размораживание зигот в первые, вторые и третьи сутки перед эмбриопереносом и их последующее культивирование позволяет переносить в полость матки эмбрионы разных сроков развития, что позволяет увеличить продолжительность «имплантационного окна».

- Факторы криоконсервирования индуцируют фрагментацию бластомеров с образованием безъядерных участков цитоплазмы, которые препятствуют нормальному делению бластомеров. Эмбрионы человека, находящиеся на разных стадиях развития, проявляют разную морфо-функциональную сохранность после криоконсервирования, что выражается в увеличении степени фрагментации бластомеров.

- Эмбрионы человека, подвергнутые процедуре замораживания-оттаивания, 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 оказывают влияние на способность бластоцисты к "вылуплению" из *zona pellucida*, что требует проведения процедуры вспомогательного «хэтчинга».

По результатам данного исследования опубликованы следующие работы:

1. Петрушко М.П. Использование криоконсервированных эмбрионов человека во

- вспомогательных репродуктивных технологиях // Проблемы криобиологии.- 2000.- № 1.- С. 71-76.
2. Грищенко В.И., Петрушко М.П., Геродес А.Г., Терпячая И.В. Беременность и роды после трансплантации деконсервированных эмбрионов человека // Проблемы криобиологии.- 2003.-№ 3.- С. 99-102.
 3. Петрушко М.П. Возникновение многоядерных бластомеров эмбрионов человека после криоконсервирования // Проблемы криобиологии.- 2004.- № 1.- С.55-62.
 4. Петрушко М.П. Скорость морфогенеза эмбрионов человека после криоконсервирования // Проблемы криобиологии.- 2005.- № 1.- С.56-62.
 5. Петрушко М.П. Морфологические характеристики нативных и криоконсервированных эмбрионов человека // Экспериментальная и клиническая медицина.- 2005.- № 2.- С.45-50.
 6. Петрушко М.П. Роль фаз клеточного цикла и морфологии пронуклеусов в жизнеспособности нативных и криоконсервированных зигот человека // Проблемы криобиологии.- 2005.- № 2.- С.202-206.

3.2. Цитологический, цитогенетический и молекулярно-генетический анализ нативных и криоконсервированных эмбрионов человека

3.2.1. Цитологический анализ состояния митозов в эмбрионах человека после эквilibрации с растворами криопротекторов.

Одним из важнейших параметров полноценности клеток после какого-либо экзогенного воздействия является их способность к дальнейшей пролиферации (за исключением высокодифференцированных клеток).

Изучение состояния бластомеров эмбрионов после контакта с криопротектором позволяет оценить его токсическое воздействие и характер проявления данного воздействия. Поэтому наряду с морфофункциональной оценкой было проведено цитологическое исследование эмбрионов после их экспозиции в криозащитных средах.

Эмбрионы были разделены на контрольную и исследуемые группы. Эмбрионы исследуемых групп после экспозиции в растворах криопротекторов отмывали в 0,5М р-ре сахарозы, затем проводили трехкратную отмывку в среде культивирования после чего эмбрионы помещали на 24 ч в среду, содержащую 0,4% р-р колхицина.

При цитологическом анализе обнаружили, что среди бластомеров контрольной и исследуемых групп встречались бластомеры с нарушениями морфологии митоза (табл. 3.8).

После экспозиции эмбрионов в 1,5М растворе 1,2-ПД при температуре 0°C и 22°C спектр состояния митозов находился на уровне контроля, в то время, как экспозиция при 37°C индуцировала повреждения хромосом (набухание и слипание) и митотического аппарата (колхициновый митоз, мультиполярные митозы).

Сравнивая полученные данные с результатами морфофункциональной оценки эмбрионов после экспозиции с растворами криопротекторов можно сделать вывод о

цитотоксичном действии 1,5 М раствора 1,2-ПД при температуре 37°C.

Таблица 3.8

**Уровень патологий митоза в эмбрионах человека после
экспозиции в растворах криопротекторов**

Показатель	Количество митозов (%)			
	Контроль	Температура эквilibрации n, %		
		I группа 0°C	II группа 22°C	III группа 37°C
Эмбрионов	40	38	42	40
Бластомеров	152	137	151	152
Бластомеров в митозе	140	122	134	123
Бластомеров с патологиями митоза	7 (5,0)	9 (7,3%)	7 (5,2)	14 (11,4)*

Примечание: * - достоверные отличия по сравнению с контролем, I и II группой, $p < 0,05$.

Таким образом, анализ полученных данных подтверждает предварительный вывод о необходимости экспозиции преимплантационных эмбрионов человека при температуре 22°C. После экспозиции в 1,5М растворе 1,2-ПД возникают, преимущественно, обратимые изменения, связанные с повреждением митотического аппарата бластомеров.

3.2.2. Цитологический анализ состояния митозов в нативных и криоконсервированных эмбрионах человека. Воспроизведение клеток – это высокоупорядоченное, строго последовательное биологическое явление, представляющее собой выражение определенной генетической программы, которая в свою очередь реализуется в сложных молекулярных процессах. Целью данного этапа работы явилось выяснение влияния факторов криоконсервирования на морфологические признаки патологии репродукции клеток. Для достижения поставленной цели был проведен цитологический анализ состояния митозов в нативных и криоконсервированных эмбрионах человека (рис. 3. 24).

Рис. 3.24. 4–клеточный эмбрион человека после криоконсервирования: а) метафаза, б) анафаза, в) интерфаза. Фиксированный препарат. Окраска Романовского-Гимза, x1000.

Эмбрионы были разделены на две группы: нативные (268) – эмбрионы, находящиеся на стадии 4-х бластомеров, фиксировали по методу Тарковского, окрашивали красителем Романовского-Гимза и анализировали при ув.1000 под световым микроскопом Olympus и криоконсервированные. Эмбрионы обеих групп культивировали 24 ч с блокатором митоза (0,4% раствор колхицина), после чего проводили процедуру приготовления фиксированных препаратов.

Различают патологии митоза, связанные с повреждением хромосом и митотического аппарата.

Уровень патологий митоза в нативных и криоконсервированных эмбрионах представлены в табл. 3.9.

Таблица 3.9

**Уровень патологий митоза в нативных и
криоконсервированных эмбрионах человека**

Показатель	Количество митозов n (%)	
	Контроль	Криоконсервированные эмбрионы
Эмбрионов	50	44
Бластомеров	190	168
Бластомеров в митозе	124	115
Бластомеров с патологиями митоза	6 (4,8)	15 (13,0)

Примечания:

1. * – статистически достоверно по сравнению с нативными эмбрионами, $p < 0,01$;
2. – признак не выявлен.

Количество патологических митозов в криоконсервированных эмбрионах – 13,0%, было выше, чем для нативных – 4,8%, однако спектр патологических митозов был иным (рис.3.25).

Рис. 3.25. Патологические состояния митозов, наблюдаемые в эмбрионах человека после криоконсервирования: а – мост в анафазе, б – отставание хромосомы в метакинезе, в – к-митоз, г – слипание хромосом в метафазе.

В нативных эмбрионах патология митозов была связана с повреждением хромосом - микроядра. Среди патологических митозов, наблюдаемых в криоконсервированных эмбрионах, выявлялись повреждения хромосом – хроматидные мосты, замедление движения хромосом в метакинезе и образование микроядер, и повреждения митотического аппарата – трехполюсный и моноцентрический митозы, полая и комковатая метафазы. Наиболее частыми патологиями митоза были микроядра, набухание и слипание хромосом.

Результаты нашего исследования показали, что в целом замораживание с использованием 1,2-ПД и последующее оттаивание не приводит к увеличению количества патологических митозов в преимплантационных эмбрионах, хотя и меняет спектр. В бластомерах криоконсервированных эмбрионов отмечали пикнотически измененные ядра (рис. 3.26).

Увеличение количества пикнотических ядер свидетельствует о гибели внутриклеточных структур.

Проведенное цитологическое исследование нативных и криоконсервированных эмбрионов, культивируемых без блокатора митоза, обнаружило, что большинство бластомеров контрольных эмбрионов находились в стадии интерфазы митоза, имели выраженные базофильные ядра, в которых четко просматривались ядрышки. Так, $89,3 \pm 0,5\%$ бластомеров содержали одно большое, круглое ядрышко, свидетельствующее о нахождении клетки в фазе S интерфазы митоза; из них $8,4 \pm 0,6\%$ клеток характеризовались наличием пяти ядрышек, свидетельствующих о начинающейся конденсации хромосом (клетка из периода S фазы переходит к фазе G2), в $5,08 \pm 0,5\%$ бластомерах, ядрышко не визуализировалось, при

этом отмечали наличие нежносетчатого хроматина - клетка переходит из фазы G2 в раннюю профазу митоза. $4,1 \pm 0,5\%$ бластомеров находились на стадии метафазы митоза.

Рис. 3.26. Интерфазные и пикнотические ядра в эмбрионе человека после криоконсервирования. Фиксированный препарат, х 600.

Митотический индекс нативных эмбрионов составил $0,4 \pm 0,01$. Нами отмечено снижение среднего количества бластомеров ($3,59 \pm 0,1$) и митотического индекса ($0,3 \pm 0,01$) в эмбрионах человека после криоконсервирования ($p > 0,05$). Снижение количества бластомеров связано с их лизисом или фрагментацией в ходе криоконсервирования. Обращает на себя внимание изменение цитологической картины в сторону уменьшения количества бластомеров, находящихся в фазе S ($71,2 \pm 0,7\%$) и увеличения клеток, находящихся в ранней профазе митоза ($18,1 \pm 0,8\%$). В стадии метафазы митоза находилось $3,1 \pm 0,5\%$ клеток. $7,6 \pm 0,4\%$ всех бластомеров криоконсервированных эмбрионов характеризовались пикнозом ядер.

Таким образом, поскольку патологический митоз является одним из механизмов возникновения мутации, в частности, соматической анеуплоидии нам представлялось необходимым изучить цитогенетические характеристики нативных и криоконсервированных эмбрионов человека с целью выявления числовых хромосомных aberrаций.

3.2.3. Цитогенетический анализ нативных и криоконсервированных эмбрионов человека методом кариотипирования. Общеизвестно, что морфологический анализ позволяет оценить влияние физических факторов на сохранность эмбрионов. Способность к возобновлению митоза и возможность достижения стадии бластоцисты не являются абсолютными показателями генетической полноценности, поскольку даже эмбрионы, несущие хромосомные аномалии развиваются до стадии

бластоцисты и способны имплантироваться. Существование риска возникновения генетических аномалий, вызывает необходимость введения четких критериев оценки безопасности процедуры криоконсервирования для генетического аппарата преимплантационных эмбрионов человека.

В связи с вышеизложенным, целью данного исследования явилось изучение частоты хромосомных аномалий в бластомерах нативных и криоконсервированных эмбрионов человека методом кариотипирования.

Эмбрионы человека были разделены на две группы. I – 207 эмбрионов культивировали 16 ч с блокатором митоза (0,1% р-ром колхицина) для получения препаратов хромосом, II (n=189) – исследуемые эмбрионы, которые были криоконсервированы, культивированы в среде с блокатором митоза, после чего произведена фиксация эмбрионов для последующего цитогенетического анализа методом кариотипирования.

Из 207 и 189 нативных и криоконсервированных эмбрионов пригодными для цитогенетического анализа методом кариотипирования выявилось 119 и 114, что составило $57,5 \pm 1,6$ и $60,3 \pm 1,5\%$ соответственно.

В остальных случаях наблюдали дегенеративные изменения (сильная конденсация или деспирализация хроматина, слипание хромосом).

Следует отметить, что для цитогенетического анализа методом кариотипирования использовали только препараты эмбрионов, в которых удавалось произвести цитогенетический анализ не менее 2-х метафазных пластин. При возможности цитогенетического анализа одной метафазы данные не учитывали, ввиду сложности интерпретации полученных результатов.

Нормальный диплоидный набор хромосом имели 68,1% нативных эмбриона. Причем в 34 эмбрионах присутствовал кариотип 46,XX, в 44 – 46,XY (табл. 3.10).

Полиплоидия была отмечена в 2,5 % нативных эмбрионов. Причем, во всех бластомерах двух эмбрионов отмечали наличие триплоидии (69, XXX). При морфологической оценке в зиготе было определено два пронуклеуса.

Анеуплоидными выявились 26,9% эмбрионов, в том числе гиперплоидными – 10,9% эмбрионов, гипоплоидными – 14,3%. Причем в большинстве случаев отмечали анеуплоидию по хромосомам групп C, E и F.

Преобладание гипогамплоидных бластомеров может быть связано с тем, что механизм запаздывания хромосом в анафазе в данном случае играл существенную роль в образовании анеуплоидий.

Два случая (1,7%) – составили сочетания гипо- и гиперплоидии по отдельным хромосомам.

Мозаичными были охарактеризованы 2,5% эмбрионов. Из них два случая составили эмбрионы, бластомеры которых содержали разное число хромосом, один случай, при котором в одном бластомере отмечали диплоидный набор хромосом, а в двух – полиплоидный.

Механизм мозаицизма может быть объяснен постзиготической потерей хромосом, вследствие митотического нерасхождения.

Таблица 3.10

**Результаты цитогенетического анализа эмбрионов человека
до и после криоконсервирования**

Кариотип		Количество эмбрионов n (%)	
		Контроль	Криоконсервированные
Диплоидия		34 44 2 1	19 28 1 0
Всего		81 (68,1)	48 (42,1)
Полипloidия		2 1 0 0 0	3 2 1 1 1
Всего		3 (2,5)	8 (7,0)
Анеуплоидия	Гиперплоидия	47, XY, +C 47, XX, +E 47, XX, +F 47, XX, +G 48, XX, +E, +E 48, XY, +C, +E 49, XX, +E, +F, +G 51, XX, +B, +D, +E, +F, +G	3 3 3 1 1 1 1 0
		2 4 0 1 1 0 0 1	2 4 0 1 1 0 0 1
	Всего		13 (10,9)
	Гипоплоидия	45, XX, -D 45, XX, -G 44, XX, -A, -B 43, XY, - A, -B, -C 40, XY?, -A, -B, -C, -E, -F, -G 43, XX, -F, -F, -G 43, XX, -E, -E, -F 43, XY, -E, -E, -F 43, XY?, -D, -E, -G 43, XX, -E, -E, -G, -G 42, XX, -F, -F, -G, -G 40, XY?, -A, -B, -D, -E, -F, -G 47, XX, +A, +B, +C	1 2 4 1 2 2 0 0 2 1 1 1 0
		0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0	0 0 1 1 2 4 3 4 3 1 0 0 2
	Всего		17 (14,3)
	Комбинированные случаи		0 2
	Всего		2 (1,7)
	Всего:		32 (26,9)
	Всего:		31 (27,2)
Мозаицизм	Диплоидные мозаики:		
	i) хаотичные мозаики		2 1
	ii) 2n/pol		9 8
	iii) митотические анеуплоиды		
	а) митотическое нерасхождение хромосом		0 0
	б) митотический анафазный мост		1 2
	в) эндоредупликация		2 2
Полипloidные мозаики		0	5
Гаплоидные мозаики		0	0
Всего		3 (2,5)	27 (23,7)
Всего:		119 (100)	114 (100)

В эмбрионах человека, перенесших процедуру замораживания-отогрева, нормальные метафазные пластинки визуализировались в 42,1% эмбрионов (рис. 3.27).

Рис. 3.27. Кариограмма и хромосомы диплоидного эмбриона человека: а – кариотип 46, XX, б – кариотип 46 XY.

Обращает на себя внимание высокая частота возникновения полиплоидии - 7,0% и мозаичных эмбрионов - 23,7% после криоконсервирования. Так, 9 случаев составили хаотичные мозаики, т.е. эмбрионы, в которых все или большинство бластомеров содержали разное число хромосом; 8 случаев – диплоидно-полиплоидные мозаики – эмбрионы с диплоидными бластомерами и бластомерами другой пloidности. 5 случаев составили митотические анеуплоиды.

Для изучения предрасположенности хромосом к аномальному нерасхождению проведено сравнение частоты встречаемости анеуплоидных хромосом разных групп (табл. 3.11).

Таблица 3.11

Частота встречаемости аномального расхождения среди 7 групп хромосом нативных и криоконсервированных эмбрионов человека

Исследуемые группы	Группы хромосом							Всего
	A	B	C	D	E	F	G	
Нативные эмбрионы, наблюдаемая частота, %	10,4	10,4	9,1	7,8	18,2	19,5	24,7	100
Криоконсервированные эмбрионы, наблюдаемая частота, %	6,8	8,0	9,1	6,8	31,8	21,6	15,9	100
Ожидаемая частота,* %	13,0	8,7	34,9	13,0	13,0	8,7	8,7	100

Примечание: *- теоретически ожидаемая частота рассчитывалась исходя из предположения, что хромосомы разных групп имеют одинаковую вероятность аномального расхождения.

Обращает на себя внимание увеличение нерасхождения хромосом группы E в эмбрионах человека, перенесших процедуру замораживания-отогрева.

Наиболее часто анеуплоидия возникала за счет нерасхождения групп E, F и G, что было характерным как для нативных, так и для криоконсервированных эмбрионов. Частота аномального расхождения хромосом групп A, B и C+X была достоверно ниже теоретически ожидаемой, а групп F и G - выше ($p < 0,05$).

3.2.4. Молекулярно-генетический анализ эмбрионов человека методом флюоресцентной гибридизации *in situ*. Поскольку развитие эмбрионов человека *in vitro* возможно лишь при нормальном функционировании генетического аппарата, являлось целесообразным изучить влияние низких температур и растворов криопротекторов на жизнеспособность клеток, ингибция которой будет отражать нарушения функционирования генома. В свою очередь, поскольку у эмбрионов человека на преимплантационное развитие не оказывают влияние некоторые хромосомные aberrации (анеуплоидия, полиплоидия), о наличии или отсутствии хромосомных аномалий судили путем цитогенетического анализа хромосом методом кариотипирования. Принимая во внимание трудность получения полноценных препаратов метафазных хромосом и учитывая тот факт, что патологии митоза могут носить обратимый характер, был осуществлен цитогенетический анализ интерфазных хромосом методом флюоресцентной гибридизации *in situ*. Для этого бластомеры извлекали из *zona pellucida* (рис.3.28 а) и дезагрегировали на отдельные бластомеры (рис.3.28 б).

Рис. 3.28. а - бластомеры 4-х клеточного эмбриона человека после удаления *zona pellucida*. Нативный препарат. Ув. х 800. Б - бластомер эмбриона человека перед фиксацией и гибридизацией. Нативный препарат. Ув. х 800.

При проведении FISH-анализа десяти эмбрионов человека после 48 ч культивирования *in vitro*, три эмбриона первой категории качества находились на стадии 4-х бластомеров, 7 эмбрионов (первой и второй категории качества) - на стадии 8-ми бластомеров. Все эмбрионы были зафиксированы и прошли успешную гибридизацию. FISH-анализ был возможен в 32 бластомерах (табл. 3.12).

Таблица 3.12

**Цитогенетический анализ эмбрионов человека до
криоконсервирования методом FISH-анализа**

Номер эмбриона	К-во клеток	Число FISH сигналов в хромосомах					Диагностика эмбриона
		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	Комплексный мозаик
	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	Комплексный мозаик
	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

Криоконсервировали 20 эмбрионов первой категории качества (четкие, ровные бластомеры равной величины, отсутствие фрагментации). На стадии 2-х бластомеров находились 5 эмбрионов

(25%), на стадии 4-х бластомеров - 10 (50%) и на стадии 8-ми бластомеров - 5 эмбрионов (25%). После деконсервирования 16 эмбрионов сохранили 50% интактных бластомеров, в 4 эмбрионах наблюдали полный лизис бластомеров. Таким образом, частота выживания эмбрионов после криоконсервирования составила 80%. Успешная гибридизация была осуществлена в 11 эмбрионах (68,8%). FISH-анализ был возможен в 37 бластомерах (табл. 3.13).

Таблица 3.13

**Цитогенетический анализ эмбрионов человека после
криоконсервирования методом FISH-анализа**

Номер эмбриона	К-во клеток	Число FISH сигналов в хромосомах					Диагностика эмбриона
		13	18	21	16	22	
1	1	2	2	2	2	2	Норма
2	1	4	4	4	4	4	Тетраплоид 4N
3	1	2	2	2	2	2	Комплексный мозаик
	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	Комплексный мозаик
	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	Мозаик 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	

По результатам анализа интерфазных ядер 80% нативных и 63,7% криоконсервированных эмбрионов обладали нормальным кариотипом (рис.2.29, а).

Полиплоидные мозаики (тетра- и гексаплоидные клеточные линии) были диагностированы в 18,2% эмбрионов после криоконсервирования (рис.3. 29, б).

Частота анеуплоидий по 13, 18, 21 и 22-й хромосомах в нативных и криоконсервированных эмбрионах статистически не различалась ($p>0,05$). Обращает на себя внимание высокая частота анеуплоидии с вовлечением 16 хромосомы в эмбрионах человека после криоконсервирования ($p<0,01$) (табл. 3.14).

Таблица 3.14.

**Частота анеуплоидий бластомеров нативных и
деконсервированных эмбрионов человека**

	Количество бластомеров с анеуплоидией, %		Ожидаемая частота, %**
Хромосома	Бластомеры деконсервированных эмбрионов аб., %	Бластомеры нативных эмбрионов аб., %	
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

Примечания:

1. * – отличия достоверны по сравнению со второй группой ($p<0.01$)

2. ** – теоретически ожидаемая частота рассчитывалась исходя из предположения, что хромосомы разных групп имеют одинаковую вероятность аномального расхождения.

Рис.3. 29. Бластомеры после флюоресцентной гибридизации *in situ*. а - тетраплоидный бластомер; б - диплоидный бластомер. Хромосома 13 (спектр красный); 16 (спектр голубой); 18 (спектр синий); 21 (спектр зеленый); 22 (спектр золотой), х 1000.

Цитогенетический анализ методом кариотипирования и флюоресцентной гибридизации *in situ* позволил определить, что преимплантационные эмбрионы, полученные в ходе оплодотворения *in vitro* ооцитов пациенток, участвующих в циклах лечения бесплодия, обладают высокой генетической гетерогенностью.

Факторы криоконсервирования оказывают влияние на морфологию последующего митоза, что выражается в увеличении нерасхождения хромосом, возникновении таких форм патологического состояния митоза, как колхициновый митоз и рассеивание хромосом в метафазе.

Возрастает количество хромосомных аномалий, связанных с митотическим аппаратом и функцией цитоскелета (происходит увеличение частоты мозаицизма и полиплоидизации клеток).

В связи с этим необходимым является проведение преимплантационной генетической диагностики, как нативных, так и криоконсервированных эмбрионов с целью выявления генетических патологий до переноса эмбрионов в полость матки пациенток, что необходимо для предотвращения рождения ребенка с хромосомными аномалиями.

3.2.5. Оценка состояния хроматина в бластомерах эмбрионов человека до и после криоконсервирования. Возможная селекция эмбрионов по состоянию хроматина бластомеров является индикатором эффективности криоконсервирования и надежным критерием функциональной активности генома бластомеров. Поэтому, мы посчитали целесообразным изучить состояние хроматина бластомеров в нативных и криоконсервированных эмбрионах человека. Визуализированные

хроматиновые субстанции, согласно классификации [293] разделяли на 2 вида:

1. плотный, компактный хроматин, окружающий ядрышки в виде кольца;
2. диффузный ядерный хроматин, без хроматинового кольца вокруг ядрышка.

Эмбрионы были разделены на две группы. В I группе нативные эмбрионы, помещали на 10 мин в краситель Хехст 33342, исследовали под флюоресцентным микроскопом. Эмбрионы II группы криоконсервировали.

Через 1 час после деконсервации окрашивали, с целью выяснения морфологического состояния хроматина. В каждой группе было изучено по 20 эмбрионов.

Среднее число бластомеров на эмбрион составило $5,1 \pm 0,2$ для нативных (I группа) эмбрионов и $4,4 \pm 0,2$ для криоконсервированных (II группа). Среднее количество бластомеров с компактным хроматином составило $4,0 \pm 0,1$ и $2,7 \pm 0,2$ для I и II групп соответственно.

Отмечается факт увеличения бластомеров с диффузным хроматином после криоконсервирования – $2,7 \pm 0,2$. Причем, при морфологической оценке такие эмбрионы выглядели, как жизнеспособные (рис. 3. 30).

В нативных эмбрионах количество бластомеров с диффузным хроматином на эмбрион составило $0,3 \pm 0,1$, что достоверно ниже, чем для криоконсервированных эмбрионов (рис. 3.31).

Рис. 3.30. а – деконсервированный эмбрион человека с многочисленными морфологическими нарушениями (изменение *zona pellucida*, фрагментация бластомеров). Нативный препарат. X 600. б – цельный, компактный хроматин одного бластомера и многочисленные участки диффузного хроматина эмбриона после обработки Хехст 33342. X 600.

Рис. 3.31. а – эмбрион человека на стадии 4-х бластомеров. Нативный препарат Ув.600. б – компактный хроматин трех бластомеров после обработки флюоресцентным красителем Хехст 33342. X 600.

Гибель клеток играет важную роль в эмбриогенезе, морфогенезе, дифференцировке, поддержании клеточного и тканевого гомеостаза. Апоптоз является одной из форм клеточной гибели клеток, характеризующейся специфической фрагментацией ДНК. Обнаруженная нами диффузная фрагментация ДНК может служить свидетельством апоптоза в эмбрионах человека после криоконсервирования.

3.2.6. Многоядерность бластомеров эмбрионов человека после криоконсервирования.

Целью данного этапа работы явилось изучение частоты возникновения многоядерных бластомеров в эмбрионах человека до и после криоконсервирования.

Эмбрионы были разделены на две группы. В I группе эмбрионы, оставшиеся после эмбриопереноса, культивировали до стадии бластоцисты. II группу эмбрионов, находящихся на стадии 2-4-х бластомеров, подвергали процедуре замораживания-оттаивания, после чего их культивировали *in vitro*.

Отмечали морфологические особенности нативных и деконсервированных эмбрионов каждые 24 ч культивирования. В нормально развивающемся эмбрионе, находящемся на стадии 2-4 бластомеров, четко визуализируются ядра (рис. 3.32). К эмбрионам первой категории качества относили эмбрионы с числом бластомеров, соответствующим срокам развития. Эмбрионы характеризовались отсутствием фрагментации и упорядоченным расположением четких, ровных, бластомеров. Во вторую категорию были отнесены эмбрионы с фрагментацией не более 25%.

Рис. 3.32. Эмбрион человека на стадии 2-х бластомеров (бластомеры одноядерные). Нативный препарат. Ув. х 600

Мы проанализировали нативные и деконсервированные эмбрионы, после 24 ч культивирования - 143 эмбриона I группы и 146 эмбрионов II группы.

Среднее число бластомеров эмбрионов I группы составило $3,7 \pm 0,1$. Первой категории качества 89,5% эмбрионов и 10,5% – второй. Перед процедурой криоконсервирования среднее число бластомеров II группы составило – $3,7 \pm 0,1$. Все эмбрионы были отнесены к первой категории качества.

После деконсервирования среднее число бластомеров в данной группе составило $2,8 \pm 0,1$. Снижение числа бластомеров в эмбрионах после процедуры замораживания-оттаивания связано с лизисом отдельных бластомеров после криоконсервирования. После криоконсервирования 75% эмбрионов соответствовали первой категории качества и 25% - второй.

Морфологический анализ эмбрионов контрольной группы через 24 и 48 ч культивирования выявил многоядерные бластомеры в 2,09% эмбрионов. Остальные эмбрионы характеризовались наличием одноядерных и безъядерных бластомеров.

При морфологической оценке эмбрионов, произведенной через 24 ч культивирования было обнаружено наличие многоядерных бластомеров в 8,2% эмбрионах после криоконсервирования. Нами были отмечены различные механизмы образования многоядерных бластомеров: а) двухъядерные макробластомеры, возникшие, очевидно, за счет слияния отдельных клеток - в трех эмбрионах (рис.3.33 а) и дробление ядер без разделения цитоплазмы - в девяти эмбрионах (рис. 3.33 б).

Мы провели цитогенетический и молекулярно-генетический анализ деконсервированных эмбрионов, в которых были обнаружены многоядерные бластомеры (табл. 3.15)

Рис.3.33. а - деконсервированный эмбрион человека на стадии 2-х бластомеров (образование двухъядерного макробластомера). Нативный препарат, х 600; б - деконсервированный эмбрион человека на стадии 2-х бластомеров (образование полиядерного макробластомера). Нативный препарат. Ув. х 600.

Таблица 3.15

**Морфофункциональный, цитогенетический и молекулярно-генетический анализ многоядерных
эмбрионов после криоконсервирования**

N	Количество бластомеров	До криоконсервирования		После криоконсервирования		Цитогенетический анализ	FISH анализ
		Категория качества эмбрионов	Количество клеток	Категория качества	Сохранность бластомеров		
1	2	1	2	1	100		Тетраплоид 4n
2	4	1	4	1	100		Мозаик 2n/6n
3	8	1	8	1	100		Мозаик 2n/4n
4	2	1	2	1	100	92,XX	
5	4	1	3	2	75	46 XX	
6	4	1	4	1	100	46 XX	
7	4	1	3	2	75	46 XY	
8	4	1	2	2	50	46 XX	
9	2	1	2	1	100	92,XY 92,XY	
10	4	1	4	1	100	46 XX	
11	4	1	4	1	100	92,XX	
12	2	1	2	1	100	46 XY	

Как при цитогенетическом, так и при FISH-анализе было установлено, что многоядерные бластомеры содержат полиплоидное число хромосом: в пяти случаях - тетраплоидное, в одном - гексаплоидное.

3.2.7. Молекулярно-генетический анализ экспрессии генов bcl-2 и bax в нативных и криоконсервированных эмбрионах человека. Существует два семейства генов, включающихся в процессы апоптоза. Семейство каспазных генов и Bcl-2 семейство. Мы изучили экспрессию 2 генов семейства Bcl-2: экспрессию гена индуктора апоптоза – bax и ингибитора апоптоза – bcl-2 в нативных и криоконсервированных эмбрионах человека с разной степенью фрагментации цитоплазмы (табл. 3.16).

Таблица 3.16

Качественная характеристика экспрессии генов bax и Bcl-2 в нативных и криоконсервированных эмбрионах человека

Нативные эмбрионы					Криоконсервированные эмбрионы				
№	К-во клеток	Категория качества эмбриона	мРНК присутствие (+) и отсутствие (-)		№	К-во клеток	Категория качества эмбриона	мРНК присутствие (+) и отсутствие (-)	
			bax	Bcl-2				bax	Bcl-2
1	2	2	+	+	1	5	2	+	+
2	2	2	+	+	2	2	4	+	-
3	2	3	+	+	3	2	3	+	+
4	4	4	+	-	4	1	2	+	+
5	4	4	+	-	5	8	3	+	-
6	4	2	+	+	6	4	4	+	-
7	4	2	+	+	7	2	2	+	+
8	4	2	+	+	8	4	4	+	-
9	4	1	-	+	9	4	2	+	+
10	5	2	+	+	10	4	1	-	+

Исходя из представленных данных, из 10 нативных эмбрионов - 7 характеризовались экспрессией *bcl-2* и *baх* генов. При морфологической оценке эти эмбрионы были отнесены ко второй и третьей категории качества. В одном эмбрионе первой категории качества присутствовал только *baх* ген. Два эмбриона с тотальной фрагментацией цитоплазмы характеризовались положительной оценкой по наличию проапоптического гена. После криоконсервирования 5 эмбрионов второй и третьей категории качества продемонстрировали наличие экспрессии *bcl-2* и *baх* генов. В одном эмбрионе первой категории качества присутствовал только *baх* ген; 4 эмбриона третьей-четвертой категории качества характеризовались экспрессией *Bcl-2* гена.

Таким образом, на основании проведенного нами исследования можно сделать следующие предварительные выводы:

- Факторы криоконсервирования оказывают влияние на морфологию последующего митоза, что выражается в увеличении патологических форм митоза, связанных с повреждением митотического аппарата.
- Медленное замораживание приводит к достоверному снижению митотического индекса, увеличению пикнотических ядер.
- Цитогенетический анализ методом кариотипирования и флюоресцентной гибридизации *in situ* позволил определить, что преимплантационные эмбрионы, полученные в ходе оплодотворения *in vitro* ооцитов пациенток, участвующих в циклах лечения бесплодия, обладают высокой генетической гетерогенностью.
- Возрастает количество хромосомных аномалий, связанных с митотическим аппаратом и функцией цитоскелета (происходит увеличение частоты мозаицизма и полиплоидизации клеток).

- Обнаруженная нами диффузная фрагментация ДНК в деконсервированных эмбрионах может служить свидетельством апоптоза в эмбрионах человека после криоконсервирования.

- Частота возникновения многоядерных бластомеров эмбрионов человека после криоконсервирования составляет 8,2%. Многоядерные бластомеры содержат полиплоидный набор хромосом. Основными механизмами, лежащими в основе образования многоядерных эмбрионов человека после криоконсервирования, являются слияние бластомеров либо супрессия цитокинеза после геномной дупликации.

- Наряду с общепризнанной морфологической оценкой бластомеров (количество, четкость контуров, сферичность, степень фрагментации, прозрачность, зернистость цитоплазмы) необходимым является строгий морфологический контроль количества ядер бластомеров после криоконсервирования.

- Возможность проведения отбора и отсеивания нативных и криоконсервированных эмбрионов еще до начала беременности, в случае обнаружения генетических патологий, является весьма перспективным методом профилактики рождения ребенка, страдающего наследственными заболеваниями.

По результатам данной главы опубликованы следующие печатные работы:

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., Жегунов Г.Ф., Петрушко М.П., Хроменкова О.Б. Причини низької ефективності програми ЗІВ: цитогенетичний аспект // Педіатрія, акушерство і гінекологія.- 2000.- № 2.- С.107-110.

3. Петрушко М.П. Цитогенетический анализ нативных и деконсервированных эмбрионов человека методом флюоресцентной гибридизации *in situ* // Экспериментальная и клиническая медицина.- 2004.- № 3.- С.339-344.

3.3. Вклад отцовского и материнского геномов в частоту нестабильности генетического аппарата эмбрионов человека

3.3.1. Цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов человека. Оплодотворение и предшествующие ему события (созревание гамет, овуляция) можно без преувеличения назвать кульминационными моментами репродуктивного процесса, во многом определяющими судьбу эмбриона. Поэтому важным этапом в технологии экстракорпорального оплодотворения является анализ причин неудач оплодотворения. Несмотря на многочисленные работы, посвященные терапии бесплодия методом ЭКО, многие проблемы остаются неразрешенными до настоящего времени. Основная из них - это невысокая результативность лечения.

Целью данного этапа работы явился цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов. При этом оценивали морфологические свойства получаемых гамет, условия культивирования, оплодотворения и дробления, принимался во внимание возраст супружеских пар, их соматический анамнез.

Для цитогенетического анализа использовали неоплодотворенные ооциты — клетки, в которых отсутствовали 2 пронуклеуса и не обнаруживались признаки дробления через 48 ч культивирования. Всего было аспирировано 3526 ооцитов, 78 % из

которых оплодотворились. У 22% ооцитов через 20 ч после инсеминации отсутствовали морфологические признаки оплодотворения - не визуализировались два пронуклеуса, отсутствовало второе полярное тельце (рис. 3.34).

Рис. 3. 34. Ооциты человека без признаков оплодотворения.
Нативный препарат, х 400.

Из 776 фиксированных ооцитов пригодными для цитогенетического анализа оказалось 386, что составило 49,7 % (табл. 3.17). В остальных случаях наблюдали дегенеративные изменения (сильная конденсация или деспирализация хроматина, слипание хромосом). Невысокий процент препаратов, пригодных для цитогенетического анализа связан, по нашему мнению, с тем, что ооциты фиксировали через 72 ч после их аспирации. За это время в неоплодотворенной яйцеклетке происходят деструктивные изменения, что делает невозможным проведение хромосомного анализа.

Таблица 3.17

**Результаты цитогенетического исследования неоплодотворенных
ооцитов человека**

	Кариотип	Количество ооцитов, n	Общее количество n, %
Норма	23,X	204	204 (52,8)
Гипергаплоидия	МII, 26X, +C,+C,+F	1	12 (3,1)
	МII, 26X, +B,+C,+F	1	
	МII, 25X, +F,+E	1	
	МII, 25X, +C,+F	2	
	МII, 24X,+C	1	
	МII, 24X,+G	2	
	МII, 24X,+E	2	
	МII, 23X, +Acht	1	
	МII, 23X, +Ccht	1	
Гипогаплоидия	МII, 19,X,-C,-E,-F,G	1	74 (19,2)
	МII, 20X,-C,-E,-F	2	
	МII, 20X, -C,-C,-E	2	
	МII, 20X,-C,-E,-E	2	
	МII, 20X,-C,-F,-F	2	
	МII, 21X, -E,-E	8	
	МII, 22X,-C	17	
	МII, 22X,-G	16	
	МII, 22X,-D	10	
	МII, 22X,-F	13	
	МII, 22,X,-B,	1	
Диплоидия	46, XX	51 (13,2)	
Ооциты с ПКХ		45 (11,7)	
Всего		386 (100)	

Для анализа частоты встречаемости гетероплоидии ооцитов, в зависимости от возраста исследовали три клинические группы. I группу составили 38 пациенток в возрасте до 25 лет, II - 41 человек от 25 до 35 лет и III - 40 пациенток старше 35 лет. Оказалось, что с возрастом пациенток увеличивается как частота анеуплоидии, так и частота полиплоидии половых клеток (табл. 3.18).

Таблица 3.18

Аномалии кариотипа неоплодотворенных ооцитов в зависимости от возраста женщины

Хромосомный статус	Группы пациенток,		
	I n=38	II n=41	III n=40
Гаплоидные ооциты (23,X): кол-во ооцитов на женщину, (M+m)	2,05±0,16	1,60±0,16*	1,50±0,17*
абс.кол., %	78 (22,9)	65 (19)	61 (17,9)
Диплоидные ооциты (46,X): кол-во ооцитов на женщину, M+m	0,11±0,05	0,40±0,13*	0,72±0,2**
абс.кол., %	4 (1,2)	18 (5,3)	29 (8,5)
Анеуплоидные ооциты (<,> 23,X) кол-во ооцитов на женщину, (M+m)	0,31±0,01	0,61±0,02	1,32±0,02**
абс.кол., %	11 (3,2)	24 (7,0)	51 (15,0)

Примечания:

1. * – достоверность отличий в сравнении с I группой, $p < 0,05$;
2. ** – достоверность отличий в сравнении с I группой, $p < 0,01$.

Диплоидные клетки составили 15 % от всех проанализированных ооцитов. Интересным явился тот факт, что из 51 диплоидной клетки 12 характеризовались гигантскими размерами, причем во всех гигантских ооцитах присутствовало первое полярное тело. В диплоидных ооцитах нормальных размеров полярное тело не визуализировалось.

В 86 клетках обнаружили различные аномалии числа хромосом и хромосомные aberrации (рис.3.35).

Полученное в наших исследованиях возрастание частоты хромосомной патологии с возрастом имеет тенденцию, аналогичную таковой в естественной популяции, однако показатели спонтанной патологии несколько ниже [295].

После аспирации клетки оценивали по степени зрелости, плотности *Corona radiata*, состоянию цитоплазмы. Зрелые ооциты инсеминировали через 4 ч, незрелые клетки культивировали от 6 до 12 ч перед инсеминацией.

Зрелые клетки имели круглую, ровную, светлую ооплазму, растяжимую, правильную, лучистую *Corona radiata*, светлые, большие клетки гранулезы. Из них 30,6% имели аномальный кариотип. Среди незрелых и перезревших клеток процент аномалий кариотипа составил 68,8% и 26,1% (табл. 3.19).

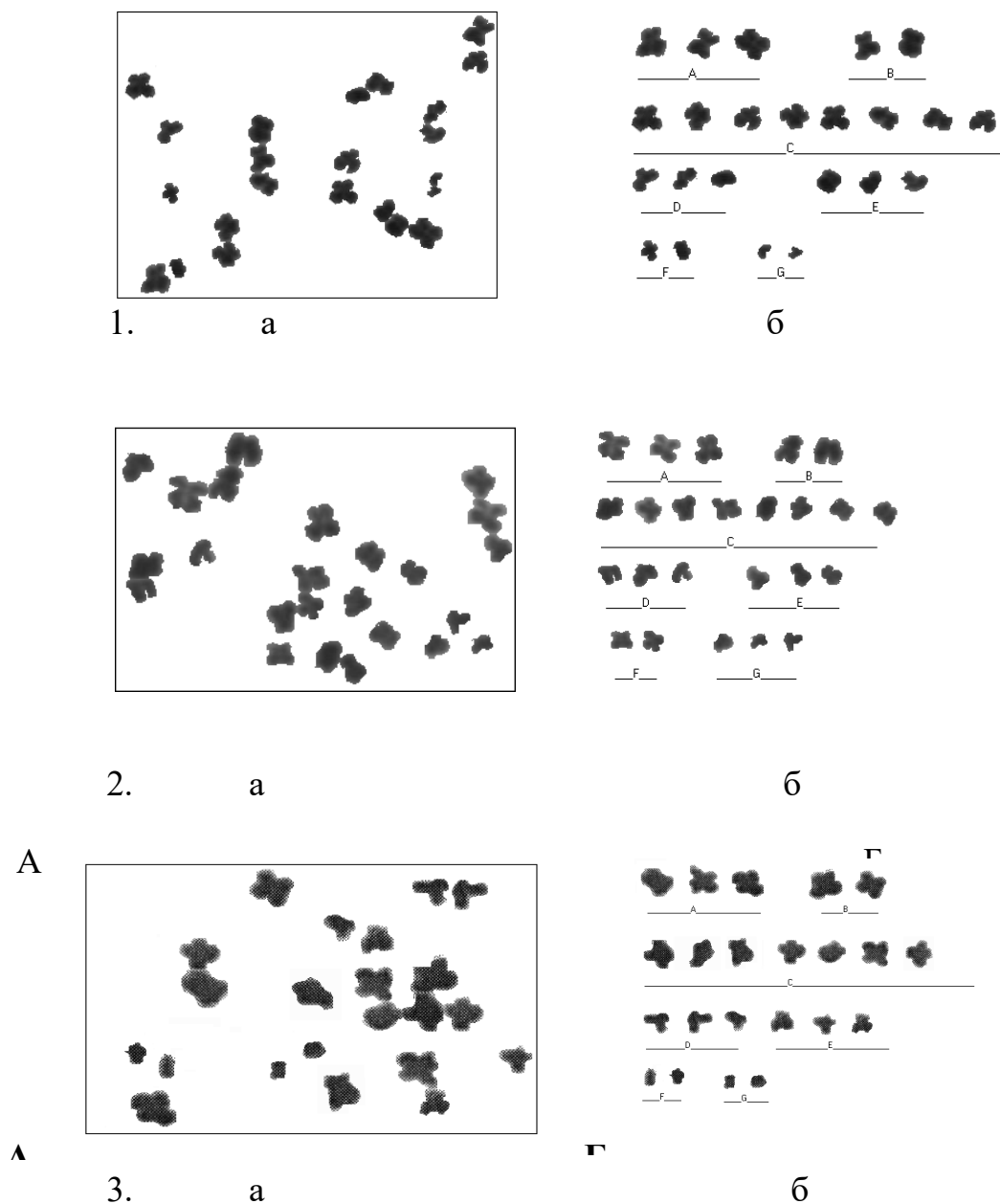


Рис.3.35. Хромосомы и кариограммы неоплодотворенных ооцитов человека:

1. Хромосомы (а) и кариограмма (б) гаплоидного ооцита на стадии метафазы II (23,X).
2. Хромосомы (А) и кариограмма (Б) гипергаплоидного ооцита на стадии метафазы II (24,X,+G).
3. Хромосомы (а) и кариограмма (б) гипогатлоидного ооцита на стадии метафазы II (23,X, - C).

Таблица 3.19

**Зависимость хромосомных аномалий ооцитов от степени
зрелости аспирированных клеток**

Цитогенетические характеристики ооцитов	Степень зрелости ооцитов		
	Зрелые	Незрелые	Перезревшие
	Абс. (%)	Абс. (%)	Абс. (%)
Гаплоидные ооциты (23,X):	109 (31,9)	30 (8,8)	65 (19,1)
Диплоидные ооциты (46,XX)	5(1,5)	36 (10,6)	10 (2,9)
Анеуплоидные ооциты (<,> 23,X)	43 (12,6)	30 (8,8)	13 (3,8)

Наиболее характерными типами аномалий неоплодотворенных ооцитов является анеуплоидия, полиплоидия и структурные перестройки хромосом.

3.3.2. Преждевременная конденсация хромосом спермиев в ооцитах человека, оплодотворенных *in vitro*. Благодаря возможности культивирования гамет и эмбрионов в условиях *in vitro*, описаны такие тонкие механизмы биологии оплодотворения, как капацитация спермиев, хемотаксис, акросомальная реакция, образование зиготы.

Однако в этой цепочке малоизученным остается процесс деконденсации хроматина спермия и его преобразование в мужской пронуклеус.

Поэтому, целью настоящего этапа исследования явилось выяснение состояния хроматина спермиев после оплодотворения ооцитов человека в условиях *in vitro*, выяснение зависимости частоты возникновения преждевременной конденсации хроматина спермиев от клинических данных пациентов и морфофункциональных характеристик ооцитов.

Морфологический анализ зигот, произведенный через 16 ч после инсеминации, показал, что из 3526 инсеминированных ооцитов 22,0 % не оплодотворились (в клетках отсутствовали два пронуклеуса, второе полярное тельце и признаки дробления через 48 ч после аспирации).

При цитогенетическом анализе было установлено, что 10,9% ооцитов характеризовались цитологическими признаками оплодотворения. Это выражалось в присутствии, наряду с хромосомами ооцитов, преждевременно конденсированных хромосом спермия (рис. 3.36). Цитогенетический анализ был возможен в 45 клетках.

Был проведен анализ частоты возникновения ооцитов, содержащих ПКХ спермия в зависимости от клинических данных пациенток и морфо-функциональных характеристик ооцитов.

Всем пациенткам использовали протоколы индукции суперовуляции с применением агонистов релизинг-гормона и метродина. В нашем исследовании индукцию суперовуляции проводили по единому принципу (длинный протокол с агонистами релизинг-гормона «Супрефакт» и фолликулостимулирующий гормон «Метродин»), поэтому зависимости частоты возникновения ооцитов с ПКХ спермиев от схем индукции суперовуляции выявлено не было.

Рис. 3.36. а - преждевременно конденсированные хромосомы спермия и хромосомы ооцита, находящегося на стадии МП. Фиксированный препарат. Окраска Романовского-Гимза, х1000; б - кариограмма.

С возрастом пациенток увеличивается частота одной из аномалий оплодотворения, а именно - преждевременная конденсация хромосом спермия в оплодотворенном ооците (табл. 3.20).

Таблица 3.20

Частота встречаемости ооцитов с ПКХ спермиев в зависимости от клинических данных пациенток

Параметр	I группа	II группа	III группа
	n = 5	n = 7	n = 7
Средний возраст пациенток, года	23,4±0,68	30,9±0,8	35,5±0,7
Кол-во клеток с ПКХ на пациентку	1,4±0,24	1,8±0,3	2,3±0,3
Частота клеток с ПКХ от числа аспирированных (%)	0,3±0,1	0,7±0,06	2,7±0,2*

Примечание: – достоверность отличий в сравнении с I и II группой, $p < 0,05$.

Интересным выявился факт увеличения частоты ПКХ с возрастанием количества аспирированных ооцитов. Так, при аспирации менее 10 ооцитов ПКХ обнаруживали лишь в 13,3 % случаев, если же было получено более 10 ооцитов - частота ооцитов с ПКХ спермиев увеличивалась до 86,7%. При аспирации большого числа ооцитов возрастает степень гетерогенности клеток, что, по всей видимости, оказывает влияние на оплодотворение. Что касается степени зрелости ооцитов, то явление ПКХ в незрелых клетках

встречается достоверно чаще, чем в зрелых или перезревших - 44,4 , 35,6 и 20 % соответственно (табл. 3.21).

Таблица 3.21

Морфологический и цитогенетический анализ ооцитов с ПКХ спермиев.

Цитогенетические Характеристики Ооцитов	Степень зрелости ооцитов			
	Незрелые	Зрелые	Перезревшие	Всего
Гаплоидные ооциты (23,X):				
кол-во ооцитов на женщину, (M+m)	-	0,4±0,13*	0,08±0,06	
абс.кол./ %	-	9(20,8)	2(4,4)	11(24)
Диплоидные ооциты (46,XX):				
кол-во ооцитов на женщину, (M+m)	0,72±0,12	0,2±0,1	0,3±0,11*	
абс.кол./ %	18(40)	5,(11,1)	7(15,6)	30(66,7)
Анеуплоидные ооциты (<,> 23,X)				
кол-во ооцитов на женщину, (M+m)	0,08±0,06	0,08±0,06	-	
абс.кол./ %	2 (4,4)	2 (4,4)	-	4(8)
Всего, абс.кол./ %	20(44,4)	16(35,6)	9(20)	45(100)

Примечания:

1. * – достоверность отличий в сравнении с группой незрелых диплоидных клеток, $p < 0,05$;

Полиплоидный набор хромосом содержало 80% зигот - 28 - триплоидный (24 - за счет дигинии, 4 - диандрии), 6 - тетраплоидный и 2 - пентаплоидный (табл. 3.22).

Таблица 3.22

Анализ хромосом зигот с ПКХ спермиев

Анализ клеток	Количество клеток, абс.
Оплодотворенные ооциты	45
Ооциты в МI + ПКХ одного спермия на стадии	24
-ранней профазы	2
-средней профазы	4
-поздней профазы	18
Ооцит в в МI + ПКХ	6
-двух спермиев	4
-трех спермиев	2
Ооцит в МII + ПКХ одного спермия на стадии	9
-ранней профазы	2
-средней профазы	2
-поздней профазы	5
Ооцит в МII + ПКХ	6
-двух спермиев	4
-трех спермиев	2

3.3.3. Оценка состояния хроматина спермиев человека.
Нарушение ядерной деконденсации может происходить из-за
аномального состояния хроматина спермия.

Целью данного этапа исследования явилось изучение влияния организации хроматина спермиев на их оплодотворяющую способность и раннее дробление эмбрионов *in vitro*.

Цвет головки спермия, окрашенного акридином оранжевым, определяется тиол-дисульфидным статусом ДНК–ассоциированных протаминов в ядре. Флюорохром акридинового оранжевого включается в двойную цепь ДНК как мономер и флюоресцирует зеленым цветом, в одинарную нить – как агрегат и флюоресцирует красным цветом (рис.3.37).

Мы проанализировали 63 образца спермы пациентов в программе ЭКО, которые после выделения активной фракции были окрашены флюоресцентным красителем акридиновым оранжевым и по результатам были разделены на две группы.

Образцы I группы (n=33) имели нормальную компактизацию хроматина (количество деконденсированных ядер не более $5 \pm 0,5\%$). Группу с аномальной укладкой хроматина (II группа) составили 30 образцов, в которых этот показатель составил более $5 \pm 0,5\%$.

Концентрация сперматозоидов в первой группе составила $98,1 \pm 3,2$ и $89,1 \pm 9,2$ млн/мл – во второй. Доля прогрессивно-подвижных форм составила $56 \pm 2,2$ и $48,8 \pm 0,9 \%$, соответственно. Доля морфологически аномальных спермиев составила $14,2 \pm 2,1\%$ и $24 \pm 2,2\%$.

Среднее количество аспирированных ооцитов было сравнимо в обеих группах и составило $5,9 \pm 0,7$ для I группы и $6,2 \pm 1,1$ – для II группы.

Частота оплодотворения в группе с нормальной организацией хроматина спермиев была выше, чем в группе с аномальной организацией.

Состояние нуклеарного хроматина оказывало влияние на качество эмбрионов, развившихся после оплодотворения ооцитов. Так в I группе количество эмбрионов первой категории качества составило $44,1 \pm 0,8\%$.

Рис. 3.37. Спермии человека после окрашивания акридин-оранжевым:

а – спермии с конденсированным хроматином,

б – спермии с деконденсированным хроматином.

Фиксированный препарат, х 1000.

Данные частоты оплодотворения и качества эмбрионов от состояния нуклеарного хроматина представлены в табл. 3.23.

Таблица 3.23.

Показатели сперматогенеза, частота оплодотворения и качество эмбрионов в группах с нормальным и аномальным состоянием хроматина

Показатель	Состояние хроматина	
	нормальное	аномальное
Концентрация сперматозоидов	98,1 ± 3,2	89,1 ± 9,2
Доля прогрессивно-подвижных форм	56±2,2	48,8±0,9*
Доля морфологически аномальных сперматозоидов	14,2±2,1**	24± 2,2
Среднее количество ооцитов	5,9±0,7	6,2±1,1
Частота оплодотворения	79±2,4	45±2,6**
Среднее число морфологически нормальных эмбрионов	4,1±0,8	2,2±0,6*

Примечание: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – в сравнении с группой нормальной организации хроматина.

Таким образом, организация хроматина спермиев коррелирует с морфофункциональными показателями эякулята и может оказывать влияние на частоту фертилизации и раннее развитие эмбрионов в программе ЭКО. Известно, что экспрессия мужского генома происходит в эмбрионах человека на стадии 4-8 бластомеров.

Возможно, аномалии в механизмах, контролирующих компактизацию хроматина спермиев, сказываются уже на ранних стадиях развития эмбрионов, что проявляется в повышении степени цитоплазматической фрагментации.

3.3.4. Морфофункциональные и цитогенетические характеристики зигот с аномальным количеством пронуклеусов. Целью данной части работы явился анализ частоты возникновения зигот с аномальным количеством пронуклеусов при проведении программы ЭКО, изучение морфологических характеристик, темпов дробления таких эмбрионов *in vitro* и выяснение их генетического статуса.

Через 16-20 ч после инсеминации зиготы с аномальным количеством пронуклеусов переносили в отдельную среду культивирования. Наблюдение за развитием эмбрионов проводили в течение 7 сут, до достижения стадии вылупившейся бластоцисты.

2750 зигот было получено после инсеминации 3526 ооцитов. В 95% обнаружили признаки нормального оплодотворения (два пронуклеуса), 1,2% зигот выявились апроноуклеарными, в 0,7% – один, в 1,2% - три, и в 1,9% случаев было обнаружено 4 и более пронуклеусов (полипронуклеарные) (рис.3.38. а, б, в, г).

Все зиготы культивировали в условиях *in vitro* и через каждые 24 ч отмечали морфологические характеристики дробящихся эмбрионов и количество бластомеров. Прижизненное наблюдение за морфологическими характеристиками и темпами дробления позволило установить, что все нормально оплодотворенные клетки продолжили свое развитие *in vitro*, тогда, как $44,1 \pm 4,1$ % трех-,

57,9±4,8% одно-, 76,9±6,5% поли- и 53,1±5,1% апроноуклеарных зигот остановили свое развитие до первого деления дробления.

Рис. 3.38. Эмбрионы человека на стадии зигота с аномалиями оплодотворения:

а - апроноуклеарная,

б – однопроноуклеарная,

в – трехпроноуклеарная,

г) – 6-ти проноуклеарная зигота. Нативный препарат, х 400.

Для дробящихся а-, одно- и двухпронуклеарных эмбрионов характерно наличие 4-х бластомеров через 24 ч культивирования, для трехпронуклеарных - характерно наличие 3-х бластомеров (табл. 3.24).

Таблица 3.24

**Характеристика темпов дробления эмбрионов человека с
различным количеством пронуклеусов через 24 ч
культивирования**

Количество бластомеров	Количество пронуклеусов в зиготах				
	0 PN	1 PN	3 PN	4 PN и более	2 PN
2 бластомера	1 (6,7)	2 (25)	4 (21,1)	1 (8,3)	266 (10,3)
3 бластомера	1 (6,7)	0 (0)	10 (52,6)	0 (0)	20 (0,7)
4 бластомера	5(33,3)	3 (37,5)	5 (26,3)	9 (75)	2001 (77,2)
5 бластомеров	8 (53,3)	3 (37,5)	0 (0)	2 (16,7)	306 (11,8)

Стадии вылупившейся бластоцисты достигло 26,7% апроноуклеарных, 25 – одно-, 29 – двух, 21 – трех. Ни одна из полипронуклеарных зигот не достигла стадии бластоцисты. Темпы дробления изучаемых эмбрионов опережают таковые показатели нормально оплодотворенных, поскольку достижение стадии вылупившейся бластоцисты было отмечено через 96-100 ч

культивирования (для двухпронуклеарных эмбрионов этот временной параметр составляет 120-144 ч). Полипронуклеарные зиготы характеризовались высокой степенью фрагментации цитоплазмы бластомеров.

У женщин старше 35 лет аномалии оплодотворения встречались чаще, чем у женщин молодого возраста (табл. 3.25).

Таблица 3.25

Частота возникновения одно-, трех-, а- и полипронуклеарных зигот в зависимости от возраста пациенток

Количество пронуклеусов в зиготах	Частота обнаружения аномальных зигот, %		
	I группа (до 25 лет)	II группа (25-35 лет)	III группа (старше 35 лет)
0PN	1,2±0,2	1,3±0,2	1,7±0,2*
1PN	1±0,1	1,2±0,2	1,9±0,3*
3PN	1,4±0,2	1,8±0,3	2,3±0,3*
более 4-х PN	1,3±0,2	1,5±0,2	2,1±0,2*

Примечание: * – достоверность отличий в сравнении с I и II группой, $p < 0.05$.

Так, если в группе женщин до 25 лет частота возникновения апроноуклеарных зигот составила 1,2±0,2%, то в старшей возрастной группе этот показатель увеличился до 1,7±0,2. Интересным в данном

аспекте является факт возрастания полиплоидных зигот (три-, четыре и более) с возрастом. Если в I группе пациенток этот показатель составил $1,3 \pm 0,2\%$, то в старшей возрастной группе увеличился до $2,1 \pm 0,2\%$.

Для всех пациенток индукция суперовуляции осуществлялась по длинному протоколу с использованием агонистов гонадотропин-рилизинг гормона и рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (фоллитропин α), поэтому мы не можем сделать вывод о влиянии схем индукции суперовуляции на возникновение данной патологии оплодотворения.

В 32 (94,12 %) случаях трехпронуклеарные зиготы возникали после оплодотворения сперматозоидами из нормоспермических эякулятов, в 2 (5,88%) - при олигоастеноспермии. Одно- и апроноуклеарные зиготы были обнаружены после оплодотворения ооцитов нормоспермическими эякулятами.

Кроме того, количество аномальных зигот пропорционально возрастало с увеличением частоты оплодотворения аспирированных ооцитов (рис.3.39). При общей частоте оплодотворения 50% количество аномальных зигот не превышало 10%. При частоте оплодотворения – 80% частота встречаемости а-, одно-, трех и полипронуклеарных зигот составляла порядка 22-24%. Обратил на себя внимание факт, что высокая частота оплодотворения ооцитов (90-100%) связана с возрастанием частоты полиплоидии.

Важным является вопрос корреляции между количеством пронуклеусов в оплодотворенной яйцеклетке и ее генетическим балансом. Этот вопрос достаточно актуален, поскольку анализ зигот в технике ЭКО является наиболее ответственным, и эмбрионы, с наличием аномального числа пронуклеусов не переносятся в полость

матки пациентки в связи с высоким риском возникновения хромосомной патологии плода [296].

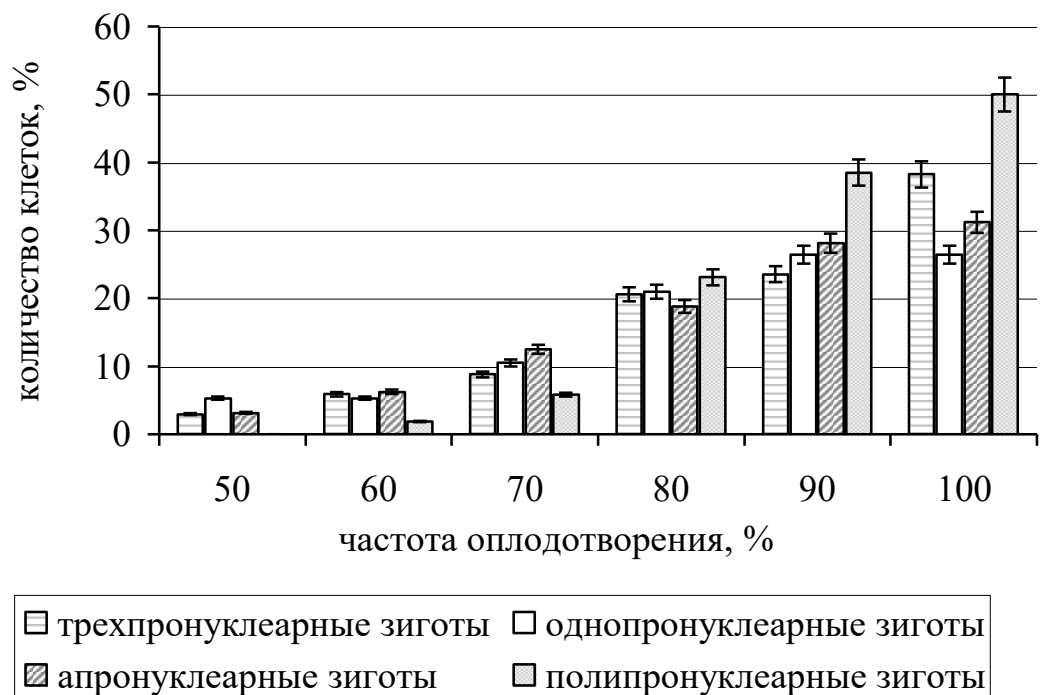


Рис.3.39. Частота возникновения зигот с аномальным количеством пронуклеусов от частоты оплодотворения ооцитов.

62,5% и 66,7% апропунклеарных и однопунклеарных зигот, соответственно, выявились диплоидными. 60% трехпунклеарных – триплоидными (рис.3.40).

Рис. 3.40. а – кариограмма, б - хромосомы триплоидного эмбриона. Фиксированный препарат. Окраска Романовского-Гимза, х 1000.

Цитогенетический анализ, осуществляемый при проведении программ вспомогательных репродуктивных технологий, позволяет оценить качество получаемых гамет, этап, на котором остановилось развитие эмбрионов, аномалии процесса оплодотворения и дробления и целый ряд других патологических изменений, определить которые иными способами не представляется возможным. Цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов и обнаружение цитологических признаков фертилизации позволяет понять истинные причины "неудач" оплодотворения и объяснить возможные причины идиопатической формы бесплодия.

Таким образом, проведенные исследования позволили сделать следующие предварительные выводы:

- Неоплодотворенные ооциты человека характеризуются высокой генетической гетерогенностью. Наиболее характерными типами аномалий неоплодотворенных ооцитов является анеуплоидия, полиплоидия и структурные перестройки хромосом.
- Частота хромосомной нестабильности коррелирует с возрастом пациенток и степенью зрелости аспирированных ооцитов.
- Частота возникновения ооцитов с преждевременно конденсированными хромосомами спермиев составляет 10,9%.
- Поскольку ПКХ спермиев встречается чаще в незрелых ооцитах, рекомендуется проведение дозревания ооцитов с последующим проведением программы ICSI.
- Частота возникновения зигот с аномальным количеством пронуклеусов в программе экстракорпорального оплодотворения составляет 0,7-1,23 %.

Зиготы с аномальным количеством пронуклеусов достоверно чаще встречаются у женщин старше 35 лет. Частота возникновения аномальных зигот зависит от морфо-функциональных характеристик

ооцитов: в перезревших ооцитах возрастает частота образования полипронуклеарных зигот.

- Большинство аномально оплодотворенных зигот прекращает свое развитие до первого деления дробления. Эмбрионы, развившиеся из трехпронуклеарных зигот в условиях *in vitro*, демонстрируют высокий уровень асинхронности развития. До 50% трехпронуклеусных эмбрионов триплоидны.
- Необходимым является ведение четкого контроля наличия пронуклеусов во избежание переноса эмбрионов, несущих аномальный набор хромосом, что в свою очередь ведет к ранним эмбриональным потерям и высокой частоте спонтанных аборт.

По результатам данной главы опубликованы следующие печатные работы:

1. Петрушко М.П. Цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов человека // Цитология и генетика.- 2003.- № 6.- С.50-56.
2. Грищенко В.И., Петрушко М.П., Ерогова Н.Н., Пиняев В.И. Преждевременная конденсация хромосом спермиев в ооцитах человека, оплодотворенных *in vitro* // Цитология и генетика.-2004.- №2.- С.55-60.
3. Грищенко В.И., Петрушко М.П., Ерогова Н.Н., Пиняев В.И. Морфо-функциональные и цитогенетические характеристики трехпронуклеарных зигот человека в программе ЭКО // Цитология и генетика.- 2004.- №1.- С.21-26.

3.4. Повышение жизнеспособности нативных и криоконсервированных эмбрионов человека путем сокультивирования

3.4.1. Морфофункциональные характеристики нативных и криоконсервированных эмбрионов человека при сокультивировании. Культивирование преимплантационных эмбрионов млекопитающих вне организма является необходимым звеном при проведении экспериментально-эмбриологических исследований. Общеизвестно, что оптимальные условия для культивирования эмбрионов и их развития *in vitro* окончательно не определены. Важным является вопрос реабилитации эмбрионов человека после процедуры криоконсервирования, в связи с чем, появляется необходимость добавления в среду их культивирования биологически активных веществ, способствующих развитию эмбрионов *in vitro*.

Поэтому актуальным остаются поиск и создание наиболее эффективных сред для культивирования преимплантационных эмбрионов человека, как нативных, так и после криоконсервирования.

Условия пребывания эмбрионов человека *in vitro* являются субоптимальными. Это подтверждается тем фактом, что стадии вылупившейся бластоцисты достигает не более 50% эмбрионов [297]. Длительность времени культивирования ассоциируется с блоком развития или потерей жизнеспособности. Большинство методик вспомогательных репродуктивных технологий основаны на переносе эмбрионов, как правило, через 24-48 ч культивирования, поскольку дальнейшее развитие эмбрионов *in vitro* является проблематичным [298].

Целью настоящего этапа исследований явилось изучение морфофункциональных характеристик нативных и криоконсервированных эмбрионов, культивируемых с биологически активными жидкостями, клетками кумулюса и гранулезы.

Эмбрионы были разделены на четыре группы - контроль и исследуемые группы, в которых эмбрионы были помещены в различные системы аутологического культивирования. Через 48 ч сравнивали темпы дробления и морфологические характеристики эмбрионов в различных культуральных системах.

Обращает на себя внимание, что $45 \pm 3,6$ и $40,8 \pm 3,9\%$ нативных и криоконсервированных эмбрионов были отнесены к первому и второму классу морфологической оценки при культивировании в стандартной среде (табл. 3.26).

В последнее время интерес исследователей направлен на использование биологически активных жидкостей для культивирования гамет и эмбрионов в условиях *in vitro*. Фолликулярная жидкость легко может быть получена в достаточном количестве и является натуральной средой, обладающей всеми необходимыми компонентами для активации капацитативных свойств и акросомной реакции сперматозоидов, оплодотворения и ранних этапов дробления эмбрионов [299].

В наших работах показано, что фолликулярная жидкость обладает стимулирующим эффектом и повышает качественные характеристики мужских гамет на этапе выделения активноподвижной фракции спермиев. Кроме того, добавление фолликулярной жидкости на этапе оплодотворения позволяет увеличить количество нормально оплодотворенных зигот и улучшить морфологические характеристики эмбрионов человека.

Таблица 3.26

Влияние систем сокультивирования на морфологические характеристики эмбрионов человека

Системы культивирования	Контроль		Криоконсервированные эмбрионы	
	Количество эмбрионов n	Количество эмбрионов первой категории качества, 48 ч культивирования %	Количество эмбрионов n	Количество эмбрионов первой категории качества, 48 ч культивирования %
Стандартная среда	20	45,0±3,6	20	40,8±3,9
Стандартная среда +20% фолликулярная жидкость	18	17,0±1,3*	20	20,4±1,9*
Стандартная среда +20% сыворотка крови	22	81,4±2,4**	21	76,7±3,7**
Сокультивирование с клетками кумулюса и гранулезы	24	92,2±2,2**	22	86,4±3,2**

Примечание:

1. * $P < 0,01$ - по сравнению со стандартной средой,
2. * $P < 0,001$ - по сравнению со стандартной средой.

Добавление в среду культивирования 4-х клеточных эмбрионов фолликулярной жидкости, индуцировало цитоплазматическую фрагментацию, а некоторых случаях вело к блоку дробления. Только $17 \pm 2,3\%$ нативных и $20,4 \pm 2,9\%$ криоконсервированных эмбрионов характеризовались отсутствием фрагментации при добавлении этой жидкости в состав культуральной среды ($p < 0,01$ в сравнении со стандартной средой культивирования).

Иная картина наблюдается при добавлении в среду культивирования преовуляторной сыворотки. Так, $81,84 \pm 2,4\%$ нативных эмбрионов характеризовались отсутствием фрагментации, ровными, симметричными бластомерами. После криоконсервирования $76,7 \pm 5,7\%$ эмбрионов, культивируемых в присутствие преовуляторной сыворотки были отнесены к первой категории качества.

Сокультивирование эмбрионов на монослое клеток кумулюса и гранулезы позволило добиться высоких показателей качества эмбрионов ($p < 0,001$ по-сравнению с использованием стандартной среды). $92,2 \pm 8,2$ и $86,4 \pm 8,2\%$ нативных и криоконсервированных эмбрионов, культивируемых на монослое данных клеток при морфологической оценке были отнесены к эмбрионам первой категории качества (рис. 3.41).

Следует отметить, что в средах с сывороткой практически все образовавшиеся в результате культивирования и вышедшие из *zona pellucida* бластоцисты прикреплялись к ее поверхности, после чего шло разрастание клеток трофэктодермы и формирование хорошо видимого узелка из клеток внутренней клеточной массы. В то же время в средах без сыворотки ни в одном из случаев не наблюдалось прикрепления вылупившихся бластоцист и разрастания клеток.

Таким образом, сокультивирование эмбрионов человека на клетках кумулюса заметно снижает количество эмбрионов с признаками фрагментации, хотя данные в сравнении с эмбрионами, культивируемых с преовуляторной сывороткой, статистически не достоверны ($p < 0,05$).

Рис. 3.41. Эмбрион человека первой категории качества после культивирования 48 ч на монослое клеток кумулюса и гранулезы. Нативный препарат, $\times 600$.

Следовательно, добавление биологически активных жидкостей *in vitro* способствует снижению числа эмбрионов с признаками фрагментации, поэтому они могут быть использованы в качестве систем сокультивирования как для нативных, так и для криоконсервированных эмбрионов.

3.4.2. Биохимические характеристики биологически активных жидкостей в системе сокультивирования. Наблюдаемые нами различия качественной оценки эмбрионов человека, находящихся в средах с различными биологическими добавками, зависят, скорее всего, от типа культуральной среды и связаны, по-видимому, с разным содержанием гормонов, белков, ростовых факторов и других биологически активных веществ. Биохимические показатели фолликулярной жидкости и преовуляторной сыворотки свидетельствуют о достаточно большом содержании в них общего белка (табл. 3.27). Так, в фолликулярной жидкости этот показатель составил $73,8 \pm 4,1$ г/л, в преовуляторной сыворотке крови - $82,4 \pm 2,2$ г/л.

При исследовании содержания общего белка и белковых фракций нами было установлено, что относительное содержание α 1-глобулинов в образцах фолликулярной жидкости и преовуляторной сыворотки крови пациенток находилось в пределах физиологической нормы и составляло $3,7 \pm 0,3$ и $3,1 \pm 0,4$ г/л соответственно. Состав данных сред достоверно отличался по количеству альбуминов и β -глобулина. Что касается содержания в данных биологически активных средах γ -глобулина, то его количество в фолликулярной жидкости и преовуляторной сыворотке крови было примерно одинаково и составило $17,3 \pm 1,2$ и $18,9 \pm 1,3$ соответственно.

Таблица 3.27

**Содержание общего белка и белковых фракций в
преовуляторной сыворотке крови и фолликулярной жидкости
человека**

Тип БАЖ	Общий белок г/л	Альбумины %	Глобулины, г/л			
			α -1	α -2	β	γ
Фолликулярная жидкость	$73,8 \pm 4,1^*$	$42,2 \pm 1,2^*$	$3,7 \pm 0,3^*$	$9,2 \pm 0,9^*$	$11,9 \pm 0,9^*$	$17,3 \pm 1,2$
Преовуляторная сыворотка крови	$82,4 \pm 2,2$	$65,3 \pm 2,1$	$3,1 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,6$	$6,8 \pm 0,8$	$18,9 \pm 1,3$

Примечание: * – достоверное отличие по сравнению с содержанием вещества в преовуляторной сыворотке, $p < 0,05$.

Мы изучили аминокислотный состав преовуляторной сыворотки человека с целью определения, какие именно аминокислоты способствуют развитию эмбрионов человека в культуре. Характерной особенностью стандартной среды культивирования является отсутствие таких аминокислот, как креатин, серин, лизин. Из 18-ти проанализированных аминокислот в стандартной среде культивирования количество фенилаланина больше, чем в сыворотке крови и фолликулярной жидкости. Обращает на себя внимание факт повышенной концентрации в преовуляторной сыворотке крови таких аминокислот, как триптофан, пролин, валин, орнитин, глутамин и лейцин (табл. 3.28).

Таблица 3.28

Аминокислотный состав биологически активных жидкостей

Аминокислота	Стандартная среда культивирования	Преовуляторная сыворотка	Фолликулярная жидкость
Креатин	0	0,154±0,012	0,074±0,001
Серин	0	0,029±0,007	0,012±0,001
Аспарагин	0,075	0,038±0,006	0,016±0,004
Глутамин	0,073	0,617±0,039*	0,436±0,022*
Глицин	0,019	0,073±0,008	0,0672±0,006
Гистидин+таурин	0,031	0,246±0,034	0,220±0,027
Триптофан	0,009	0,239±0,176	0,204±0,010
Аланин+аргинин	0,282	0,571±0,030	0,457±0,023
Пролин	0,017	0,305±0,111*	0,298±0,092*
Тирозин	0,056	0,042±0,002	0,032±0,001
Валин	0,053	0,259±0,011*	0,116±0,010*
Метионин	0,017	0,035±0,002	0,020±0,001
Цистеин	0,018	0,016±0,001	0,017±0,001
Изолейцин	0,054	0,076±0,004	0,060±0,021
Лейцин	0,059	0,167±0,014*	0,069±0,022
Фенилаланин	0,035	0,085±0,011	0,044±0,032
Орнитоин	0,091	0,338±0,029*	0,126±0,04
Лизин	-	0,427±0,023	0,08±0,02

Примечание: *— достоверное отличие по сравнению со стандартной средой культивирования, $p < 0,01$.

Как показали результаты исследования, концентрация половых гормонов в фолликулярной жидкости оказалась достоверно выше ($p<0,05$) значений аналогичных гормонов в сыворотке крови пациенток (табл. 3.29).

Таблица 3.29

Количество стероидных гормонов в преовуляторной сыворотке и фолликулярной жидкости

Тип БАЗ	Стероидные гормоны		
	Эстрадиол Пг/мл	Прогестерон Нг/мл	Тестостерон мкг/мл
Фолликулярная жидкость	984,8±12,2*	219,3±15,3*	130±26,0*
Преовуляторная сыворотка крови	142,0±7,5	15,9±0,2	59±1,1

Примечание: *— достоверное отличие по сравнению со стандартной средой культивирования, $p<0,01$.

Так, содержание эстрадиола и прогестерона в фолликулярной жидкости в несколько раз выше содержания этих гормонов в преовуляторной сыворотке крови ($p<0,001$).

Важную роль в возникновении и развитии различного рода патологий эмбрионов отводят свободнорадикальному окислению липидов в среде культивирования. Данных об исследованиях активности антиоксидантной системы среды культивирования эмбрионов в доступной нам литературе обнаружить не удалось. Поэтому в настоящем разделе работы проведено исследование

антирадикальной активности и активности ряда антиоксидантных ферментов стандартной среды культивирования и сред, с добавлением биологически активных веществ. Поскольку, можно предположить наличие в этих средах особых систем, обладающих антиоксидантным действием, способных предохранять мембрану клеток, в частности эмбрионов, от токсического влияния свободных радикалов.

Мы изучили активность антиоксидантной системы фолликулярной жидкости и преовуляторной сыворотки крови пациенток.

Исследования, проведенные на 22 образцах фолликулярной жидкости 20 образцах сыворотки преовуляторной крови пациенток, показали, что фолликулярная жидкость и сыворотка крови обладают селензависимой глутатионпероксидазной активностью (табл. 3.30).

Данные биологически активные жидкости имеют селен-независимую пероксидазу, активность которой ниже, по сравнению с селен-зависимой глутатионпероксидазой. Важно подчеркнуть, что селен-независимая глутатионпероксидаза является, по крайней мере, одним из изоферментов глутатион-S-трансферазы, которые могут утилизировать вторичные продукты ПОЛ. Обнаружена также существенная активность глутатионредуктазы – основного фермента, генерирующего восстановленный глутатион для глутатионзависимой антиоксидантной системы.

Обнаруженные эффективные антиоксидантная и антирадикальная активности фолликулярной жидкости человека и преовуляторной сыворотки крови, по-видимому, определяют их положительное действие на морфофункциональные характеристики эмбрионов человека. Очевидно, присутствие данных биологических жидкостей в культуральной среде создает тот биохимический фон, который способствует нормальному развитию эмбрионов.

Таблица 3.30

**Активность ферментов антиоксидантной системы
фолликулярной жидкости и преовуляторной сыворотки крови**

Вид активности	Фолликулярная жидкость	Преовуляторная сыворотка крови
Глутатионпероксидазная селензависимая активность (нмоль NADPH/мл за 1 мин)	133,9±5,7	108,8±4,2
Глутатионпероксидазная селеннезависимая активность (нмоль NADPH/мл за 1 мин)	91,0±10,5	112,4±10,1
Глутатион-s-трансферазная активность (нмоль /мл за 1 мин)	252,4±25,5	282,2±28,8
Глутатионредуктазная активность (нмоль /мл за 1 мин)	26,0±1,8	26,4±1,6

Нами была исследована способность фолликулярной жидкости и сыворотки преовуляторной крови пациенток перехватывать один из высокоактивных радикалов кислорода, ответственных за активацию ПОЛ – ОН-радикал. Как видно из представленных в табл. 3.31 данных, 20% фолликулярная жидкость и преовуляторная сыворотка крови замедляет разрушение деоксирибозы ОН-радикалами более, чем на 65%, что является сравнимым с антирадикальным действием

известных перехватчиков ОН-радикалов этанола и триса в концентрации 10мМ.

Таблица 3.31

**Сравнительная оценка антирадикальной активности
фолликулярной жидкости, преовуляторной сыворотки крови,
этанола и триса**

Варианты опыта	Единицы оптической плотности, Е	Антирадикальная активность
Контроль	1,27±0,01	-
Фолликулярная жидкость (0,1 мл/мл реакционной среды)	0,46±0,02*	63,6±2,1
Преовуляторная сыворотка крови (0,1 мл/мл реакционной среды)	0,62±0,01	66,7±3,3
Этанол	0,41±0,03	67,6±2,3
Трис (оксиметил) Аминометан (10мМ)	0,41±0,03	66,0±2,6

Таким образом, применение аутологических систем сокультивирования *in vitro* способствует снижению числа эмбрионов с признаками фрагментации как в нативных, так и в деконсервированных эмбрионах в основном за счет увеличения в среде культивирования концентрации таких аминокислот, как триптофан, пролин, валин, орнитин, глутамин и лейцин.

Изучение развития эмбрионов углубляет наши знания о преимплантационном эмбриогенезе, а с практической точки зрения способствует созданию более эффективных систем культивирования ранних зародышей человека *in vitro*. Наши результаты свидетельствуют о перспективности использования преовуляторной сыворотки и систем сокультивирования преимплантационных эмбрионов млекопитающих при проведении как экспериментальных, так и практических работ.

По результатам исследования можно сделать следующие предварительные выводы:

- сокультивирование *in vitro* с фолликулярной жидкостью, преовуляторной сывороткой крови, клетками кумулюса и гранулезы способствует снижению числа эмбрионов с признаками фрагментации как в нативных, так и в деконсервированных эмбрионах. Наличие биологически активных веществ в среде культивирования эмбрионов может создавать те биохимические и биофизические условия, сходные с теми, что окружают преимплантационный эмбрион в маточных трубах и матке, за счет повышенного содержания таких аминокислот, как триптофан, пролин, валин, орнитин, глутамин и лейцин, а так же за счет антирадикальной и антиоксидантной активности применяемых биологических сред.

По результатам данного раздела работы опубликованы следующие работы:

1. 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.
2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Петрушко М.П., Пиняев В.И., Грищенко Н.Г. Оптимизация программы экстракорпорального оплодотворения путем использования биологически-активных сред // Збірник наукових праць Асоціації акушерів-гінекологів України, Київ.- 2001.- С. 173-175.
 6. Грищенко М.Г., Петрушко М.П., Пиняев В.И., 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.

РАЗДЕЛ 4

АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В последнее время усилия специалистов по лечению бесплодия направлены на разработку методов, обеспечивающих сохранение семейного генофонда [300–307]. Вспомогательные репродуктивные технологии требуют постоянного совершенствования и, в частности, более эффективной процедуры криоконсервирования, которая бы позволила не только получить высокую выживаемость, но и обеспечила бы генетическую полноценность эмбрионов человека, поскольку проявления повреждающего действия криоконсервирования многообразны и затрагивают различные уровни биологической организации клеток.

В соответствии с задачами исследования, предстояло выяснить влияние факторов криоконсервирования и условий культивирования на морфологическую целостность и генетическую стабильность преимплантационных эмбрионов человека.

Необходимым считаем обсуждение в данном разделе этических аспектов исследования на преимплантационных эмбрионах человека.

Проблемы биомедицинской этики в репродукции и, в первую очередь, о статусе эмбриона только начинают подниматься [308, 309]. При обсуждении медико-биологических, морально-этических аспектов определения предельного возраста эмбриона, допустимого для использования в эксперименте, ведущие эмбриологи мира называют, как правило, период до 14-го дня развития (начало формирования первичной полоски и появления элементов нервной системы) или срок до 30-го дня развития (начала дифференцировки

структур головного мозга). Эмбрион до 14 дня развития принято считать «преэмбрионом», поскольку на построение истинно эмбриональных клеток пойдет только один бластомер внутренней клеточной массы бластоцисты, остальные же клетки являются основой провизорных органов [310]. Однако эмбрион является общественным объектом, принадлежащим супружеской паре и судьбу эмбриона решают они. Большая часть среди участвующих в обсуждении этой проблемы специалистов - медики, биологи, философы, социологи, правоведы, учитывая невозможность в настоящее время решить вопрос о статусе эмбриона человека и нецелесообразность остановить использование ВРТ, придерживаются следующей позиции: исследования *in vitro* на эмбрионах до 14-го дня развития после оплодотворения являются этически приемлемыми.

Одним из основных правил нашей работы явился строгий учет основных постулатов биомедицинской этики и правило получения от пациентов письменного, информированного и добровольного согласия на проведение научных исследований с их репродуктивными клетками и эмбрионами.

Репродуктивные технологии принципиально ничем не отличаются от других видов медицинской помощи, и для многих семейных пар это единственный шанс иметь детей. ВРТ – результат научного прогресса, они приносят пользу человеку и в юридическом плане соответствуют требованиям международного и украинского законодательства.

При проведении криоконсервирования эмбрионов очень важно сделать правильный выбор криопротектора и его концентрации, оптимального режима замораживания и оттаивания. При несоблюдении каждого из перечисленных условий высокая

концентрация солей, обусловленная потерей воды, вызывает нарушение проницаемости клеточных мембран, клетка не успевает регулировать осмотическое равновесие, в результате чего зародыш подвергается осмотическому шоку. Неправильный подбор скоростей охлаждения служит причиной необратимых процессов, возникающих на микромолекулярном уровне: изменению pH в эндоцеллюлярной жидкости, что приводит к денатурации белковых молекул; разрушению связанной воды и сжатию клеток; деформации мембран и инактивации ферментов; спонтанному образованию больших кристаллов льда, что является следствием разрыва цитоплазматических мембран, мембран клеточных органелл и протеиновых гелей. Результатом всех этих негативных процессов является гибель клетки [311–316].

В наших предыдущих исследованиях, на модельном объекте *Mus musculus*, было продемонстрировано, что такой распространенный криопротектор, как ДМСО обладает цитотоксическим эффектом уже на этапе эквilibрации [317]. Глицерин является менее предпочтительным, ввиду его низкой проницаемости для мембран эмбрионов человека ранних стадий развития [318]. 1,2-ПД является оптимальным криозащитным агентом, ввиду высокой проницаемости для ранних эмбрионов человека и низкой цитотоксичности [319]. Было продемонстрировано, что десятиминутная эквilibрация с 1,5 М 1,2-ПД не оказывает негативного влияния на мейотическое веретено ооцитов, митотическое веретено эмбрионов и дальнейшее дробление до стадии бластоцисты [320]. Что касается этиленгликоля, то убедительно показано, что данный криопротектор ингибирует митотическую активность [321] и отрицательно влияет на дальнейшее развитие эмбрионов млекопитающих [322]. Катаболизм этиленгликоля ведет к

образованию токсических альдегидов, отрицательно воздействующих на органогенез [323]. Глицерин, в дозах, применяемых для криоконсервирования биологических объектов, способен оказывать токсическое воздействие на ядерный аппарат клеток [324]. Высказывалось мнение, что применение ДМСО, при криоконсервировании эмбрионов человека, вызывает повреждения хромосом [325]. Экспозиция эмбрионов млекопитающих в 10% растворах глицерина и этиленгликоля приводило к снижению выживаемости и возрастанию фрагментации ДНК [326].

При охлаждении человеческих ооцитов определение чувствительности системы микротрубочек позволило обнаружить дефекты в строении веретена деления у всех ооцитов, которые охлаждались в течение 10-30 мин при температуре 22°C и выражались в виде изменения размера веретена, нарушения строения микротрубочек, либо их полного отсутствия [102]. После эквilibрации ооцитов при 37°C большинство веретен напоминали таковые в нативных ооцитах, часть же оставалась разрушенной. При этом наблюдалась дисперсия хромосом. Охлаждение ооцитов при 22, 18 и 4°C приводило к прогрессирующему разрушению веретена и рассеиванию в цитоплазме. Изменения выражались тем сильнее, чем ниже была температура и длительнее ее воздействие. Через час после возвращения ооцитов в условия инкубации, изменения, индуцированные понижением температуры у многих из них не обнаружались. Позже было показано, что разные микротрубочки в системе одного митотического и мейотического аппарата обладают неодинаковой чувствительностью к изменению температуры.

Первым этапом замораживания является снижение температуры от физиологических значений до нуля. Именно в этом диапазоне возникают первоначальные повреждения клеток, приводящие к

уменьшению жизнеспособности криоконсервированных эмбрионов. Быстрое снижение температуры в интервале до фазового перехода вода-лед вызывает в клетках концентрационный градиент осмотически активных веществ и уменьшает прочность и эластичность их мембран.

Наиболее важной характеристикой повреждения клеток при охлаждении является потеря клеточными мембранами барьерных свойств; при резком охлаждении также происходит латеральное разделение липидов в бислое, что увеличивает степень повреждения мембран в зоне умеренно положительных температур.

Обратил на себя внимание феномен, что уже на этапе помещения эмбрионов, находившихся в культуральной среде с температурой 37°C в культуральную среду с температурой 22°C происходят повреждения осмотической природы: наблюдалось сжатие бластомеров, изменение межклеточной адгезии. Поэтому в дальнейшем эмбрионы охлаждали от 37°C до 22°C со скоростью 0,7°C/мин, затем переносили в растворы криопротекторов.

Криоконсервирование эмбрионов - многоэтапный и многофакторный процесс, следствием которого является нарушение, прежде всего, морфологической целостности эмбриона. На основании этого мы произвели морфологическую оценку основных клеточных структур и предложили использовать их как биомаркеры сохранности эмбрионов после криоконсервирования.

К настоящему времени описаны различные системы оценки потенциала развития эмбриона человека. Наиболее часто используют системы, основанные на определении количества бластомеров. Однако в нашем исследовании показано, что сферичность и соразмерность бластомеров, низкое содержание ануклеарных фрагментов, вариации толщины *zona pellucida* являются

морфологическими критериями отбора эмбрионов для криоконсервирования. В связи с этим возникает необходимость совершенствования критериев отбора эмбрионов, совокупность которых составит комплексную систему оценки качества эмбрионов для криоконсервирования. Это позволит решить ключевой вопрос – отбор эмбриона с наивысшей толерантностью к криоконсервированию и дальнейшим потенциалом к имплантации.

Количество бластомеров является основным критерием для прижизненной оценки эмбрионов после замораживания-оттаивания [327–331].

Несмотря на гибель отдельных бластомеров после криоконсервирования, оставшиеся бластомеры способны к развитию полноценного эмбриона, ввиду их тотипотентности [332]. При этом уровень жизнеспособности эмбрионов коррелирует с количеством неповрежденных бластомеров. Чем больше бластомеров сохранилось в процессе криоконсервирования, тем выше имплантационный потенциал эмбриона. Так, уровень жизнеспособности частично поврежденных в ходе криоконсервирования эмбрионов был в 3 раза ниже, по сравнению с нативными. Последние разработки по удалению фрагментированных или лизированных бластомеров позволили повысить качественные характеристики деконсервированных эмбрионов [333]. Считают, что лизированные бластомеры обладают токсическим эффектом по отношению к оставшимся [334, 335].

Кроме повреждения бластомеров существенную роль в жизнеспособности эмбрионов человека оказывает целостность *zona pellucida*.

Внеклеточная оболочка состоит из трех гликопротеинов: ZP1, ZP2 и ZP3. Она играет важную роль в процессах оплодотворения, так как на ее поверхности расположены видоспецифические рецепторы

узнавания и связывания со сперматозоидами, выполняет защитную функцию, ограждая и предохраняя эмбрион во время его прохождения по маточным трубам. Благодаря *zona pellucida* происходит компактизация бластомеров на стадии морулы. Во время преимплантационного развития эмбриона наблюдается ее истончение, и на 5-7-й день после овуляции происходит “вылупливание” бластоцисты, что является одним из ключевых событий преимплантационного развития эмбриона, после завершения которого, эмбрион входит в прямой контакт с эндометрием матки [336].

Наши исследования позволили сделать вывод, что полный цикл криоконсервирования оказывает влияние на морфологические параметры *zona pellucida*. Так, выявляются такие нарушения морфологической целостности, как разрывы и трещины, выход участков цитоплазмы в перивителлиновое пространство. Поэтому одной из причин снижения сохранности эмбрионов могут быть повреждения именно *zona pellucida* [336]. В то же время известно, что *zona pellucida* является естественным барьером, предотвращающим быстрое выравнивание осмотического давления между бластомерами и средой. Повреждения оболочки в процессе оттаивания могут сопровождаться нарушениями на уровне субклеточных структур, которые нельзя выявить при обычной микроскопической оценке, но которые в конечном итоге оказывают влияние на выживаемость эмбрионов.

Интересным в данном аспекте явился факт снижения выживаемости криоконсервированных зигот после проведения процедуры ICSI. Показано, что 57% деконсервированных эмбрионов характеризуются потерей бластомеров. Это может свидетельствовать

о взаимосвязи между повреждением *zona pellucida* и выживаемостью бластомеров [337].

По данным нашего исследования, вне зависимости от протокола криоконсервирования $62,8 \pm 2,8$, $65,2 \pm 0,8$ и $67,8 \pm 2,1$ % неповрежденных после оттаивания бластомеров, соответственно, имели одинаковый размер. Однако во всех группах встречались макробластомеры, возникшие, очевидно, за счет слияния двух соседних клеток. Такой же факт был отмечен в работах [338–341], в которых авторы цитогенетическими методами доказали, что бластомеры больших размеров отличаются высокой степенью анеуплоидии (29,4%), по сравнению с бластомерами обычных размеров (8,5%).

Рассматривая возможные причины отмеченных повреждений, необходимо отметить следующее. Одним из наиболее важных факторов криоповреждений при кристаллизации клеточных суспензий является повышение концентрации растворенных веществ (солей) в жидкой фазе, которая окружает клетку. Высокие концентрации солей оказывают влияние на липопротеидный комплекс мембран, в результате чего происходит его распад с образованием свободных фосфолипидов, что ведет к нарушению проницаемости мембран. Второй возможной причиной, которая вызывает повреждение органелл, может быть дегидратация клеток, в результате которой увеличивается концентрация внутриклеточных веществ, что в свою очередь, может привести к денатурации растворенных белков и повреждению мембранных структур. Эти же факторы (изменение объема бластомеров, осмотический стресс и образование кристаллов льда) могут быть возможными причинами криоповреждений эмбрионов.

Особое внимание уделяется явлению фрагментации эмбрионов человека. Фрагменты – особые включения, не содержащие генетический аппарат. Границей считается 30% фрагментация: если фрагментов меньше, то у эмбриона есть шансы на имплантацию и дальнейшее развитие. При повышении порога – в большинстве случаев эмбрион погибает, поскольку вместо того, чтобы увеличивать свои размеры при каждом последующем дроблении, эмбрион отсеивает половину своих бластомеров.

В настоящее время нет однозначного мнения о жизнеспособности эмбрионов с поврежденными бластомерами. Так, некоторые авторы настаивают на выборе клеток оптимального качества, другие, ссылаясь на то, что эмбрионы до 8-клеточной стадии развития являются тотипотентными, считают не обязательным учет степени их фрагментации [342, 343].

Причины фрагментации эмбрионов различны – генетические аномалии ооцитов, сперматозоидов и самих эмбрионов. В последнее время считают, что фрагментация цитоплазматических участков является свидетельством апоптоза клетки [344, 345]. Подтверждением этому служит ряд работ по изучению хромосомного баланса фрагментированных эмбрионов. Показано, что более 30 % таких эмбрионов несут те или иные хромосомные аномалии: мозаицизм встречается в 19,8 % клеток, а полиплоидия в 5,5 %. Хромосомные аномалии встречаются в 2 раза чаще, чем у эмбрионов с нормальной морфологией [346].

Самым интересным в данном аспекте является вопрос развития эмбрионов с признаками фрагментации. Иногда фрагментированный эмбрион достигает стадии бластоцисты и, после переноса в полость матки, дает начало прогрессивно развивающейся беременности.

Фрагментированные эмбрионы чаще оказываются анеуплоидными [347], описаны нарушения в экспрессии гена *p 53* в таких эмбрионах [348].

На сегодняшний день четко не определена оптимальная стадия для криоконсервирования преимплантационных эмбрионов человека [349–351].

Некоторые авторы считают предпочтительной для данной процедуры стадию зиготы, ввиду отсутствия мейотического веретена, транскрипции эмбрионального генома и наличия ядерной мембраны [352–356]. Продемонстрированы сходные показатели выживаемости зигот и 4-клеточных эмбрионов – 74,4 и 77,4% [357]. В то же время приведены показатели низкой имплантации деконсервированных зигот – 5,5% [358]. Предлагают критерии определения жизнеспособности зигот после криоконсервирования – по локализации пронуклеусов, количеству и расположению ядрышек в пронуклеусах, характеристике цитоплазмы [359-361].

Полученные нами результаты свидетельствуют о необходимости криоконсервирования зигот через 22 ч после инсеминации, когда четко визуализируются два пронуклеуса. В это время зигота находится в G2 фазе клеточного цикла. Ранние зиготы более чувствительны к процедуре замораживания-оттаивания, чем зиготы, находящиеся в фазе G2. Зиготы, находящиеся в стадии, предшествующей митозу (26 ч после инсеминации), наиболее восприимчивы к повреждающему действию факторов криоконсервирования, что выражается в блокировании их развития. Наши данные позволяют объяснить противоречивые результаты многих исследователей о преимуществах либо бесперспективности криоконсервирования эмбрионов человека на стадии зиготы.

Поздние стадии развития эмбрионов человека являются менее предпочтительными для проведения данной процедуры. Во-первых, дробление эмбрионов человека носит асинхронный характер [362], и некоторые бластомеры, находящиеся в стадии S интерфазы, либо в стадии метафазы, окажутся более чувствительны к факторам криоповреждения. Во - вторых, со стадии 2-х бластомеров эмбрионы человека характеризуются процессом фрагментации, который неблагоприятно влияет на выживаемость эмбрионов. С результатами нашей работы согласуются выводы об устойчивости клеток, находящихся на стадии G2 клеточного цикла к процедуре замораживания-оттаивания [363].

В ходе проведенных нами исследований было показано, что учет морфологии пронуклеусов является прогностическим в плане их криорезистентности. Это подтверждается данными других исследований, в которых морфология пронуклеусов коррелирует с хромосомным статусом эмбрионов [364, 365]. Возможно, этим и объясняется разная выживаемость зигот.

Одной из ступеней создания комплексной оценки потенциала к выживанию эмбрионов человека после криоконсервирования может стать именно классификация пронуклеусов. Наиболее перспективными в плане криоконсервирования являются зиготы с двумя равными пронуклеусами, выровненными в зоне соприкосновения нуклеолями, и просветленной по периферии и в зоне локализации пронуклеусов цитоплазмой. Зиготы с неравными, несоприкасаемыми пронуклеусами, рассеянными нуклеолями и гомогенной цитоплазмой после криоконсервирования дают наиболее низкую частоту выживаемости.

Что касается преимущества для криоконсервирования эмбрионов последующих стадий развития, то в работе [366]

продемонстрирована высокая выживаемость 2-х и 4-х бластомерных эмбрионов. Однако этим выводам противоречат результаты, в которых автор убедительно демонстрирует нецелесообразность криоконсервировать эмбрионы человека, находящихся на стадии 2-х бластомеров [367].

Наши данные согласуются с результатами о 80% выживаемости эмбрионов, находящихся на стадии зиготы, по-сравнению с 71,8% выживаемостью делящихся эмбрионов. Считают, что отсрочка криоконсервирования на 72-96 ч негативно сказывается на выживаемости эмбрионов [368].

Способность переносить влияние факторов криоконсервирования зависит от морфологических, физиологических, метаболических и генетических особенностей преимплантационных эмбрионов. Прохождение каждого из циклов дробления переводит эмбрион на качественно новую ступень развития: изменяется длительность фаз клеточного цикла, качественные и количественные характеристики синтеза РНК и белков, свойства клеточных мембран бластомеров [369, 370].

Общеизвестно, что надежным показателем жизнеспособности эмбрионов после криоконсервирования служит их способность к восстановлению основных морфологических признаков [371].

Практически все нарушения, вызванные процедурой замораживания-оттаивания, у эмбрионов проявляются уже в раннем эмбриогенезе.

После размораживания необходима тщательная оценка морфофункционального состояния. При этом нами выявлено, что оценка эмбрионов человека только по морфологическим тестам является недостаточной, поскольку не учитывает способность эмбрионов к возобновлению митоза. Поэтому, для объективизации

оценки биологических свойств эмбрионов после деконсервирования необходимо дополнительное привлечение функциональных тестов, характеризующих потенциал к формированию бластоцисты.

Поскольку развитие эмбрионов *in vitro* возможно лишь при нормальном функционировании генетического аппарата, являлось целесообразным изучить влияние факторов криоконсервирования на скорость морфогенетического развития эмбрионов, ингибция которой будет отражать нарушения функционирования генома.

В нашей работе показано, что деконсервированные эмбрионы демонстрируют ускоренные темпы дробления по сравнению с нативными. Ускорение развития в культуре связано, скорее всего, с неспецифическим увеличением скорости метаболизма, причиной которой может быть изменение концентрации белков в цитоплазме бластомеров после дегидратации. Наша гипотеза согласуется работами, в которых показано, что при изменении объема цитоплазмы изменяется скорость пост-транскрипционного биосинтеза, изменяется количество каждого белка, что приводит к ускорению или замедлению морфогенетических процессов на разных стадиях развития эмбрионов млекопитающих [372, 373].

Первые деления дробления эмбрионов человека имеют ряд специфических особенностей, в частности, относительно медленный темп, асинхронность, наличие компактизации, при которой между клетками эмбриона устанавливается система щелевых контактов. Этот процесс заканчивается формированием бластоцисты - последней стадии раннего эмбрионального развития, способной существовать *in vitro* и обладающей первой дифференцировкой на четко выраженную внутреннюю клеточную массу и трофэктодерму [374].

По данным многих исследователей частота формирования бластоцисты составляет порядка 30-40% для нативных [43] и 10-15%

для криоконсервированных эмбрионов [356]. Однако данные относительно соответствия эмбрионам определенной категории качества и числом бластомеров носят противоречивый характер. Считают, что количество эмбрионов, способных развиваться до стадии бластоцисты после деконсервирования, снижается в два раза по сравнению с нативным контролем [21]. В то же время отмечается, что криоконсервирование не влияет на частоту формирования бластоцист [375]. Этот показатель зависит, скорее всего, от условий культивирования: состава питательных сред и наличия систем сокультивирования [376-380].

Нами показано, что в результате повреждения отдельных бластомеров число клеток на раннюю бластоцисту снижается с $58 \pm 3,4$ для нативных эмбрионов до $45 \pm 3,7$ для деконсервированных. В связи с этим представляет интерес работа [245] по удалению бластомера 4-х клеточного эмбриона и обнаружению корреляции в достоверном снижении количества клеток в бластоцисте в нативных и криоконсервированных эмбрионах.

Эффект возрастания количество бластомеров в бластоцистах, культивируемых на монослое первичной линии клеток эпителия фаллопиевых труб, показано в работе [326]. В таких бластоцистах насчитывали в среднем 120,7 ядер, что было значительно больше, чем среднее число ядер (62,9) для эмбрионов, перенесенных на монослой на 4-клеточной стадии. Эмбрионы, культивируемые в стандартной среде, имели всего 42,1 ядро на бластоцисту.

Другим важным показателем полноценности бластоцисты является ее способность к высвобождению из *zona pellucida*.

Наш вывод о снижении имплантации эмбрионов, находящихся на стадии экспандированной бластоцисты согласуется с данными об увеличении частоты наступления беременности до 25% после

проведения процедуры вспомогательного “вылупления”. Показано, что частота наступления беременности после переноса криоконсервированных эмбрионов намного ниже, чем при переносе нативных [381]. Возможно, факторы криоконсервирования влияют на затвердевание *zona pellucida*, что требует проведения процедуры вспомогательного «вылупления».

Выход внутренней клеточной массы является одним из ключевых событий преимплантационного развития эмбриона, после завершения которого эмбрион входит в прямой контакт с эндометрием матки [382].

Механизм естественного «вылупления» известен. Предполагают, что основную роль в этом процессе играет давление расширяющейся бластоцисты. Кроме того, на разрыв *zona pellucida* действует экспрессия литических ферментов эмбриона. Показано, что перед «хэтчингом» трофэктодерма эмбриона экспрессирует трипсин-подобную протеиназу – стрипсин, а добавление ингибиторов протеиназ в культуральную среду полностью тормозит выход бластоцисты из *zona pellucida* [383]. В ходе криоконсервирования, очевидно, происходят молекулярные изменения, а именно, модификация гликопротеинов, ведущая к повышению резистентности *zona pellucida* и к ее неспособности расщепляться под действием литических ферментов.

Культивирование эмбрионов *in vitro* также может индуцировать затвердевание *zona pellucida*, что может быть объяснено отсутствием в культуральной среде некоторых лизинов, которые могут действовать на эмбрион в условиях *in vivo*. Возможно, что у некоторых пациенток, проходящих курс лечения по поводу бесплодия, могут продуцироваться ооциты, экспрессирующие дефектный лизин или пониженный его уровень, что в комбинации с условиями

культивирования *in vitro* и криоконсервированием может привести к неспособности к “вылуплению”.

В работе [384] показано, что 100% криоконсервированных двухдневных эмбрионов выходят из оболочки только после вспомогательного “хэтчинга”. Нами отмечено, что нативные эмбрионы достигают этой стадии в 57,7%, а после криоконсервирования в 8,3% случаев. Факторы криоконсервирования, по-видимому, оказывают влияние на гликопротеины *zona pellucida*, что приводит к ее затвердеванию.

Анализ темпов дробления нативных и деконсервированных эмбрионов *in vitro* до стадии бластоцисты проведен во многих исследованиях [385–387]. Особое внимание уделяется феномену «раннего дробления», который является прогностическим [388–391]. Что касается частоты формирования бластоцисты, то сообщения носят довольно противоречивый характер. Одни авторы считают, что количество эмбрионов, способных развиваться до стадии бластоцисты после деконсервирования, снижается в два раза по сравнению с нативным контролем [392]. Другие отмечают, что криоконсервирование не влияет на частоту формирования бластоцист [393].

Дискутируется также вопрос о необходимости культивирования эмбрионов человека после криоконсервирования. Одни авторы настаивают на проведении данной процедуры, объясняя это дополнительной селекцией жизнеспособных эмбрионов [394]. Другие – отвергают, ссылаясь на то, что культивирование предполагает субоптимальные условия и может отрицательно сказываться на жизнеспособности эмбрионов, снижая тем самым их имплантационный потенциал [395].

Поскольку процедура криоконсервирования влияет на все клеточные структуры, использование только морфофункциональных методов является явно недостаточным. Возможные индуцированные процессом криоконсервирования повреждения генетического аппарата могут привести к отрицательным пренатальным и постнатальным изменениям будущего живого организма. Повышенный уровень риска рождения ребенка с врожденными аномалиями, которые могут быть результатом применения биотехнологических методов, требует необходимости детальной отработки методологии криоконсервирования и генетической диагностики криоконсервированных эмбрионов.

Нарушения генетического аппарата клеток могут быть вызваны как самим процессом криоконсервирования, так и манипуляциями, проводимыми на этапах подготовки к замораживанию.

Поскольку вещества, используемые в качестве криопротекторов являются нефизиологичными, то их добавление в среду культивирования эмбрионов может оказывать определенное воздействие, которое в сочетании с другими факторами криоконсервирования может влиять на генетический аппарат клеток. Цитогенетический анализ эмбрионов выявил, что наиболее активным, судя по уровню структурных хромосомных aberrаций, является этиленгликоль, в отличие от глицерина, не вызывающего полиплоидизации клеток [491].

. Общеизвестно, что упорядоченное взаимное расположение хромосом в ядре нарушается при приготовлении препаратов. Однако, исследования, посвященные механизму распластывания митотических хромосом на стекле, пространственной локализации материала интерфазной хромосомы и перемещению хромосомного материала при переходе клетки из S-фазы в митоз, наглядно показали, что

пространственная организация интерфазной и метафазной хромосом очень близки [396]. Показано, что хромосома занимает в интерфазном ядре определенную территорию и ее пространственное расположение в интерфазе совпадает с расположением в метафазной пластинке. Анализ расположения индивидуальных хромосом в интерфазных ядрах клеток человека позволил сделать вывод о преимущественной локализации крупных хромосом на периферии, а мелких хромосом во внутреннем компартменте ядра [397].

Данные о дезорганизации мейотического и митотического аппарата под действием низких температур описаны в литературе [398]. Кроме того, есть данные об обратимости данного процесса [399]. Большинство исследований было проведено на ооцитах и ранних преимплантационных эмбрионах млекопитающих.

По классификации Алова И.А. патологии митоза включают в себя повреждения хромосом (задержка клеток в профазе, нарушение спирализации и деспирализации хромосом, фрагментация хромосом, образование мостов между хромосомами в анафазе, раннее разъединение сестринских хроматид, повреждение кинетохора) и повреждения митотического аппарата (задержка развития митоза в метафазе, рассредоточение хромосом в метафазе, трехгрупповая метафаза, полая метафаза, многополюсные, моноцентричные, асимметричные и К-митозы).

Факторы криоконсервирования оказывают влияние на морфологию последующего митоза, что выражается в увеличении нерасхождения хромосом, возникновении таких форм патологического состояния митоза, как колхициновый митоз и рассеивание хромосом в метафазе.

Учитывая достаточную лабильность структуры веретена деления ранних эмбрионов, можно считать, что данные аномалии

митоза являются обратимыми. Так, рассеянная метафаза способна переходить в анафазу, восстанавливая нормальное течение митоза. Возможно вступление в интерфазу, без кариокинеза, таким образом, увеличивая хромосомный набор.

Нами показано, что после криоконсервирования возрастает количество хромосомных аномалий, связанных с митотическим аппаратом и функцией цитоскелета (происходит увеличение частоты мозаицизма и полиплоидизации клеток).

Наличие патологий митоза в бластомерах эмбрионов контрольных групп может быть связано с субоптимальными условиями культивирования. Полученные нами данные об изменении митотического индекса, повышения уровня патологических состояний митозов и изменения спектра патологий после действия криопротекторов и низких температур, согласуются с данными других исследователей [400, 401].

Основными патологиями митоза в бластомерах контрольных эмбрионов были отставание хромосом и многополюсные митозы.

Данные о дезорганизации митотического аппарата клетки описаны на разных объектах [402]. Исследования по влиянию гипотермии на структуру веретена деления проводились в основном на ооцитах млекопитающих, в том числе и человека [403], которые, как известно, блокированы на стадии метафаза II мейоза и представляют собой удобную модель. Так, в работе [404] делается вывод о деполимеризации микротрубочек веретена деления, приводящей к анеуплоидии ооцитов человека, мышей и коров.

Изменение ионного гомеостаза может быть причиной повышения патологического проявления митоза. Так, повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле способно вызвать модификацию цитоскелета, включая микротрубочки веретена деления [405].

Известно, что при пониженных температурах уменьшается стабильность многих белков, в частности, составляющих цитоскелет клеток [406].

Деполимеризация микротрубочек, вызванная действием криопротектора либо охлаждением, может нарушать нормальное расхождение хроматид и, таким образом, приводить к анеуплоидии [407].

Полученные нами данные позволяют оценить степень вовлеченности такого механизма нерасхождения хромосом, как запаздывание хромосом. Имеются данные, что запаздывающие хромосомы не попадают ни в одно из вновь образовавшихся ядер, а формируют дополнительное микроядро, которое элиминируется, что ведет к гипоанеуплоидии. Преобладание гипогаметоидных бластомеров может быть связано с тем, что механизм запаздывания хромосом в анафазе в данном случае играл существенную роль в образовании анеуплоидий [408].

Отмеченная в нашей работе патология митоза – мост в анафазе - принадлежит к группе межхромосомных обменов и является следствием фрагментации хромосом. При воссоединении фрагментов, два из которых сохранили центромеру, образуется дицентрическая хромосома, которая под влиянием обоих митотических центров растягивается, образуя мост. Хроматидные мосты являются следствием фрагментации хромосом и задерживают деление клетки.

Такая патология митоза, как набухание и слипание хромосом - возникает при воздействии на клетку физических факторов [409].

Патологии митоза, связанные с повреждением митотического аппарата, представлены задержкой митоза в метафазе, колхициновым митозом – характеризуется задержкой или блокадой деления клеток в метафазе в связи с дезорганизацией митотического аппарата.

У эмбрионов, перенесших замораживание-оттаивание, спектр митотических аномалий находился на уровне контроля. Из единичных случаев аномалий деления, встречающихся после медленного замораживания, следует отметить к-митоз. Морфологически различают несколько видов к-митозов – метафаза с гиперспирализованными хромосомами, рассеянными по всей цитоплазме либо сосредоточенными по ее периферии; комковатая метафаза – метафазная пластинка, образованная хромосомами, склеенными в неправильное комковатое тельце; шар-метафаза – метафазная пластинка, имеющая вид шаровидного скопления хромосом в области экватора; «звезда-метафаза» - центромерные участки хромосом плотно прилежат друг к другу в центре метафазы, а плечи лежат свободно и направлены по периферии.

Многополюсный и моноцентрический митозы, обнаруженные нами в деконсервированных эмбрионах, вероятно, связаны с повреждениями центриолей и центриолярных микротрубочек: при этом образуется либо несколько, либо один митотический полюс, соответственно.

Неравномерное распределение хромосом между дочерними клетками приводит к анеупloidии при многополюсном митозе или к полипloidии при моноцентрическом митозе. К анеупloidии и к образованию многоядерных эмбриональных клеток приводят также трехгрупповые метафазы.

Факторы криоконсервирования индуцируют увеличение патологических митозов, связанных с повреждением хромосом, среди которых большую часть составляют слипшиеся хромосомы. Явление слипания хромосом широко обсуждалось в литературе [410-412]. Считают, что это физиологический процесс, который в следующем

клеточном цикле увеличивает вероятность образования хроматидных перестроек.

С повреждением хромосом связаны следующие патологии митоза: задержка деления в профазе - задержка вступления клетки в митоз чаще всего происходит при нарушении синтеза ДНК. Нарушение спирализации и деспирализации хромосом связывают с изменением физических свойств молекулы ДНК, либо с изменениями в системе диаминооксидазы. В норме разъединение хроматид обычно происходит в конце метафазы, при ее переходе в анафазу. При нарушениях осмотического давления среды наблюдается разъединение хроматид в профазе. При фрагментации и пульверизации хромосом фрагменты беспорядочно рассеяны по цитоплазме. Хромосомные и хроматидные мосты являются следствием фрагментации хромосом. При воссоединении фрагментов, два из которых сохранили центромеру, формируется дицентрическая хромосома. Отставание целых хромосом в метакинезе при расхождении к полюсам возникает при повреждении кинетохора либо потери функциональной активности. Отставшие хромосомы либо случайно попадают в одно из дочерних ядер, либо элиминируют из клетки и формируют дополнительное микроядро. Микроядра – это вторичные ядра, которые образовались во время телофазы из хроматина, задержавшегося в анафазе вследствие хромосомных поломок или дисфункции.

С повреждением или полной дезорганизацией митотического аппарата связано рассеивание хромосом в метафазе. При этом хромосомы не образуют метафазной пластинки, а беспорядочно рассеиваются в цитоплазме. С избыточной репродукцией центриолей связан многополюсный митоз. При этой патологии митоза образуется несколько митотических полюсов. Вследствие неравномерного

распределения хромосом между дочерними клетками многополюсный митоз приводит к анеуплоидии. С нарушением разделения центриолей связан и моноцентрический митоз. При этой форме патологии митоза возникает только один митотический полюс с веретенообразным веретеном, соответствующим половине обычного двухполюсного веретена. Образовав экваториальную пластинку, хромосомы не расходятся и формируют одно полиплоидное ядро. При каждом последующем моноцентрическом митозе полиплоидия клеток возрастает. При неравномерном развитии полюсов и конусов веретена деления возникает асимметричный митоз, что приводит к неравномерному распределению хромосом между дочерними клетками. Асимметрический митоз приводит к анеуплоидии.

Трехгрупповая метафаза характеризуется наличием помимо экваториальной пластинки двух дополнительных групп хромосом, расположенных между экватором и полюсами. Патология связана с нарушением движения некоторых хромосом в метакинезе. Полярные хромосомы, как и обычные, состоят из двух хроматид. Трехгрупповые метафазы приводят к анеуплоидии либо к образованию многоядерных клеток. Полая метафаза имеет вид кольца хромосом, которые, собираясь в метафазную пластинку, располагаются по периферии клетки. Последствия этой формы патологии митоза неясны. Эта патология возникает либо вследствие набухания веретена, либо в результате неправильной локализации хромосомальных нитей, формирующихся вдали от центрального веретена.

Принято считать, что многополюсный митоз связан с избыточной репродукцией или разделением центриолей. Вследствие неравномерного распределения хромосом между дочерними клетками многополюсный митоз приводит к анеуплоидии. Отставание

хромосом в метакинезе возникает при повреждении кинетохора либо при утрате им функциональной активности. Оставшиеся хромосомы либо случайно попадают в одно из дочерних ядер, либо элиминируют из клетки и формируют дополнительное микроядро.

Отставание движения целых хромосом в метакинезе и при расхождении к полюсам возникает при повреждении кинетохорных микротрубочек либо при утрате ими функциональной «сократительной» активности [413]. Хромосомы с таким повреждением пассивно перемещаются в цитоплазме. Отставшие хромосомы либо случайно попадают в одно из дочерних ядер, либо элиминируют из клетки или формируют дополнительное микроядро. В литературе имеются данные о том, что замораживание, хранение в жидком азоте и оттаивание преимплантационных эмбрионов приводили к достоверному увеличению числа микроядер в 8-клеточных эмбрионах крыс [414].

Нарушение цитотомии (преждевременная цитотомия, задержка цитотомии, отсутствием цитотомии) является третьим типом патологии митоза. Как известно, цитотомия – это процесс разделения цитоплазмы клетки на две дочерние, который происходит после завершения митоза ядра. Механизмы цитотомии до сих пор полностью не установлены, однако принято считать, что она связана с движением цитоплазмы. По «теории сокращения кортикального геля» кольцевая борозда по экватору у любой делящейся клетки образуется в поздней анафазе, а в конце телофазы она еще больше суживается и приводит к цитотомии. Как правило, отсутствие цитотомии наблюдается при эндоредупликации. Обнаруженные нами полиплоидные бластомеры больших размеров позволяют делать вывод о вовлечении данной патологии митоза в бластомерах эмбрионов человека после криоконсервирования.

В ходе проведенных экспериментов выявлено, что факторы криоконсервирования приводят к серьезным изменениям, в том числе и некробиотическим, то есть тех, которые предшествуют смерти клетки – кариопикноз. Однако, гибель отдельных бластомеров не оказывает влияние на дробление неповрежденных бластомеров, хотя и снижает жизнеспособность эмбрионов. Достоверное увеличение частоты встречаемости пикнотических ядер описывали и другие исследователи [399].

Цитогенетические исследования зародышей человека преимплантационного периода развития проведены в нескольких лабораториях на небольшом фактическом материале. Исследования, выполненные на лабораторных животных, позволяют экстраполировать некоторые данные и учитывать их при разработке методов криоконсервирования.

Показан тератогенный и мутагенный эффект некоторых режимов криоконсервирования, что ведет к ранним эмбриональным потерям [415]. Показано возрастание сестринских хроматидных обменов, что свидетельствует о мутагенном эффекте криоконсервирования [416]. Благодаря внедрению технологии преимплантационной генетической диагностики появилась возможность изучения хромосомного набора отдельных биопсированных бластомеров [417-421]. Однако, ввиду высокой частоты мозаичности, эти данные не отражают истинную картину генетического статуса эмбрионов.

Факт обнаружения хромосомного мозаицизма в нативных и криоконсервированных эмбрионах человека имеет важное значение для понимания развития человека на ранних эмбриональных стадиях.

Для бластомеров эмбрионов млекопитающих характерным является отсутствие центриолей [421]. Ранее с помощью

ультраструктурного анализа было показано, что вместо центриолей в бластомерах присутствует кольцевой электроплотный материал, состоящий из тонких филаментов, радиально расходящихся в направлении локализации хромосом. Возможно, эти фибриллярные центры более чувствительны к воздействию факторов криоконсервирования, ввиду чего хромосомы легко теряются в ходе первых делений дробления.

Представленные нами результаты согласуются с работой, в которой убедительно продемонстрировано, что большинство деконсервированных эмбрионов, остановившихся в развитии *in vitro*, несут серьезные генетические аномалии. Так, 21% из них являлись гаплоидными, три-, тетра- и гексаплоидными, 14% - классифицировали, как мозаичные и 19% - хаотичные мозаики [422].

Хромосомный мозаицизм может возникать вследствие нарушения расхождения или утраты митотических хромосом, в самом начале, либо по ходу эмбриогенеза. При нормальном дроблении оба первых бластомера имеют диплоидный набор хромосом, и это сохраняется при последующем развитии. Однако поведение митотических хромосом во время дробления может отклоняться от нормы, тогда в анафазе хромосомы расходятся неправильно или теряются, в каждый бластомер попадает неодинаковое их число, которое может не соответствовать диплоидному [423].

При нарушении расхождения одной пары гомологичных хромосом ранний зародыш будет состоять из бластомера с трисомией и бластомера с моносомией. Возможны и другие варианты митотического нерасхождения или утраты хромосом, из-за чего образуются бластомеры с нуллисомией, трисомией, тетрасомией. Если при последующем развитии сохранятся все клоны одного

бластомера, то в таком эмбрионе будет иметь место хромосомный мозаицизм.

Из соотношения клонов с хромосомными aberrациями можно сделать предположение о возникновении мозаицизма в результате однократного либо многократного митотического нерасхождения. Считают, что если нерасхождение хромосом произошло на ранней стадии эмбриогенеза, то в эмбрионе будет присутствовать два клона с разным набором хромосом. Сочетание нескольких типов aberrантных бластомеров свидетельствует о том, что в раннем эмбриогенезе имело место не одно, а несколько последовательных нерасхождений митотических хромосом.

При мозаицизме одни бластомеры, сохраняя высокую пролиферативную активность, либо обладая большей выживаемостью, постепенно могут вытеснять клоны клеток с иным кариотипом.

Наши данные о повышении мозаицизма эмбрионов человека после криоконсервирования согласуются с исследованиями, проведенными другими авторами [424-426]. Интерпретировать результаты работ, проведенные в данном направлении, достаточно сложно, ввиду того, что все исследования выполнены на небольшом фактическом материале. Так из 21 проанализированного эмбриона – 20 оказались мозаиками. Показано, что частота хаотичных мозаик увеличивалась в четыре раза (6,3% – для нативных и 24,1 % – для криоконсервированных эмбрионов) [427].

Скорее всего, после криоконсервирования происходит постзиготическая потеря хромосом, вследствие митотического нерасхождения.

Существует несколько механизмов образования митотических анеуплоидов - митотическое нерасхождение (обычно при наличии

нормальных, моносомических и трисомических бластомеров), митотический анафазный мост (более 20% бластомеров составляют моносомии по одной хромосоме) и эндоредупликация, при которой одна хромосома присутствует в нескольких копиях. Запаздывание хромосомы в анафазе приводит к возникновению мозаичных эмбрионов. Однако имеются данные, что запаздывающие хромосомы не попадают ни в один из бластомеров, а формируют дополнительные микроядра [402].

Цитогенетический анализ преимплантационных эмбрионов человека методом кариотипирования позволяет проанализировать только дробящиеся бластомеры, дошедшие до стадии метафазы. Интерфазные бластомеры, а также фрагментированные и остановившиеся в развитии бластомеры не поддаются оценке.

В связи со сложностью приготовления препаратов для цитогенетического анализа, возможной артефактной потерей хромосом при фиксации и невозможностью проведения анализа на всех стадиях клеточного цикла, мы применили молекулярно-генетический анализ с флюоресцентной гибридизацией *in situ*.

Молекулярно-цитогенетический анализ при помощи гибридизации клонированных последовательностей ДНК с метафазными и интерфазными хромосомами *in situ*, проведенный в нашем исследовании, позволил определить, что преимплантационные эмбрионы, полученные в ходе оплодотворения *in vitro* ооцитов пациенток, участвующих в циклах лечения бесплодия, обладают высокой генетической гетерогенностью. С нашими данными согласуются работы Munne, Wilton L, в которых показана высокая частота хромосомных aberrаций эмбрионов человека [428–440]. Сравнивая частота хромосомных аномалий в нативных и криоконсервированных эмбрионах (26% и 28,6%) показана в работе

[441]. С нашими данными согласуется работа о 50% частоте хаотичных мозаик и диплоидно-полиплоидных эмбрионов человека [442].

Практически все методы молекулярно-цитогенетического анализа хромосом базируются на флуоресцентной *in situ* гибридизации. *In situ* гибридизация нуклеиновых кислот была разработана для локализации на цитологических препаратах конкретных последовательностей ДНК и РНК. Объединение FISH с анализом морфологии клеточных структур привело к революции в цитогенетике человека, значительно повысив эффективность и надежность хромосомного анализа.

Сравнение результатов «классических» методов анализа хромосомных перестроек при гематологических нарушениях с результатами FISH показало, что в первом случае было обнаружено и правильно идентифицировано лишь около трети хромосомных перестроек, выявленных при использовании FISH. Еще около трети перестроек было идентифицировано ошибочно, а треть осталась незамеченной. Известно, однако, что у человека не менее 50% зачатий прерывается до или во время имплантации [443], причем среди зародышей человека около 30% являются аномальными. Предполагают, что на этих ранних сроках до 70% патологических эмбрионов человека имеют хромосомные аномалии.

FISH-метод имеет ряд преимуществ перед другими способами молекулярной гибридизации. Для генетического исследования этим методом не требуется получения большого количества биологического материала, выделения ДНК из клеток, а также использования радиоизотопа P32.

С помощью этого метода можно анализировать хромосомы на всех стадиях клеточного цикла, в том числе в интерфазе, что в ряде

случаев позволяет обходиться без исследования метафазных пластинок [444].

В процессе диагностики бластомеров криоконсервированных возник ряд проблем, связанный с отсутствием ядер в бластомерах, неполное распластывание бластомеров и потеря ядер. Так, нами было проанализировано 47,1% и 51,4% ядер нативных и криоконсервированных эмбрионов.

Аналогичные проблемы при проведении ПГД отмечаются в литературе [445]. При проведении FISH-анализа из 262 исследуемых бластомеров в 25-ти не было получено положительных сигналов вследствие отсутствия в них ядра и фрагментации ядерного материала. Поэтому необходимо учитывать технические моменты хромосомного анализа – возможную потерю клетки во время фиксации, неполное удаление цитоплазмы, что может повлиять на эффективность гибридизации и интерпретацию результатов, недостаточную распространенность хроматина, что может привести к наложению гибридизационных сигналов.

Эффективность FISH составляет не более 80% для аутосом и 90% для половых хромосом [446].

В проведенном нами исследовании частота анеуплоидий по 13, 18, 21 и 22 хромосомам в нативных и криоконсервированных эмбрионах статистически не различается ($p > 0,05$). Обращает на себя внимание высокая частота анеуплоидий по 16 хромосоме в эмбрионах человека после криоконсервирования ($p < 0,01$).

Исследования, выполненные на материале неразвивающихся беременностей, позволили установить, что все хромосомы могут быть участницами трисомий, однако некоторые – встречаются гораздо чаще, например, трисомия по 16 хромосоме встречается в 15% случаев [447].

Обнаружены аномалии среди живорожденных детей, для которых кариотип с трисомией по хромосоме 16 установлен только в некоторых тканях – мозаичные варианты трисомии хромосомы 16 [448].

Приведенные результаты согласуются с данными нашего исследования о высокой частоте мозаицизма нативных и криоконсервированных эмбрионов человека, в связи с чем необходимым является проведение инвазивной пренатальной диагностики в I или II триместрах беременности.

Самостоятельную проблему составляют вопросы, касающиеся механизмов повреждения ДНК и хроматина при криоконсервировании. В клетках постоянно содержатся мутагены, образующиеся даже в процессе нормального метаболизма. К числу таких эндогенных генотоксических соединений относятся гидроксильный и супероксидный радикалы, кислород в синглетном состоянии, перекиси липидов, формальдегид. При замораживании клеток локальное увеличение концентрации таких веществ может стать причиной индукции повреждений ДНК в хроматине. Даже локальное изменение pH может стать причиной индукции повреждения ДНК в хроматине. Что касается характера такого повреждения, то следует ожидать индукцию разрывов ДНК, образование сшивок между ДНК и белками хроматина и между белковыми молекулами.

Возможная селекция эмбрионов по состоянию хроматина blastomeres является индикатором эффективности криоконсервирования и надежным критерием функциональной активности генома blastomeres [449]. Поэтому, мы посчитали целесообразным изучить состояние хроматина blastomeres нативных и криоконсервированных эмбрионов человека. В работе [450]

продемонстрирована корреляция между состоянием хроматина и экспрессией генов.

До настоящего времени сравнительный анализ беременностей, полученных после переноса замороженных-оттаянных эмбрионов, не выявил каких-либо различий, в том числе в частоте врожденных аномалий [451–453]. Среди детей, родившихся после переноса замороженно-оттаянных эмбрионов, частота врожденных пороков развития составила 1,1%, и даже если учесть два случая терапевтических аборта (синдром Дауна и множественные дефекты развития), выполненных после пренатального скрининга, то общая частота составила 3,4%, что сравнимо с таковой в общей популяции [454].

В нашем наблюдении 5 из 12-ти эмбрионов с многоядерными бластомерами прекратили свое развитие. Тот факт, что большинство полиядерных эмбрионов останавливаются в развитии на стадии 8-ми бластомеров, говорит о генетическом механизме коррекции ошибок раннего эмбриогенеза. Хромосомные анализ двухъядерных бластомеров эмбрионов человека показал, что они содержат полиплоидный набор хромосом.

Показано, что многоядерные бластомеры могут элиминировать из клетки благодаря блокированию митотического деления либо фрагментированием таких бластомеров [455]. Поскольку эмбрионы человека до стадии 8-ми бластомеров являются тотипотентными - происходит их компенсация оставшимися нормальными клетками.

При нормальном развитии, в результате первого деления дробления, образуются два бластомера, ядра которых диплоидны. Если подавить цитотомиию после того, как пронуклеусы уже осуществили редупликацию ДНК, они могут сливаться в одно

тетраплоидное ядро, при последующем дроблении образуются тетраплоидные бластомеры [456].

Скорее всего, образование многоядерных бластомеров связано с дефектом функции цитоскелета. Известно, что у млекопитающих ацитокинез может возникать из-за дефектов в функции микрофиламентов [457]. Аномальное образование веретена деления может включать и артефакты в функционировании микротрубочек.

Вторым механизмом образования двухъядерности является слияние отдельных бластомеров. Минне продемонстрировал, что 57% таких эмбрионов останавливаются в развитии на ранних стадиях и только 14% дробятся до стадии бластоцисты [458]. Считают, что механизм слияния бластомеров возможен в любых клетках, независимо от их морфологических особенностей, поскольку в его основе лежат дефекты клеточной мембраны, возникающие при действии внешних факторов, таких, например, как криопротекторов либо низких температур [340]. В процессе дегидратации между бластомерами возникают цитоплазматические мосты, зона плотного контакта клеток возрастает, что, возможно, приводит к их дальнейшему слиянию [459].

Представляет интерес работа по дезагрегации эмбрионов человека на 207 бластомеров, которые культивировали отдельно в течение 24 ч. 76% клеток разделились митотически, в остальных случаях - наблюдалась безъядерность и многоядерность. Частота образования двухъядерных бластомеров составила 12 из 207 - 5,7% [340].

Тот факт, что большинство полиядерных эмбрионов останавливаются в развитии на стадии 8-ми бластомеров, говорит о генетическом механизме коррекции ошибок раннего эмбриогенеза.

Хромосомные анализ двухъядерных бластомеров эмбрионов человека показал, что они содержат полиплоидный набор хромосом.

Интересным является случай обнаружения двух пустых тетраплоидных плодных пузырей после переноса деконсервированных эмбрионов, находящихся на стадии зиготы [30]. Возможно, в данном случае, имел место перенос эмбрионов с двухъядерными бластомерами.

Показано, что многоядерные бластомеры могут элиминировать из клетки благодаря блокированию митотического деления либо фрагментированием таких бластомеров. Поскольку эмбрионы человека до стадии 8-ми бластомеров являются тотипотентными - происходит их компенсация оставшимися нормальными клетками [460].

Полная тетраплоидность, как правило, несовместима с нормальным развитием и жизнеспособностью. Показатели спонтанной тетраплоидии у крыс, кроликов и свиней подсчитаны равными 0,4%, 0,3%, 0,1-3,4%, соответственно, [Дыбан] тогда как показатель у эмбрионов коров, продуцируемых *in vitro* составляет 2.8% [461]. Частота спонтанной тетраплоидии в кариотипах спонтанных абортусов выявляют в 1,1- 7,1% случаев [462-464]. Они обычно характеризуются пустым хориональным мешком без каких-либо эмбриональных тканей [465].

Тетраплоидия вызывает несколько задокументированных эффектов на индивидуальные клетки плода, включая размер клеток, длину клеточного цикла и, наконец, общее количество клеток у тетраплоидного эмбриона. Тетраплоидные эмбрионы, скорее всего, имеют замедленный клеточный цикл и, как следствие, меньше клеток. Однако размер всего тетраплоидного эмбриона остаётся грубо

эквивалентным диплоидному эмбриону той же стадии развития. Описывается обратная пропорциональность между пloidностью и количеством клеток, начиная со стадии дробления и в течение всего органогенеза.

Хроматин интерфазных ядер представляет собой хромосомы, которые в этот период клеточного цикла теряют свою компактную форму, разрыхляются, деконденсируются. Степень такой деконденсации хромосом может быть различной. Зона полной деконденсации - эухроматин. При неполном разрыхлении хромосом в интерфазном ядре видны участки конденсированного хроматина. Степень деконденсации хромосомного материала — хроматина в интерфазе может отражать функциональную нагрузку этой структуры. Чем “диффузнее” распределен хроматин в интерфазном ядре, тем интенсивнее в нем синтетические процессы.

Максимально конденсирован хроматин во время митотического деления клеток, когда он обнаруживается в виде плотных хромосом. В этот период хромосомы не выполняют никаких синтетических функций, в них не происходит включения предшественников ДНК и РНК. Хромосомы клеток могут находиться в двух структурно-функциональных состояниях: в активном, рабочем, частично или полностью деконденсированном, когда с их участием в интерфазном ядре происходят процессы транскрипции и редупликации, и в неактивном, в состоянии метаболического покоя при максимальной их конденсированности, когда они выполняют функцию распределения и переноса генетического материала в дочерние клетки.

В ядрах, кроме хроматиновых участков и матрикса, встречаются перихроматиновые фибриллы, перихроматиновые и интерхроматиновые гранулы. Они содержат РНК и встречаются

практически во всех активных ядрах, представляют собой информационные РНК, связанные с белками, - рибонуклеопротеиды. Особый тип матричной ДНК, а именно ДНК для синтеза рибосомной РНК, собран обычно в нескольких компактных участках, входящих в состав ядрышек интерфазных ядер.

Публикации последних лет связывают состояние хроматина с процессами апоптоза [466]. Апоптоз представляет собой физиологический механизм устранения избыточных или функционально аномальных клеток, необходимых для нормального развития многоклеточного организма в эмбриональном периоде.

Методы количественного определения апоптотических клеток базируются на оценке явлений, вызванных изменениями в плазматической мембране клеток, избирательной фрагментацией ядерной ДНК, изменениями структуры клеточных компонентов или их перераспределением, снижением РНК в цитоплазме.

Наиболее доступным и простым методом выявления апоптотических клеток и изучения их морфологических особенностей является световая микроскопия. Вследствие изменений проницаемости плазматической мембраны апоптотические клетки накапливают краситель Хехст 33342 значительно быстрее, чем интактные. Метод позволяет выявлять ранние изменения проницаемости мембраны и хроматина, предшествующие межнуклеосомной фрагментации ДНК. Поэтому целью данного этапа работы явилось изучение состояния хроматина в бластомерах нативных и криоконсервированных эмбрионов человека.

При различных воздействиях на клетку наиболее частым изменением структуры ядра является деконденсация хроматина, что может отражать падение ядерных синтетических процессов. При гибели клетки происходят коагуляция хроматина, собирание его в

грубые агрегаты внутри ядра (пикноз), что часто завершается распадом на части (кариорексис) и растворением ядра (кариолизис). Ядрышки при подавлении синтеза рРНК уменьшаются в размерах, теряют гранулы, фрагментируются.

Ранее было продемонстрирован цитотоксичный эффект Хехст 33342 и негативное влияние ультрафиолета на различные типы клеток. Так, концентрация реагента выше 1 мкг/мл ингибирует синтез ДНК [281]. Другими авторами продемонстрировано, что если клетки после кратковременной экспозиции удалять из раствора, то они способны возобновить митоз. Эффект обработки репродуктивных клеток данным флюорохромом был различным. Так мышинные спермии, после обработки Хехст 33342 были способны к нормальному оплодотворению [467]. Обработка ооцитов на стадии герминального везикула отрицательно сказывалась на их дальнейшем созревании и способности к оплодотворению [468].

Предыдущими исследованиями было показано, что ооциты, имеющие первый тип организации хроматина нормально развиваются до стадии бластоцисты, в то время, как ооциты второго типа могут оплодотворяться, но дробятся только до стадии 8-ми бластомеров (момент активации эмбрионального генома) [469].

Общеизвестно, что главным проявлением апоптоза является деградация хроматина [470-473]. Ее основой служит ферментативное расщепление ДНК. Оно происходит в несколько этапов с формированием все более мелких фрагментов. Сначала образуются фрагменты, включающие 700, 200-250, 50-70 тыс. пар оснований, затем - фрагменты, содержащие 30-50 тыс. пар оснований. На этой стадии происходит конденсация хроматина и инвагинации ядерной мембраны. После реализации этого этапа процесс становится необратимым. Затем наступает очередной этап деградации, который

хорошо изучен и служит наиболее широко принятым опознавательным признаком апоптоза — это межнуклеосомная дезинтеграция ДНК, т. е. разрывы нитей ДНК, находящихся между нуклеосомами. При этом образуются фрагменты, кратные по величине 180-190 пар оснований, что соответствует протяженности нити ДНК в пределах одной нуклеосомы. При всей типичности для апоптоза этого типа расщепления ДНК известны примеры, когда процесс ограничивается образованием более крупных фрагментов.

Деградация хроматина при апоптозе является активным процессом, зависящим от температуры, источников энергии, синтеза РНК и белка *de novo* [474]. Несмотря на, безусловно, ключевую роль деградации ДНК в осуществлении апоптоза, между этими процессами нельзя поставить знак равенства. Во-первых, морфологические и биохимические изменения в цитоплазме и мембранах, характерные для апоптоза, могут быть индуцированы в энуклеированных клетках, т. е. в ситуации, когда деградация хроматина не происходит в связи с его отсутствием. Во-вторых, не разрушение ДНК и прекращение работы генов являются непосредственной причиной смерти клетки при апоптозе, поскольку их последствия сказываются несколько позже того срока, когда наступает апоптотическая гибель клетки. Предполагают, что гибель наступает из-за энергетического голода, вызванного расходом АТФ на работу по репарации поврежденной ДНК [475].

Необходимо отметить, что после криоконсервирования обнаружена активация апоптоза. Апоптоз может включаться в условиях глубокого охлаждения, и авторы связывают это с образованием свободных радикалов кислородного происхождения в течение фазы отогрева. Активация p53 охлаждением - предлагалась в качестве механизма для направленного апоптоза и элиминации

поврежденных клеток [476, 477]. Известно, что холодовой шок может индуцировать апоптоз в клетках на чувствительных стадиях клеточного цикла и это может пояснить, почему при некоторых условиях глубокого охлаждения был обнаружен высокий уровень апоптоза, тогда как при других нет [478].

Многочисленные стрессорные воздействия процедуры криоконсервирования (осмотический стресс при добавлении или удалении криопротекторов, глубокое охлаждение, остаточные химические эффекты криопротекторов в начальные периоды повторного отогрева) могут также рассматриваться как потенциальные сигнальные факторы апоптоза [479].

Одной из возможных причин, приводящих к нарушению развития эмбрионов, может явиться повышение уровня хромосомных aberrаций в ооцитах [480].

Успешное развитие программы ЭКО открыло возможность прямого изучения хромосомного комплекса женских гамет и детального анализа условий и причин возникновения «ошибок» мейоза и оплодотворения. Следует, однако, иметь ввиду, что исследователь получает для изучения в этих случаях, как правило, неоплодотворившиеся яйцеклетки и так называемые «лишние» зиготы и эмбрионы, лучшие из которых уже «отобраны» для переноса в матку. Тем не менее, этот материал позволяет составить определенное представление о характере и частоте количественных и (встречающихся значительно реже) структурных, хромосомных гамеопатий у человека.

Следует иметь в виду, что полиплоидии, возникающие в гаметах в результате блока мейоза, могут быть обусловлены нарушением условий культивирования. Анализ данных, приводимых разными авторами, свидетельствует о значительной вариабельности

частоты хромосомных нарушений в ооцитах: от нескольких до 30,0 – 50,0 % и более (в старших возрастных группах) [481, 482].

Структурные изменения гамет, связанные, в том числе, и с хромосомными аномалиями, выявляются только при уже начавшихся дегенеративных, очевидно необратимых изменениях. Они выражаются в деформации ооплазмы, резком расширении перивителинового пространства, нарушении структуры цитоплазмы с лизисом отдельных участков и вакуолизацией. На тотальных препаратах таких ооцитов обнаруживаются, как правило, различной степени слипания и конденсации хромосом, вплоть до появления аморфных масс хроматина. В значительной части эти изменения характерны для пула элиминирующих гамет и отражают учащение процессов атрезии.

Кроме хромосомных нарушений в мейозе, в возникновении нарушений процессов оплодотворения и раннего развития определенную роль играет зрелость ооцита в целом, в том числе наличие необходимых для осуществления как самого оплодотворения, так и дробления зигот и формирования бластоцисты запасов цитоплазматических органелл (рибосом, митохондрий), ферментов, белков, особенно влияющих на формирование структур веретена деления.

В последнее время все большее внимание уделяется цитогенетическому анализу половых клеток, так как установлено, что 50 % и более зародышей, погибающих на предимплантационных стадиях, а также во время имплантации, несут те или иные хромосомные аномалии, и причинами неудач при проведении программ ЭКО могут быть нарушения в хромосомном наборе гамет и эмбрионов [483]. Наиболее характерными типами аномалий

неоплодотворенных ооцитов является анеуплоидия, полиплоидия и структурные перестройки хромосом.

Первой по частоте встречаемости хромосомной аномалией ооцитов является анеуплоидия. По данным одних авторов - частота гипо- и гипергаплоидии одинакова [484], другие авторы отмечают, что гипогарплоидия встречается намного чаще гипергаплоидии [485, 486]. Второй хромосомной аномалией ооцитов является диплоидия [487]. Причиной диплоидии является нарушение экструзии полярного тела в первом делении созревания. Кроме того, нередкими бывают и другие формы полиплоидии - три- и тетраплоидные ооциты [488, 489]. И, наконец, структурные перестройки хромосом встречаются у 6-7% всех неоплодотворенных ооцитов [490].

Предыдущими исследованиями было показано, что ооциты, имеющие первый тип организации хроматина, нормально развиваются до стадии бластоцисты, в то время, как ооциты второго типа могут оплодотворяться, но дробятся только до стадии 8-ми бластомеров (момент активации эмбрионального генома) [491].

Так как большинство анеуплоидий материнского происхождения и возникают в результате нерасхождения хромосом во время мейоза I, представлялось целесообразным проведение цитогенетического анализа неоплодотворенных ооцитов пациенток.

Данные о частоте формирования анеуплоидных ооцитов человека достаточно противоречивы и варьируют от 4 [492] до 50% [493]. По нашим данным частота гипергаплоидии составила 3,1, а гипогарплоидии 19,2%. Повышенная частота гипергаплоидии связана, скорее всего, с артефактной потерей хромосом при приготовлении цитогенетических препаратов. Эти данные совпадают с результатами, полученными другими авторами [494-496].

Перспективным направлением работы считаем проведение цитогенетического обследования супружеских пар, поскольку показана высокая частота (16,4 %) нарушений кариотипа в группе пациентов, страдающих бесплодием. Ооциты пациенток с хромосомными аномалиями обладали сниженной способностью к оплодотворению и дальнейшему развитию [212].

В нашей работе показано, что анеуплоидия в ооцитах человека чаще связана с хромосомами групп D и G, что согласуется с данными [497]. При анализе предрасположенности хромосом различных групп к аномальному нерасхождению выявлено, что хромосомы групп A, B и C+X реже подвержены аномальному расхождению, а хромосомы групп E и G – чаще теоретически ожидаемого. Так, нами была выявлена тенденция к увеличению числа гетероплоидных женских половых клеток с возрастом. Существует несколько гипотез, объясняющих увеличение частоты анеуплоидии ооцитов. С увеличением возраста женщины микроциркуляция крови вокруг растущего фолликула может ухудшаться, вызывая гипоксию ооцита. Снижение содержания кислорода и соответственное увеличение содержания углекислоты приводят к уменьшению внутриклеточного pH, негативно сказываясь на формировании мейотического веретена [498]. Нарушения гормональных механизмов регуляции репродуктивной функции с возрастом также могут увеличивать частоту анеуплоидных ооцитов [499].

Ведущим типом хромосомной патологии женских гамет является изменение числа хромосом. При этом до 50% нарушений обусловлено трисомиями (синдромы Дауна, Патау, Эдвардса и другие), около 20% - моносомиями и около 18% - полиплоидиями. Структурные аномалии встечаются реже – 0,8% среди

преимплантационных зародышей [499] или 3-10% среди всех хромосомных нарушений [500].

В нашей работе частота диплоидии ооцитов человека составила 13,2%. Это немногим более, чем представлено в работе [160] и полностью согласуется с результатами [501]. Принято считать, что если в ооците при морфологической оценке отсутствует первое полярное тело, то такие клетки нельзя использовать при оплодотворении *in vitro* ввиду высокого риска диплоидии [194].

Имеется ограниченное число публикаций, в которых представлены данные о структурных перестройках мейотических хромосом. Это может быть связано с трудностью их анализа, поскольку мейотические хромосомы на стадии МП высококомпактизованы и не поддаются дифференциальному окрашиванию [502].

Частота ооцитов с преждевременной конденсацией хромосом спермия составляет порядка 3-4% [503]. По данным нашего исследования такое явление наблюдалось в 10,9% всех ооцитов. Это может быть связано с тем, что в нашей работе, в отличие от [504], цитогенетическому исследованию подвергали весь пул неоплодотворенных ооцитов, в том числе и тех клеток, которые созревали в условиях *in vitro*.

Известно, что количество трисомий у новорожденных увеличивается с возрастом матери. Однако большинство исследователей не обнаружили такой зависимости при изучении ооцитов [505, 506].

Благодаря возможности культивирования *in vitro* существует реальная возможность детально анализировать кариотип преимплантационных эмбрионов на протяжении всего эмбриогенеза. Становится возможным определить, как развивается зигота с

несбалансированным кариотипом, на каких стадиях эмбриогенеза хромосомные аномалии вызывают те или иные морфогенетические нарушения.

Такой подход позволяет судить о том, влияют ли хромосомные аномалии на определенные формообразующие процессы в дальнейшем. Это приобретает особую значимость при селекции эмбрионов человека, перенесших процедуру криоконсервирования для переноса в полость матки пациенткам.

В нашей работе доказана целесообразность такого подхода, поскольку наряду с общепризнанной морфологической оценкой бластомеров (количество, четкость контуров, сферичность, степень фрагментации, прозрачность, зернистость цитоплазмы) необходимым является морфологический контроль количества ядер бластомеров после криоконсервирования. Подтверждением этому является недавно опубликованная работа о возможной корреляции морфологических характеристик преимплантационных эмбрионов и их генетическим статусом [507].

Дискуссионным является вопрос использования зигот с аномальным количеством пронуклеусов для эмбриопереноса. Так, одни авторы категорически настаивают на запрете их переноса, ввиду высокого риска хромосомных патологий [508]. По данным других авторов, только 30 % зигот генетически некомпетентны - остальные же имеют нормальное число хромосом [509]. Благодаря современным молекулярно-генетическим методам исследований (FISH - анализ) было показано, что уровень хромосомных аномалий таких зигот в 1,5 раза меньше, чем по данным цитогенетического анализа [510, 511]. Таким образом, эмбрионы с тремя пронуклеусами не всегда являются триплоидами. Во-первых, возможны случаи, при которых за пронуклеус принимается цитоплазматическая вакуоль. Во-вторых,

возможна элиминация третьего пронуклеуса [512, 513]. В последних опубликованных работах предлагается (с использованием техники микроманипуляций) проводить энуклеацию одного ядра из клетки, чтобы обеспечить нормальное количество хромосом развивающегося эмбриона [514].

Причиной визуализации одного пронуклеуса может быть асинхронная экструзия, либо его образование в результате слияния мужского и женского ядра.

По данным нашего исследования апроноуклеарные зиготы встречаются в ооцитах, которые на момент аспирации были охарактеризованы, как перезревшие. Очевидно, экструзия пронуклеусов в таких клетках происходит ранее момента анализа оплодотворения (16-19 ч после инсеминации), когда завершается кариогамия.

Очевидным становится вопрос корреляции между возникновением аномальных зигот и их генетическим балансом. Например, трехпронулеарных зигот с триплоидией, поскольку триплоидия - наиболее часто встречающаяся спонтанная геномная абберация в эмбриогенезе человека. У 2-4% всех диагностированных беременностей имеет место данная хромосомная патология [515-519].

До развития методов ВРТ существовали лишь теоретические выкладки о возникновении гаплоидии, триплоидии, тетраплоидии у человека и экстраполяция данных, полученных на модельных животных (мышь, золотистый хомячок, крыса, кролик). Использование метода культивирования гамет и эмбрионов в условиях *in vitro* позволило выяснить причины возникновения эмбрионов с аномальным генетическим балансом.

С развитием вспомогательных репродуктивных технологий было определено, что нуклеарный статус спермиев и ооцитов

человека может быть важным параметром в оценке женской и мужской фертильности [520, 521]. Низкий уровень конденсации хроматина у спермиев с нормальной морфологией может быть одной из причин, лимитирующих оплодотворение. Третичная и четвертичная структуры хроматина имеют большое значение для защиты генетической информации от повреждающих факторов, и играют важную роль на ранних стадиях образования зародыша [522]

Ранний период развития эмбрионов человека определяется сложной системой налаживания взаимосвязей между развивающимся эмбрионом и материнским организмом. Установлено, что в течение короткого промежутка времени преимплантационные зародыши человека обеспечивают свои энергетические потребности за счет резервов ооцита и раннего включения собственных генов [523]. Стадия бластоцисты формируется с помощью ростовых факторов и цитокинов [524].

С целью повышения жизнеспособности криоконсервированных эмбрионов нами предложено сокультивирование деконсервированных эмбрионов с различными культурами питающих клеток и биологически активными жидкостями. Положительный эффект сокультивирования на культуре фибробластов [525], клетках яйцевода [526], эндометрия [527], при добавлении сыворотки кордовой крови [528] показан для развития нативных эмбрионов. Предлагается использовать фолликулярную жидкость как естественную среду микроокружения ооцитов [529]. Описаны успешные результаты сокультивирования эмбрионов мыши на монослое клеток линии Vero [530]. Сравнивается эффективность применения различных белковых компонентов в составе среды культивирования [531-536]

По данным нашего исследования, сокультивирование эмбрионов с соматическими клетками улучшает качество эмбрионов

(снижается количество внеклеточных фрагментов, увеличивается количество эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты).

Очевидно, монослой клеток создает биохимический и биофизический фон, сходный с тем, что окружает преимплантационный эмбрион *in vivo*. Кроме того, монослой клеток, очевидно, секретирует «эмбриотрофические» факторы, способствующие нормальному преимплантационному развитию эмбрионов.

Однако сокультивирование с различными первичными культурами животных клеток опасно возможностью вирусного загрязнения, поэтому предложенные нами аутологические системы сокультивирования, являются более приемлемыми, по сравнению с гетерологическими.

В нашей работе первичные культуры клеток кумулюса и гранулезы были получены путем центрифугирования фолликулярной жидкости и ресуспендирования осадка. Клетки, образующейся при этом суспензии, оседали, прикреплялись к поверхности культуральной чашки и распластывались на ней. Такой способ получения культуры обеспечивал высокий выход клеток.

Монослойная культура достигалась путем промывания клеток фосфатным солевым буфером. Через 24 ч культивирования клетки входили в лаг-период, сменяющийся периодом экспоненциального роста. В конце этого периода (24 ч культивирования) клетки достигали плотного монослоя и входили в период медленного роста или покоя (фаза плато). Эти фазы характерны для всех клеточных линий и позволяют получить воспроизводимые характеристики клеточных линий: продолжительность лаг-периода, время удвоения популяции в середине логарифмической фазы и насыщающую плотность клеток в монослое в фазе плато.

Культивирование на монослое клеток кумулюса и гранулезы играет положительную роль в поддержании синтеза ДНК и белков делящегося эмбриона, возможно, за счет повышенного уровня прогестерона [537]. Показано, что *cumulus oophorus* продуцирует факторы или гормоны и высвобождает их во внеклеточное окружение [538].

У некоторых видов животных удаление кумулюса перед оплодотворением приводит к снижению частоты дробления оплодотворившихся ооцитов, ухудшению раннего развития эмбрионов и снижению частоты формирования бластоцисты. Недавнее перспективное рандомизированное исследование [539] на ооцитах-сиблингах показало, что предварительное культивирование с интактным кумулюсом перед ICSI улучшает результаты эмбриологического этапа ЭКО. Этим работам противоречат выводы [540] в которых автор подчеркивает, что варианты сокультивирования не влияют на качество эмбрионов, поскольку данный показатель зависит от степени зрелости и качества ооцита в момент аспирации.

Предварительное культивирование эмбрионов млекопитающих на монослое соматических клеток не только влияет на качественные характеристики эмбрионов, но и способствует более высокой выживаемости после криоконсервирования [541]. Так, преинкубация ооцитов и культивирование эмбрионов на монослое клеток фаллопиевых труб дает обнадеживающие результаты по частоте наступления беременности после переноса в полость матки таких эмбрионов [542].

С результатами нашей работы согласуются с данными, полученными при культивировании эмбрионов мыши на монослое клеток яйцевода. Как и в нашем исследовании, повышается не только частота достижения эмбрионами стадии бластоцисты, но и общее

количество клеток на бластоцисту ($108,4 \pm 25,1$, по сравнению с $87,7 \pm 31,9$, в контроле) [543].

Неоднозначное действие фолликулярной жидкости на развитие эмбрионов *in vitro* может быть объяснимо ее составом. Так, при концентрации лептина более $62,59 \pm 5,73$ мг/мл эмбрионы соответствуют первой категории качества, ниже $59,48 \pm 7,6$ мг/мл - второй [544].

Показано, что системы сокультивирования секретируют эмбриотрофические факторы и удаляют субстанции, ингибирующие дробление [545-547].

Кроме того, убедительно продемонстрировано, что как *in vitro*, так и *in vivo* клетки образуют цитоплазматические мостики, по которым происходит обмен низкомолекулярными веществами. Это создает основу так называемой «метаболической кооперации» [548].

По стандартной технике ЭКО эмбрионы полностью освобождают от окружающих их клеток кумулюса и переносят в чистую среду, таким образом, искусственно нарушают взаимодействия между ними. Показано, что между этими структурами имеются специальные мембранные контакты, являющиеся основой биохимической и электростатической связи между клетками и способствующие взаимному обмену ионов и веществ с небольшой молекулярной массой. Кроме того, ультрацитоплазматические исследования клеток кумулюса показали наличие в них стероидосинтетических клеток, которые играют роль в клеточном окружении делящегося эмбриона [549].

Нами было продемонстрировано стимулирующее влияние 20% фолликулярной жидкости уже на этапе выделения активноподвижной фракции спермиев. Количество эмбрионов с фрагментацией

снизилось, при этом возросла частота достижения эмбрионами стадии бластоцисты.

Положительный эффект фолликулярной жидкости можно объяснить следующим: культивирование гамет, а в последующем эмбрионов *in vitro*, производится в ограниченном объеме среды. Жизнедеятельность клеток неизбежно ведет к образованию перекисных соединений и свободных радикалов.

Постепенное истощение антиоксидантной системы среды культивирования может привести к нарушению прооксидантно-антиоксидантного равновесия и активации ПОЛ. Этим, в основном, можно объяснить дегенеративные изменения в гаметах и эмбрионах и их повышенную фрагментацию.

К настоящему времени получено относительно мало информации об особенностях метаболизма человеческих эмбрионов в преимплантационном периоде. Известно, что эмбрионы человека содержат полный набор ферментов гликолиза, однако потребление глюкозы возрастает лишь к 16-клеточной стадии, одновременно увеличивается и потребление пирувата [550]. На каждой из стадий развития регистрируемая продукция лактата выше, чем теоретически возможная при употреблении только глюкозы, что свидетельствует об использовании эмбрионами эндогенных источников энергии – белков, липидов или аминокислот.

Практически отсутствуют данные о влиянии аминокислот на качество человеческих эмбрионов. Наиболее распространенными аминокислотами в репродуктивном тракте женщины являются глутамин, таурин, глицин и аланин, тогда как эмбрионы содержат, преимущественно, аланин, аспартат, глутамин, таурин и глицин [551].

Считают, что введение в среду культивирования различных комбинаций аминокислот на стадии первого деления дробления

улучшает показатели развития эмбрионов [552] . Интересным в данном аспекте являются сообщения, что таурин повышает жизнеспособность на ранних стадиях, тогда как глутамин обладает подобным эффектом после включения эмбрионального генома [43]. Описано положительное влияние аланина и аргинина на развитие бластоцист млекопитающих [553].

При уменьшении концентрации или удалении из среды культивирования незаменимых аминокислот наблюдается замедление пролиферации [554].

Противоречивые данные касаются введения в среду культивирования сыворотки крови. Считают, что сыворотку можно не включать в среду культивирования эмбрионов человека [555, 556]. По данным [557] добавление 20% сыворотки в среду культивирования улучшает качество эмбрионов и повышает частоту наступления беременности. Таким образом, нет общей картины понимания положительного либо отрицательного влияния биологически активных веществ на процессы раннего развития эмбрионов человека. Разные оценки влияния сыворотки крови на преимплантационное развитие эмбрионов человека могут быть связаны с тем, что в данных работах использовали гетерологическую сыворотку. Как известно, сыворотка крови может отличаться по содержанию гормонов, ростовых факторов или других биологически активных веществ.

Добавление в среду культивирования компонентов сыворотки - белков и 5-бромо-2-деоксиуридина приводит к ускорению темпов дробления и снижению хромосомных aberrаций [558].

В работе [559] делается вывод об изменении метаболизма эмбрионов человека, в зависимости от стадии развития, что требует введение различных аминокислот в среду культивирования.

В последнее время одним из повреждающих факторов, приводящих в частности, к бесплодию, считают перекисное окисление липидов мембран клеток [560]. Известно, что среды, используемые в настоящее время для культивирования гамет и эмбрионов не исключают активации перекисного окисления липидов в культивируемых клетках и эмбрионах, что может приводить к снижению оплодотворяющей способности спермиев, дегенеративным изменениям в ооцитах и повышенной фрагментации эмбрионов. Исследования показали уменьшение содержания одного из токсичных продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида после инкубации спермиев в ФЖ человека, что свидетельствует о защитном эффекте человеческой фолликулярной жидкости [561].

В наших исследованиях показано, что фолликулярная жидкость обладает селензависимой глутатионпероксидазной активностью. Этот антиоксидазный фермент является основным в утилизации перекиси водорода и токсичных продуктов ПОЛ - гидроперекиси липидов. Глутатионпероксидазная активность плазмы крови человека составляет 108,6 нмоль/мл в мин при 37°C. Это свидетельствует в пользу того, что глутатионпероксидазная активность в данных биологических жидкостях находится на достаточно высоком уровне. Фолликулярная жидкость и преовуляторная сыворотка крови имеют и селен-независимую пероксидазу, активность которой ниже селен-зависимой.

Селен-независимая глутатионпероксидаза является одним из изоферментов глутатион-S-трансферазы, которые могут утилизировать вторичные продукты ПОЛ - альдегиды [562]. Обнаружена также существенная активность глутатионредуктазы - основного фермента, генерирующего восстановленный глутатион для глутатионзависимой антиоксидантной системы.

Кроме того, фолликулярная жидкость и преовуляторная сыворотка характеризуются антирадикальной активностью. Способность фолликулярной жидкости перехватывать один из высокотоксичных радикалов кислорода, ответственных за активацию ПОЛ, ОН-радикал, соизмерима с антирадикальной эффективностью известных перехватчиков ОН-радикалов – этанола и триса. Не исключено, что именно эти качества в основном определяют положительное действие данных жидкостей на развитие эмбрионов человека *in vitro*.

Недостаток белков, аминокислот, факторов роста в составе среды культивирования вызывает дисфункцию митохондрий, нарушение активности транскрипционных факторов или белков, регулирующих клеточный цикл. Все это может явиться основной причиной фрагментации преимплантационных эмбрионов человека [563-565].

Некоторыми авторами убедительно продемонстрировано, что на результаты культивирования влияет тип сыворотки [566]. Включение сыворотки в состав культуральных сред может приводить к ухудшению результатов культивирования. Причины такого отрицательного действия белковых добавок на преимплантационные эмбрионы млекопитающих до конца не ясны. Также невыясненным остается вопрос влияния совместного культивирования эмбрионов морфологические и функциональные свойства преимплантационных эмбрионов человека по сравнению с культивированием единичного эмбриона [567].

Морфологическая оценка, безусловно, является достаточно строгим критерием, позволяющим судить о полноценности эмбрионов, следовательно, и о качестве культуральных сред. В то же время некоторые авторы предлагают использовать для оценки

жизнеспособности зародышей способность вылупившихся бластоцист прикрепляться к субстрату, формировать выраженную внутреннюю клеточную массу и давать разрастание клеток трофэктодермы [568].

Таким образом, проведенные исследования подтверждают, что процедура криоконсервирования не является нейтральной для преимплантационных эмбрионов человека: она оказывает влияние не только на общий уровень жизнеспособности, но и имеет четко выраженную цитогенетическую активность и данный факт необходимо учитывать при создании криобанков эмбрионов млекопитающих и для применения криоконсервирования во вспомогательных репродуктивных технологиях.

Изучение влияния криоконсервирования на генетический аппарат эмбрионов человека является важнейшим этапом усовершенствования существующих и разработки безопасных режимов криоконсервирования.

Выявление взаимосвязи между морфофункциональными характеристиками нативных и криоконсервированных эмбрионов, частотой возникновения патологических состояний митозов, уровнем хромосомных aberrаций дает основание рекомендовать цито- и молекулярно-генетический анализ эмбрионов, как объективную оценку их сохранности после замораживания-оттаивания.

Мы полагаем, что, используя комплексную оценку морфофункциональных свойств эмбрионов человека, включающую строгую оценку морфологии, способность к возобновлению митоза, темпы дробления в культуре и преимплантационную генетическую диагностику можно получить всестороннюю информацию о биологической полноценности нативных и криоконсервированных эмбрионов и прогнозировать вероятность наступление полноценной

беременности.

ВЫВОДЫ:

Современные методы криоконсервирования и принципы оценки морфофункциональной сохранности преимплантационных эмбрионов человека не позволяют определить влияние факторов криоконсервирования на их генетический аппарат. Поэтому в диссертационной работе на основании детального анализа морфофункциональных, цитологических и молекулярно-генетических характеристик определено влияние исходного состояния преимплантационных эмбрионов человека на их жизнеспособность после криоконсервирования. В диссертации приведено теоретическое обобщение и новое решение научной проблемы генетической безопасности использования криоконсервированных преимплантационных эмбрионов человека во вспомогательных репродуктивных технологиях при лечении бесплодия.

1. Разработана система комплексной оценки морфологических характеристик путем анализа размеров и степени адгезии бластомеров, наличия фрагментации, цитоплазматических вакуолей, состояния *zona pellucida*, которая позволяет учитывать вклад индивидуальных характеристик эмбриона и использовать их как биомаркеры криоустойчивости эмбрионов.
2. Морфология эмбрионов до криоконсервирования позитивно коррелирует с их выживаемостью после оттаивания. В связи с

этим эмбрионы без цитоплазматических фрагментов, со светлой мелкозернистой цитоплазмой, интактной *zona pellucida*, бластомеры сферической формы, пригодны для криоконсервирования.

3. Установлено, что оптимальной стадией для криоконсервирования преимплантационных эмбрионов человека является зигота. Криоконсервирование эмбрионов человека, находящихся на данной стадии, следует проводить через 20-22 ч после инсеминации. Поэтапное размораживание зигот в первые – третьи сутки перед использованием во вспомогательных репродуктивных технологиях и последующее культивирование позволяет переносить в полость матки пациентки эмбрионы разных сроков развития, что увеличивает вероятность их имплантации.
4. Криоконсервированные эмбрионы человека 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 оказывают влияние на способность бластоцисты к "вылуплению" из *zona pellucida*, что требует проведения процедуры вспомогательного «хэтчинга».
5. Молекулярно-цитогенетический анализ при гибридизации клонированных последовательностей ДНК с метафазными и

интерфазными хромосомами *in situ* позволил определить высокую генетическую гетерогенность преимплантационных эмбрионов человека. В преимплантационных эмбрионах человека после криоконсервирования возрастает частота анеуплоидии по хромосомам группы G, происходит увеличение частоты мозаицизма и полиплоидии.

6. Селекция эмбрионов по состоянию хроматина бластомеров является индикатором эффективности криоконсервирования и надежным критерием оценки функциональной активности генома бластомеров.
7. Факторы криоконсервирования индуцируют фрагментацию бластомеров с образованием безъядерных участков цитоплазмы, что препятствует нормальному дроблению бластомеров. Эмбрионы человека на разных стадиях развития проявляют различную морфофункциональную целостность после криоконсервирования, что выражается в увеличении степени фрагментации бластомеров.
8. Грубые хромосомные aberrации в нативных и деконсервированных эмбрионах проявляются в виде нарушений карио- и цитокинеза: образование мультинуклеарных бластомеров, фрагментов бластомеров, содержащих неравномерные массы хроматина. Факторы криоконсервирования индуцируют слияние отдельных бластомеров с образованием полиплоидных клеток. Поэтому необходимым является преимплантационная генетическая

диагностика криоконсервированных эмбрионов с целью использования во вспомогательных репродуктивных технологиях генетически полноценных эмбрионов.

9. Факторы криоконсервирования снижают митотический индекс последующего деления дробления после криоконсервирования, увеличивают количество патологических состояний митозов и индуцируют образование пикнотических ядер.
10. Основным хромосомным нарушением при цитогенетическом анализе неоплодотворенных ооцитов – анеуплоидия, с увеличением количества незрелых ооцитов, полученных при пункции фолликулов, увеличивается риск хромосомной патологии; с возрастом у женщин повышается частота нестабильности хромосомного набора репродуктивных клеток, что требует проведения дополнительного цитогенетического анализа.
11. Для улучшения условий культивирования преимплантационных эмбрионов *in vitro* была разработана система сокультивирования на клетках кумулюса и гранулезы, позволившая снизить частоту фрагментации нативных и криоконсервированных эмбрионов человека.
12. Разработаны научно обоснованные принципы комплексной оценки нативных и криоконсервированных эмбрионов по морфологическим характеристикам,

способности к возобновлению митоза, скорости морфогенетических процессов, с учетом результатов преимплантационной генетической диагностики, могут быть использованы в качестве прогностических критериев вероятности развития полноценных эмбрионов при их использовании во вспомогательных репродуктивных технологиях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Основные* показатели состояния здоровья населения и ресурсов охраны здоровья Украины.- Киев: МОЗ Украины, 2000.- С. 13-15.
2. *Гойда Н.Г., Жилка Н.Я.* Соціально-медичні та економічні аспекти планування сім'ї // Педіатрія, акушерство і гінекологія.- 2004.- №3.- С.71-74.
3. *Пшеничникова Т.Я.* Бесплодие в браке.- М.: Медицина, 1991. - 317с.
4. *Гнатейко О.З.* Стан і перспективи розвитку медичної генетики в Україні // Журнал АМН України.- 2003.- Т.9, №4.-С.649-655.
5. *Гречанина Е.Я.* Перспективи розвитку клінічної генетики в Україні // Журн. АМН України.- 2003.- Т.9, №4.- С.668-680.
6. *Лившиц Л.А.* Роль геномики в медицине // Журн. АМН України.- 2003.-Т.9, №4.- С.681-689.
7. *Multiple gestation pregnancy. The ESHRE Capri Workshop Group* // Hum. Reprod.- 2000.- Vol. 15, №8.- P.1856-1864.
8. *Евсюкова И.И., Маслянюк Н.А.* Состояние новорожденных и их дальнейшее развитие при многоплодной беременности после экстракорпорального оплодотворения // Пробл. репрод.- 2005.- №2.-С.49-53.
9. *Калинина Е.А., Торганова И.Г., Лукин В.А.* Редукция числа плодов при многоплодной беременности после ЭКО // Пробл. репрод.- 1997.- №3.- С. 38-41.
10. *Фукс М.А.* Многоплодная беременность (акушерская практика): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.- М, 1998.- 32 с.
11. *Elster N.* Less is more: the risks of multiple births // Fertil. Steril.- 2000.- Vol.74, №4.- P.617-623.

12. *Kinzler W., Ananth C., Vintzileos A.* Medical and economic effects of twin gestations // *J. Soc. Gynecol. Invest.*- 2000.- Vol. 7, №6.- P. 321-327.
13. *Land J., Evers J.* Risks and complications in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting // *Hum. Reprod.*- 2003.- Vol.18, №2.- P. 455–457.
14. *Henman M., Catt J., Wood T.* Elective transfer of single fresh blastocysts and later transfer of cryostored blastocysts reduces the twin pregnancy rate and can improve the *in vitro* fertilization live birth rate in younger women // *Fertil. Steril.*- 2005.-Vol.84, №6.- P.1620-1627.
15. *Витязева И.И., Здановский В.М.* Редукция числа эмбрионов при многоплодной беременности // *Пробл. репрод.*- 1995.-№1.- С. 95-96.
16. *Туманова Л.Е., Рябенко Е.П., Берестовой О.А.* Современное состояние супермногоплодных беременностей и селективной редукции эмбрионов // *Здоровье женщины.*-Т. 14, №2.- С.66-70.
17. *Каретникова Н. А., Стыгар А. М., Бахарев В. А. И др.* Проблемы редукции эмбрионов при множественной имплантации // *Акушер. и гинек.*- 2005.- №1.- С.17-22.
18. *Hu Y., Maxson W.S., Hoffman D.I. et al.* Maximising pregnancy rates and limiting higher-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality // *Fertil. Steril.*- 1998.- Vol. 69, №4.- P. 650-657.
19. *Liu J., Van den Abbeel E., Van Steirteghem A.* The *in vitro* and *in vivo* developmental potential of frozen and non frozen biopsied 8-cell mouse embryos // *Hum. Reprod.*- 1993.- Vol. 8, №9.- P. 1481-1486.

20. *Van den Abbeel E., Camus M., van Waesberghe L. et al.* Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation // *Hum. Reprod.*- 1997.- Vol. 12, №9.- P. 2006-2010.
21. *Archer J., Gook D.A., Edgar D.H.* Blastocyst formation and cell numbers in human frozen-thawed embryos following extended culture // *Hum. Reprod.*- 2003.- Vol. 18, №8.- P. 1669-1673.
22. *Ziebe S., Petersen K., Lindenberg S. et al.* Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization // *Hum. Reprod.*- 1997.- Vol. 12, №7.- P. 1545-1549.
23. *Vilksa S., Tiitinen A., Hyden-Granskog C. et al* Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth // *Hum. Reprod.*- 1999.- Vol. 14, №9.- P. 2392-2395.
24. *Alicani M., Cohen J., Tomkin G.* Human embryo fragmentation *in vitro* and its implications for pregnancy and implantation // *Fertil. Steril.*- 1999.- Vol. 71, №5.- P. 836-842.
25. *Безуглый Н.Д., Кисиль А.В., Трохименко А.Г. и др.* Некоторые биофизические свойства половых и эмбриональных клеток свиньи, определяющие их криорезистентность. Осмотический состав ранних эмбрионов (от зиготы до поздней морулы) // *Пробл. криоб.*- 2000, №1.- С. 49-52.
26. *Смолянинова Е.И., Хроменкова О.Б., Жерноклев Г.В.* Влияние различных этапов криоконсервирования методом сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мыши // *Пробл. криобиол.*- 2001.- №2.-С. 49-56.

27. *Бариляк І.Р.* Проблеми профілактики спадкової патології та вроджених вад розвитку // Журн. АМН України.- 2003.-Т. 9, №4.- С.656-667.
28. *Бариляк І.Р.* Профілактика вроджених вад розвитку та спадкової патології // Цитология и генетика.- 2004.- Т.38, №6.- С. 71-74.
29. *Rizk B., Edwards R., Nicolini U.* Edwards' syndrome after the replacement of cryopreserved-thawed embryos // Fertil. Steril.- 1991.-Vol. 55, №1.- P. 208-210.
30. *Ginsburg K., Johnson M., Sacco A. et al.* Tetraploidy after frozen embryo transfer: cryopreservation may interfere with first mitotic division // Abstracts of 39 Annual Meeting of the Pacific Coast Fertility Society.- 1991.- P.196.
31. *Iwarsson E., Lundqvist M., Inzunza J. et al.* A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos // Hum. Genet.- 1999.- Vol. 104, №5.- P. 376-382.
32. *Balakier H., Cabaca O., Bouman D.* Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism // Hum. Reprod.- 2000.- Vol.15, №11.- P. 2404-2410.
33. *Olivennes F., Schneider Z., Remy V. et al.* Perinatal outcome and follow-up of 82 children ages 1-9 years old conceived from cryopreserved embryos // Hum.Rep.- 1996.- Vol.11, №7.- P.1565-1568.
34. *Sutcliffe A., D'Souza S., Cadman J. et.al.* Outcome in children from cryopreserved embryos // Arch. Dis. Child.- 1995.- Vol.72, №4.- P.290-293.

35. *Wennerholm U., Hamberger L., Nilsson L. et al.* Obstetric and perinatal outcome of children born after cryopreservation as embryos // *Hum. Reprod.*- 1997.- Vol.12, №8.- P.1819-1825.
36. *Дахно Ф.В., Паращук Ю.С.* Бесплодность у чоловіків і жінок.- К.: Здоров'я, 1988.- 39с.
37. *Никитин А.И.* Современное состояние проблемы экстракорпорального оплодотворения и трансплантации эмбриона у человека // *Акушер. и гинек.*- 1989.- №8.- С. 10-13.
38. *Быков В.Л.* Функциональная морфология овуляции у человека // *Морфология.*- 2001.- №. 1.- С.82-89.
39. *Дыбан А.П., Баранов В.С.* Цитогенетика развития млекопитающих.- М.: Наука, 1978.- 216с.
40. *Balakier H., MacLusky N., Casper R.* Characterization of the first cell cycle in human zygotes: implication for cryopreservation // *Fertil. Steril.*- 1993.- Vol.59, №2.- P. 359-365.
41. *Tesarik J.* Developmental control of human preimplantation embryos: a comparative approach // *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.*- 1988.- Vol.5, №6.- P. 347-362.
42. *Rawe V.Y., Kopelman S., Nodar F.N. et al.* Pronuclear abnormalities and cytoskeletal organization during assisted fertilization in a patient with multifollicular ovarian response // *J. Assist. Reprod. Genet.*- 2002.- Vol.19, №3.- P. 152-157.
43. *Devreker F., Englert Y.* In vitro development and metabolism of the human embryo up to blastocyst stage // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*- 2000.- Vol. 92, №1.- P. 51-56.
44. *Lundin K., Bergh C., Hardarson T.* Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF // *Hum. Reprod.*- 2002.- Vol.16, №12.- P. 2652–2657.

45. *Sathananthan A., Ng S., Bongso A.* Visual Atlas of early human development for assisted reproductive technology // Singapore, 1993.- 209с.
46. *Воробьева О.А., Леонтьева О.А., Кирсанов А.А.* Факторы, влияющие на процессы ранней компактизации эмбрионов человека в культуре // Пробл. репрод.- 1999.- №1.- С. 42-46.
47. *Sathananthan A., Ratnam S., Trounson A. et al.* Human development // Hum Reprod Update.- 1999.- Vol.5, №1.- 89 с.
48. *Richter K., Harris D., Daneshmand S. et al.* Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape // Fertil. Steril.- 2000.- Vol.76, №6.- P. 1157-1167.
49. *Stephoe P., Edwards R., Purdy J.* Human blastocyst grown in culture // Nature.- 1971.- Vol.8, № 229.- P. 132-133.
50. *Евсиков А.В.* Механизмы регуляции раннего эмбриогенеза мыши // Онтогенез.- 2000.- №3.- С. 178-191.
51. *Васильева Ю.М.* Клетка как архитектурное чудо // Соросовский образовательный журнал.- 1996.- №2.- С. 36-43.
52. *Fenwick J., Platteau P., Murdoch A. et al.* Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos *in vitro* // Hum. Reprod.- 2002.- Vol.17, №2.- P. 407-412.
53. *Sakkas D., Percival G., D'Arcy Y. et al.* Assessment of early cleaving *in vitro* fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection // Fertil. Steril.- 2001.-Vol.76, №6.- P. 1150–1156.
54. *Jones G., Trounson A., Lolatgis N. et al.* Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following *in vitro* fertilization and embryo transfer // Fert. Ster.- 1998.- Vol.70, №6.- P. 1022-1029.

- 55.Евсиков А.В., Соломко А.П. Уровни и характер трансляции у доимплантационных зародышей мыши с подавленным цитокинезом // Онтогенез.- 1999.- Т.30, №2.- С.103-109.
- 56.Гоголевский П.А.. Вспомогательный хэтчинг: показания, применение, результаты // Пробл. репрод.- 1998.- №1.- С. 10-13.
- 57.Bider D. Assisted hatching by *zona drilling* of human embryos in woman of advanced age // Hum. Rep.- 1997.- Vol.12, № 2.- P. 317-320.
- 58.Tucker M.J. Assisted hatching with and without bovine oviductal epithelial cell coculture for poor prognosis *in vitro* fertilization patients // Hum. Rep.- 1994.-Vol.9, №8.- P. 1528-1531.
- 59.Gabrielsen A., Lindenberg S., Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development // Hum. Rep.- 2001.- Vol.16, №.10.- C. 2166-2170.
- 60.Gabrielsen A., Agerholm L., Toft B. et al. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study // Hum. Rep.- 2004.- Vol.19, №.10.- P. 2258-2262.
- 61.Tesarik I., Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation of pronuclear stage morphology // Hum. Rep.- 1999.- Vol.14.- P. 1318-1323.
- 62.Liu H., He Z., Mele C. et al. Expression of apoptosis related genes in human oocytes and embryos // J Assist Reprod Genetics.- 2000.- Vol.17, № 9.- P. 521-533.
- 63.Hardy K. Apoptosis in the human embryo // Rev. Reprod.- 1999.- Vol.4, №3.- P. 125–134.

64. *Fabian D., Koppel J., Maddox-Hyttel P.* Apoptotic processes during mammalian preimplantation development // *Theriogenology*.- 2005.- Vol.64.-№2.- P. 221-231.
65. *Ziebe S., Bangsbell S., Schmidt K.* Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles // *Hum. Reprod.*- Vol.19, №6.- P. 1457-1460.
66. *Зех Н., Зех Ш.* Индукция суперовуляции в программах вспомогательной репродукции // *Пробл. репрод.*- 1998.- № 5.- С. 59-65.
67. *Кулаков В.И.* Репродуктивное здоровье: проблемы, достижения и перспективы // *Пробл. репрод.*- 1999.- №2.- С. 6-9.
68. *Калинина Е.А.* Стимуляция суперовуляции при экстракорпоральном оплодотворении: Дис... канд. мед. наук. М., 1989.- 26с.
69. *Tucker M.J., Morton P.C., Sweitzer C.L., Wright G.* Cryopreservation of human embryos and oocytes // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*- 1995.- Vol.36, №7.- P. 188-192.
70. *Queenan J.T., Veeck L.L., Toner J.P. et al.* Cryopreservation of all prezygotes in patients at risk of severe hyperstimulation does not eliminate the syndrome, but the chances of pregnancy are excellent with subsequent frozen-thaw transfers // *Hum. Reprod.*- 1997.- Vol.12, №7.- P. 1573-1576.
71. *Tummon I., Contag S., Thornhill A.* Cumulative first live birth after elective cryopreservation of all embryos due to ovarian hyperresponsiveness // *Fertil.Steril.*- 2004.- Vol.81, №2.- P. 309-314.
72. *Аншина М.Б.* Принципы гормонального мониторинга в программе ЭКО // *Пробл. репрод.*- 1995, №2.- С. 43-48.
73. *Калинина Е.А., Калинина И.И., Коренев В.И. и др.* Некоторые клиничко-эмбриологические аспекты программы переноса криоэмбрионов // *Пробл. репрод.*- 2004.- №6.- С. 28-33.

74. *Bras M., Lens J., Piederiet M. et al. Laboratory aspects of in vitro fertilization.-N.V.Organon, 1996.- 296 p.*
75. *Belaisch-Allart J., Elaoufir A., Mayenga J.M. et al. Monozygotic triplet pregnancy following transfer of frozen-thawed embryos // Hum. Reprod.- 1995.- Vol.10, № 11.- P. 3064-3066.*
76. *Peress M.R., Phillips H.M. Quintuplet gestation following transfer of five cryopreserved embryos: conditions stimulating thawed-embryo implantation // J. Assist. Reprod. Genet.- 1998.- Vol.15, №8.- P. 521-523.*
77. *Montag M., Van der Ven H., Dorn C. Birth after double cryopreservation of human oocytes at metaphase II and pronuclear stages // Fertil.Steril.- 2006.-Vol.85, №3.- P. 751.*
78. *Fugger E.F., Bustillo M., Dorfmann A.D., Schulman J.D. Human preimplantation embryo cryopreservation: selected aspects // Hum. Reprod.- 1991.- Vol.6, №1.- P. 131-135.*
79. *Fugger E.F. Clinical status of human embryo cryopreservation in the United States of America // Fertil. Steril.- 1989.- Vol.52, №6.- P. 986-990.*
80. *Sutcliffe A.G. Follow-up children conceived from cryopreserved embryos // Mol. Cell. Endocrinol.- 2000.- Vol.27, №1-2.- P. 91-93.*
81. *Смирнов И.В. К теории глубокого охлаждения спермы // Животноводство.- 1972.- №11.- С.65-70.*
82. *Пушкарь Н.С. Вопросы криоконсервирования биологических объектов.- К.: Наук. думка, 1978.- 132 с.*
83. *Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология.-Киев: Наук. думка, 1994.-430с.*
84. *Исаченко В.В., Грищенко В.И., Осташко Ф.И. и др. Сверхбыстрое замораживание эмбрионов крыс и коров без*

- «классической эквilibрации» // Теоретическая и экспериментальная криобиология.- 1994.- №3.- С.3-6.
- 85.*Криопротекторы* / Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В.– Киев: Наук. думка, 1978.- 204 с.
- 86.*Пушкарь Н.С.*, Капрельянц А.С., Панков Е.Я. Ультраструктура клетки при низких температурах. - К.: Наук. думка, 1978.-144с.
- 87.*Горбунов Л.В.*, Бучацкий Л.П. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных.-К.: ВПЦ Киевский Университет, 2005.- 325с.
- 88.*Пушкарь Н.С.*, Белоус А.М. Введение в криобиологию.- К: Наук. думка, 1975.- 343с.
- 89.*Калугин Ю.В.*, Лучко Н.А. Новый подход к реализации криозащиты эмбрионов // Криоконсервирование репродуктивных клеток и эмбрионов.- Харьков.- 1992.- С.61-65.
- 90.*Boone W.*, Crane M.M., Johnson J. Changes in the freezing protocol for human zygotes alter embryonic development and pregnancy rates // Fertil. Steril.- 2005.- Vol.83, №1.- P. 182-188.
- 91.*Byrd W.* Cryopreservation, thawing, and transfer of human embryos // Semin. Reprod. Med.- 2002.- Vol.20, №1.- P. 37-43.
- 92.*Белоус А.М.*, Шраго М.И., Пушкарь Н.С. Криоконсерванты. - Киев: Наук. думка, 1979.-197с.
- 93.*Chi H.*, Koo J., Kim M. et al. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing // Hum. Reprod.- 2002.- Vol.17, №8.- P. 2146-2151.
- 94.*Elst J.*, Camus M., Van den Abbeel E. et al. Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1,2-propane diol protocols // Fertil. Steril.- 1995.- Vol.63, №1.- P. 92-100.

95. *Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S. et al.* Comparison of ethylene glycol, 1,2- propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocyst // *Hum. Reprod.*- 2000.- Vol.15, №4.- P. 905-910.
96. *Wang J., Yap Y., Matthews C.* Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception // *Hum. Reprod.*- 2001.- Vol.16, №11.- P. 2316-2319.
97. *Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А.* Некоторые аспекты криоконсервации эмбрионов и спермы // *Пробл. криоб.*- 1994.- №2.- С. 29-37.
98. *Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.- К.: Наук. думка, 1994.-142с.
99. *Лучко Н.А.* Вплив умов понадшвидкого охолодження на морфофункціональні властивості спермій та ембріонів: Автореф. Дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.22 / ИПКиК.-Х.- 1997.- 43с.
100. *Гулевский А.К.* Барьерно-транспортные свойства плазматических мембран в процессе криоконсервирования: Автореф. Дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.22 / ИПКиК.-Х.- 1986.- 42с.
101. *Balakier H., Zenzes M., Wang P. et al.* The effect of cryopreservation on the development of S and G2-phase mouse embryos // *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.*- 1991.- Vol.8, №2.- P. 89-95.
102. *Comizzoli P., Wildt D., Pukazhenth B. et al.* Effect of 1,2-propanediol versus 1,2-ethanediol on subsequent oocyte maturation, spindle integrity, fertilization, and embryo development *in vitro* in the domestic cat // *Biol. Reprod.*- 2004.- Vol.71, №2.-P. 598-604.

103. *Боголюбова Н.А.* Изменение локализации митохондрий в бластомерах зародышей мышей, дробление которых заблокировано на двухклеточной стадии // *Онтогенез.*-2005.-Т.36, №1.- С.51-60.
104. *Lassale B., Testart J., Renard J.* Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol // *Fertil. Steril.*- 1985.- Vol.44, №5.- P. 645-651.
105. *Hsieh Y., Tsai H., Chang C. et al.* Ultrarapid cryopreservation of human embryos: experience with 1582 embryos // *Fertil. Steril.*- 1999.- Vol.72, №2.- P. 253-256.
106. *Huang C., Lee T., Chen S.* Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification // *Hum. Reprod.*- 2005.- Vol.20, №1.- P. 122-128.
107. *Lai A.C., Lin B.P., Chang C.C. et al.* Pregnancies after transfer of ultrarapidly frozen human embryos// *Assist. Reprod. Genet.*- 1996.- Vol.13, №8.- P. 625-628.
108. *Левчук Т.Н.* Криоконсервация репродуктивных клеток человека // *Акушер. и гинек.*- 1998.- №1.- С. 9-11.
109. *Kumasako Y., Kumon M., Utsunomiya T. et al.* Successful pregnancy after the vitrification of zygotes using commercial vitrification solutions and conventional straws to protect against infections in liquid nitrogen // *J. Assist. Reprod. Genet.*- 2005.- Vol.22, №1.- P. 33-35.
110. *Nawroth F., Rahimi G., Isachenko E.* Cryopreservation in assisted reproductive technology: new trends // *Semin. Reprod. Med.*- 2005.- Vol.23, №4.- P. 325-335.
111. *Исаченко В., Осташко Ф., Исаченко Е.* Эффективный метод культивирования витрифицированных фрагментов яичника человека // *Пробл. репрод.*- 2006.- №2.- С. 25-30.

112. *Mukaida T., Wada S., Takahashi K. et al.* Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos // *Hum. Reprod.*- 1998.- Vol.13, №1.- P. 2874-2879.
113. *Barg P.E., Barad D.H.* Ultrarapid freezing of mouse and human preembryos: a modified approach // *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.*- 1990.- Vol.7, №6.- P. 355-357.
114. *Gordts S., Roziers P., Campo R. et al.* Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos // *Fertil. Steril.*- 1990.- Vol. 53, №3.- P. 469-472.
115. *Saito H., Ishida G., Kaneko T. et al.* Application of in vitrification to human embryo freezing // *Gynecol. Obstet. Invest.*- 2000.-Vol.49, №3.- P. 145-149.
116. *Kasai M., Ito K., Edashige K.* Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury // *Hum.Rep.*- 2002.- Vol.17, № 7.- P. 1863-1874.
117. *Raju G., Haranath G., Khrishna K. et al.* Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates // *Reprod. Biomed. Online.*- 2005.- Vol.11, №4.- P. 434-437.
118. *Van Steirteghem A.C., van der Elst J., van den Abbeel E. et al.* Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection // *Fertil. Steril.*- 1994.- Vol.6, №4.- P. 775-780.
119. *Veeck L., Amundson C., Brothman L.* Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes // *Fertil.Steril.*- 1993.- Vol.58, №6.- P. 1202-1207.
120. *Troup S.A., Matson P.L., Critchlow J.D. et al.* Cryopreservation of human embryos at the pronucleate, early

- cleavage, or expanded blastocyst stages // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.- 1991.- Vol.38, №2.- P. 133-139.
121. *Гилберт С.* Биология развития: Пер. с англ.: В 3-х т.– М.: Мир, 1993.- Т. 1. - 228 с.
 122. *Brezinova J.B., Oborna I., Fingerova H. et al.* Efficiency of cryoembryotransfer using embryos frozen in the pronuclear stage // Ceska Gynekol.- 2004.- Vol.69, №3.- P. 167-172.
 123. *Miller K.F., Golderberg J.M.* *In vitro* development and implantation rates of fresh and cryopreserved sibling zygotes // Obstet. Gynecol.- 1995.- Vol.85, №6.- P. 999-1002.
 124. *Schroder A.K., Banz C., Katalinic A.* Counselling on cryopreservation of pronucleated oocytes // Reprod. Biomed. Online.- 2003.- Vol.6, №1.- P.69-74.
 125. *Van den Abbeel E., Camus M., Van Waesberghe L. et al.* High survival rate of one-cell mouse embryos cooled to 196°C after exposure to a propylene glycol-dimethylsulfoxide-sucrose solution // Cryobiology.- 1997.- Vol.34, №1.- P. 1-12.
 126. *Van Steirteghem A., van den Abbeel E., Camus M., Devroey P.* Cryopreservation of human embryos // Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.- 1992.- Vol.6, №2.- P. 313-325.
 127. *Freeman M.R., Whitworth C.M., Hill G.A.* Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in-vitro fertilization // Hum. Reprod.- 1995.- Vol.10, №2.- P. 408-414.
 128. *Tao J., Craig R., Johnson M. et al.* Cryopreservation of human embryos at the morula stage and outcomes after transfer // Fertil. Steril.- 2004.- Vol.82, №1.- P. 108-118.
 129. *Hartshorne G., Elder K., Crow J.* The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of

- cryopreserved human blastocysts // Hum.Rep.- 1991.- Vol.6, № 1.- P. 136-141.
130. *Pantos K., Stefanidis K., Pappas K. et al.* Cryopreservation of embryos, blastocysts, and pregnancy rates of blastocysts derived from frozen-thawed embryos and frozen-thawed blastocysts // J. Assist. Reprod. Genet.- 2001.- Vol.18, №11.- P. 579-582.
 131. *Kosasa T., McNamee P., Morton C. et al.* Pregnancy rates after transfer of cryopreserved blastocysts cultured in a sequential media // Am. J. Obstet. Gynecol.- 2005.- Vol.192, №6.- P. 2035-2040.
 132. *Menezo Y.* Blastocyst freezing // Eur. J. Obstet. Gyn. Rep. Biol.- 2004.-Vol.1, № 115.- P.12-15.
 133. *Smith L., Boots E., Dorsett M.* Live birth of a normal healthy baby after a frozen embryo transfer with blastocysts that were frozen and thawed twice // Fertil. Steril.- 2005.- Vol.83, №1.- P.198-200.
 134. *Шафеев Р.А., Милаев С.Г.* Эмбриологические аспекты витрификации эмбрионов человека // Материалы XV международной конференции «Репродуктивные технологии сегодня и завтра».- М., 2005.- С. 23-24.
 135. *Menezo Y., Nicollet B., Dumont M.* Factors affecting human blastocyst formation *in vitro* and freezing at the blastocyst stage // Acta. Eur. Fertil.-1993.- Vol.24, №5.- P. 207-213.
 136. *Zech N., Lejeune B., Vanderzwalmen P.* Vittrification of hatched human blastocysts : effect of an opening in the zona pellucida before vittrification // Reprod. Biomed. Online.- 2005.- Vol.11, №3.- P. 355-361.
 137. *Биология* развития млекопитающих. Методы / М. Манк.- М.: Мир, 1990.- 406 с.

138. *Fehilly C.B.*, Cohen J., Simons R.F. et al. Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: a comparative study // *Fertil. Steril.*- 1985.- Vol.44, №5.- P. 638-644.
139. *Zeibe S.*, Bech B., Petersen K. Resumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer// *Hum. Reprod.*- 1998.- Vol.13, №1.- P. 178-181.
140. *Guerif F.*, Bidault R., Cadoret V. et al. Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal // *Hum. Reprod.*- 2002.- Vol.17, №5.- P. 1321-1326.
141. *Pal L.*, Kovacs P., Witt B. et al. Postthaw blastomere survival is predictive of the success of frozen-thawed embryo transfer cycles // *Fertil. Steril.*- 2004.- Vol.82, №4.- P. 821-826.
142. *Obasaju M.F.*, Venier W., Blake M. et al. Comparative study of the survival rate of frozen-thawed embryos with perforated zonae from microsurgical fertilization and frozen-thawed embryos with intact zonae // *Fertil. Steril.*- 1994.- Vol.61, №5.- P. 886-890.
143. *Van den Abbeel E.*, Van Steirteghen A. *Zona pellucida* damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and *in vitro* viability // *Hum. Reprod.*- 2000.- Vol.15, №2.- P. 373-378.
144. *Ciotti P.M.*, Laggalla C., Ricco A.S. et al. Micromanipulation of cryopreserved embryos and cryopreservation of micromanipulated embryos in PGD // *Mol. Cell. Endocrinol.*- 2000.- Vol.169, №1-2.- P. 63-67.
145. *Kowalik A.*, Palermo G., Barmat L. Comparison of clinical outcome after cryopreservation of embryos obtained from intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization // *Hum. Rep.*- 1998.- Vol.10, №10.- P. 2848-2851.

146. *Mauri A., Petersen C., Baruffi R. et al.* Comparison of the cryopreservation of human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection with a slow cooling or an ultrarapid cooling procedure // *J. Assist. Reprod. Genet.*- 2001.- Vol.18, №5.- P. 257-261.
147. *Osmanagaoglu K., Kolibianakis E., Tournaye H. et al.* Cumulative live birth rates after transfer of cryopreserved ICSI embryos // *Reprod. Biomed. Online.*- 2004.- Vol.8, №3.- P. 344-348.
148. *Setti L., Albani E., Novara P.* Norman birth after transfer of cryopreserved human embryos generated by microinjection of cryopreserved testicular spermatozoa into cryopreserved human oocytes // *Fertil. Steril.*- 2005.- Vol.83, №4.- P. 1041.
149. *Gianaroli L., Magli M., Ferraretti A.* The beneficial effects of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy support extensive clinical application // *Reprod. Biomed. Online.*- 2005.- Vol.10, №5.- P. 633-640.
150. *Zheng W., Zhuang G., Zhou C et al.* Comparison of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non transferable embryos // *Hum Rep.*- 2005.- Vol.20, №6. - P. 1615-1618.
151. *Stachecki J., Munne S., Cohen J.* Spindle organization after cryopreservation of mouse, human, and bovine oocytes // *Reprod. Biomed. Online.*- 2004.- Vol.6, №6.- P. 664-672.
152. *Joris H., Van den Abbel E. et al.* Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation // *Hum Reprod.*- 1999.- Vol.14, №11.- P. 2833-2837.
153. *Stachecki J., Cohen J., Munne S.* Cryopreservation of biopsied cleavage stage human embryos // *Reprod. Biomed. Online.*- 2005.- Vol.11, №5.- P. 711-715.

154. *Mohr L., Trounson A.* Cryopreservation of human embryos // *Annals NY Acad. Sci.*- 1985.- Vol.442.- P. 536-543.
155. *El-Toukhy T., Khalaf Y., Al-Darazi K. et al.* Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles // *Fertil. Steril.*- 2003.- Vol.79, №5.- P. 1106-1111.
156. *Testart J., Forman R., Belaisch J. et al.* Embryo quality and uterine receptivity in in-vitro fertilization cycles with or without agonists of gonadotrophin-releasing hormone // *Hum. Reprod.*- 1989.- Vol.4, №2.- P. 198 - 201.
157. *Hardy K., Spanos S., Becker D. et al.* From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*- 2001.- Vol.98, №4.- P. 1655-1660.
158. *Stone B., Greene J., Vargyas J. Et al.* Embryo fragmentation as a determinant of blastocyst development *in vitro* and pregnancy outcomes following embryo transfer // *Am J Obstet Gynecol.*- 2005.- Vol.192, №6.- P. 2014-2020.
159. *Juriskova A., Varmusa S., Casper R.F.* Programmed cell death and human embryo fragmentation // *Mol. Hum. Reprod.*- 1996.- Vol.2, №2.- P. 93-98.
160. *Plachot M., de Grouchy J., Junca A.M. et al.* Chromosomal analysis of human oocytes and embryos in an *in vitro* fertilization program // *Annals N. Y. Acad. Sci.*- 1988.- Vol.541.- P. 384-397.
161. *Ebner T., Yaman C., Moser M. et al.* Embryo fragmentation *in vitro* and its impact on treatment pregnancy outcome // *Fertil. Steril.*- 2001.- Vol.76, №2.- P. 281–285.
162. *Cohen J., Inge K.L., Suzman M. et al.* Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of

- embryonic morphology and implantation // *Fertil. Steril.*- 1989.- Vol.51, №5.- P. 820-827.
163. *Kahraman S., Yakin K., Donmez E.* Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection.- *Hum. Rep.*- 2000.- Vol.15, №11.- P.2390-2393.
 164. *Marti M., Grossman M., Santalo J. et al.* Plasma membrane and cytocortex alterations in frozen-thawed mouse embryos deprived of the zona pellucida // *J. Exp. Zool.*- 1998.- Vol.34, №1.- P. 38-44.
 165. *Каплун Е.А.* Изучение проницаемости мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши на ранних стадиях развития для молекул воды и криопротекторов в области температур +37 +0: Автореф. дисс... канд. биол. наук: 03.00.22.-X., 1988.- 18 с.
 166. *Shulman A., Gennun I., Ghetler Y et al.* Relationship between embryo morphology and implantation rate after *in vitro* fertilization treatment in conception cycles // *Fert. Ster.*- 1993.- Vol.60, №1.- P. 123-126.
 167. *Edwards R.G., Handyside A.H.* Future developments in IVF // *Br. Med. Bull.*- 1990.- Vol.46, №3.- P. 823-841.
 168. *Kattera S., Shrivastav P., Craft I.* Comparison of pregnancy outcome of pronuclear and multicellular stage frozen-thawed embryo transfer // *J. Assist. Reprod. Genet.*- 1999.- Vol.16, №7.- P. 358-362.
 169. *Калугина А. С., Краснопольская К. В., Коновальчикова Т. Л. и др.* Беременность и роды после переноса криоконсервированных эмбрионов: течение, перинатальные исходы, период новорожденности // *Акушер. и гинек.*-2006.- № 1.- С.21-24.
 170. *Demoulin A., Jouan C., Gerday C.* Pregnancy rates after transfer of embryos obtained from different stimulation protocols

- and frozen at either pronucleate or multicellular stage // Hum.Reprod.- 2001.- Vol.6, №6.- P. 799-804.
171. *Гоголевская И.К.* Преимплантационная генетическая диагностика: современное состояние и последние научные открытия // Пробл. репрод.- 1999.- № 1.- С. 19-26.
 172. *Sermon K.* Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view // Hum Reprod Update.- 2002.- Vol.8, № 1.- P. 11-20.
 173. *Munne S., Cohen J.* Chromosome abnormalities in human embryos // Hum. Reprod. Update.- 1998.- Vol.4, №6.- P. 842-855.
 174. *Braude P., Pickering S., Flinter F., Ogilvie C.M.* Preimplantation genetic diagnosis // Nat. Rev. Genet.- 2002.- Vol.3, №12.- P. 941-953.
 175. *Verlinsky Y., Kuliev A.M.* Preimplantation diagnosis of genetic diseases.- New York: Wiley-Liss, 1992.- 166 p.
 176. *Pieters M.H., Geraedts J.P., Dumoulin J.C. et al.* Cytogenetic analysis of *in vitro* fertilization (IVF) failures // Hum. Genet.- 1989.- Vol.81, №4.- P. 367-370.
 177. *Verlinsky Y., Pergament E., Strom Ch.* The preimplantation genetic diagnosis of genetic diseases // J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.- 1990.- Vol.7, №1.- P. 1-5.
 178. *Handyside A.H., Kontogianni E., Hardy K. et al.* Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification // Nature.- 1990.-Vol.344, №6268.- P.768-770.
 179. *Harper J.C., Coonen E., Handyside A. et al.* Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos // Prenat Diagn.- 1995.- Vol.15, №.1. -P. 41-49.

180. Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика. М.: Мир.- 1988.- 335 с.
181. Hill G., Freeman M., Bastias M. et al The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for *in vitro* fertilization-embryo transfer // Fertil. Steril.- 1989.- Vol.52, №5.- P. 801-806.
182. Ma S., Kalousek D.K., Zouves C. et al. The chromosomal complements of cleaved human embryos resulting from *in vitro* fertilization // J. In Vitro Fertil. Embryo Transf.- 1990.- Vol.7, №1.- P.16-20.
183. Michaeli G., Fejgin M., Ghetler Y. et al. Chromosomal analysis of unfertilized oocytes and morphologically abnormal preimplantation embryos from an *in vitro* fertilization program // J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.- 1990.- Vol.7, №6.- P. 341-346.
184. Бутенко В.Л., Бариляк И.Р., Стефанович А.В. Особенности комбинированного генетического скрининга первого триместра беременности после программ вспомогательных репродуктивных технологий // Цитол. и генет.- 2005.-Т.39, №1.- С. 21-25.
185. Wimmers M.E.C., Van der Merwe J.V. Chromosome studies on early human embryos-fertilized *in vitro* // Hum. Reprod.- 1983.- Vol.3, №7.- P. 894-900.
186. Ezra Y., Aceman P., Schenker J.G. Update of *in vitro* fertilization // Isr. J. Obstet. Gynec.- 1991.- №2.- P. 149-152.
187. Никитин А.И. Факторы неудач в программах вспомогательной репродукции // Пробл. репрод.- 1995.- №2.- С. 36-42.
188. Staessen C., Van Assche E., Joris H. et al. Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for

- preimplantation genetic diagnosis // *Mol. Hum. Reprod.*- 1999.- Vol.5, №4.- P. 382-389.
189. *Филиппов О. С., Казанцева А. А.* Оценка значимости различных факторов риска рождения ребенка с врожденным пороком развития // *Акушер. и гинек.*- 2005.- №1.- С. 13-16.
 190. *Кулаков В.И., Глинкина Ж.И., Кузьмичев Л.Н. и др.* Предымплантационное определение пола эмбрионов у пациентов программы ЭКО // *Акушер. и гинек.*- 2005.- №2.- С. 43-46.
 191. *Лівишч Л.А., Ясінська О.А.* Роль мікрodelецій хромосомної ділянки Yq11 в розвитку необструктивних форм чоловічого безпліддя // *Цитол. и генет.*- 2002.-Т.36, № 5.- С. 73-78.
 192. *Coonen E., Dumoulin J., Dreesen J.* Clinical application of FISH for sex determination of embryos in preimplantation diagnosis of X-linked diseases // *J.Assist.Reprod.Genet.*- 1996.- Vol.13, №2.- P. 133-136.
 193. *Plachot M.* Chromosome analysis of oocytes and embryos. / In: *Preimplantation Genetics*. Ed. By Y. Verlinsky, A. Kuliev.- New York: Plenum Press, 1997.- P. 103-112.
 194. *Martin R., Mahadevan M., Taylor P.* Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes // *J. Reprod. Fert.*- 1986.- Vol.78, №2.- P. 673-678.
 195. *Plachot M., Junca A.M., Mandelbaum J. et al.* Chromosome investigation in early life I. Human oocytes recovered in an IVF programme // *Hum. Reprod.*- 1986.- Vol.1, №8.- P. 547-551.
 196. *Plachot M., Junca A.M., Mandelbaum J. et al.* Chromosome investigations in early life. II. Human preimplantation embryos // *Hum. Reprod.*- 1987.- Vol.2, №1.-P. 29-35.

197. Курило Л.Ф., Шаронин В.О., Ворсанова С.Г. Уровень нерасхождения хромосом на разных стадиях развития мужских половых клеток человека // Пробл. репрод.- 1998.- Т.4, № 6.- С. 50-56.
198. Propping D., Talber P. F., Zaneveld L. J. D., Charter I. VOL. Fertilization and Implantation. Human fertilization. // Hum. Fert. Int. Workshop Essen.- 1978.- P.152-164.
199. Воробьева О.А., Корсак В.С., Северова Е.Л. Влияние возраста женщины на процессы оплодотворения ооцитов и развитие эмбрионов в культуре // Пробл. репрод.- 1998.- №6.- С.46-49.
200. Боярский К.Ю., Василевская С.Е. Цитогенетический анализ ооцитов, полученных у старшей возрастной группы в программе ЭКО // Пробл. репрод.- 1998, №2.- С. 34-36.
201. Bordson B.I., Leonardo V.S. The appropriate upper age limit for semen donors: A review of the genetic effects of paternal age // Fertil. Steril.- 1991.- Vol.56, №3.- P.397-401.
202. Барцева О.Б., Пулина Г.А., Балашова Е.Б. Цитогенетическое обследование супружеских пар в программе ЭКО // Пробл. репрод.- 1998.- №4.- С. 37-39.
203. Sutter P., Dhont M., Merchiers E. et al. A 45X/46, XX/47, XXX Female Mosaic Detected by cytogenetic analysis of unfertilized IVF oocytes // J. Assist. Reprod. Gen.- 1993.- Vol.10, №6.- P. 434-37.
204. Pellestor F. Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes // Hum. Genet.- 1991.- Vol.86, №1.- P. 283-288.
205. Tarlatzis B.C. Oocyte collection and quality // Assist. Reprod. Rev.- 1992.- Vol.2, №1.- P. 16-22.

206. William B. Ultrasounding the evaluation of normal and induced ovulation // Fertil. Steril.- 1984.- Vol.41, №6.- P. 21-29.
207. Ezra Y., Schenker J.G. Appraisal of *in vitro* fertilisation // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.- 1993.- Vol.48, №2.- P. 127-133.
208. Michelmann H.W., Mettler L. Cytogenetic investigations on human embryonic stages // Fertil. Steril.- 1985.- Vol.43, №2.- P. 320-322.
209. Воробьева О.А., Кузнецова Т.В., Богомолова М.В., Баранов В.С. Анализ частоты хромосомных aberrаций в ооцитах человека // Пробл. репрод.- 1997.- №2.- С. 21-26.
210. Hazzouri M., Rosseaux S., Mongelard F. Chromosomal analysis of "failed-fertilized" human oocytes resulting from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection // Mol. Reprod.- 2000.- Vol.55, №3.- P. 307-315.
211. Kunathikom S., Makemaharn O., Suksompong S., Laokirkkiat P. Chromosomal analysis of "failed-fertilized" human oocytes resulting from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection // J. Med. Assoc. Thai.- 2001.- Vol.84, №4.- P. 532-538.
212. Стефанович А.В., Бариляк И.Р., Дахно Ф.В., Гасенко Е.А. Цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов человека // Цитол. и генет.- 1995.- Т.29, №5.- С. 54-60.
213. Flaherty S.P., Payne D., Swann N.J., Matthews C.D. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection // Hum. Reprod.- 1995.- Vol.10, №10.- P. 2623-2629.
214. Eichenlaub-Ritter U., Schmiady H., Kentenich H., Soewarto D. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation // Hum. Reprod.- 1995.- Vol.10, №9.- P. 2343-2349.

215. *Rosenbusch B.E.* Frequency and patterns of premature sperm chromosome condensation in oocytes failing to fertilize after intracytoplasmic sperm injection // *J. Assist. Reprod. Genet.*- 2000.- Vol.17, №5.- P. 253-259.
216. *Zenzes M.T., Bielecki R., Casper. Et al.* Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes // *Fertil. Steril.* – 2001.- Vol.75, №4.- P.769-777.
217. *Sun Q.Y., Wu G.M., Lai L. et al.* Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization *in vitro* // *Biol. Reprod.*- 2002.- Vol.66, №3.- P. 580-588.
218. *Martin R., Balkan W., Burns K. et al.* The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa // *Hum. Genet.*- 1983.- Vol.63, №4.- P. 305-309.
219. *Michelmann H.W., Bonhoff A., Mettler L.* Chromosome analysis in polyploid human embryos // *Hum. Reprod.*- 1986.- Vol.1, №4.- P. 243-246.
220. *Van Blerkom J., Henry G., Porreco R. et al.* Preimplantation human embryonic development from polypronuclear eggs after *in vitro* fertilization // *Fert. Ster.*- 1984.- Vol.41, №5.- P. 686-696.
221. *Hunter R.H.F.* Viellissement *in vitro* ou *in vivo* de l'ovocyte ou du spermatozo de et aptitude au developement // *Contracept. Fertil.*- 1992.- Vol.9, № 5.- P. 896-902.
222. *Almeida P.A., Bolton V.N.* Immaturity and chromosomal abnormalities in oocytes that fail to develop pronuclei following insemination *in vitro* // *Hum. Reprod.*- 1993.- Vol.8, №2.- P. 229-232.

223. Wentz A.C., Repp J.E., Maxon W.S. et al. The problem of polyspermy in *in vitro* fertilization // Fertil. Steril.- 1983.- Vol.40, №6.- P. 748.
224. Boyers S.B., Diamond M.P., Lavy G. et al. The effect of polyploidy on embryo cleavage after *in vitro* fertilization in human // Fertil. Steril.- 1987.- Vol.47, №4.- P. 624-627.
225. Plaehot M., De Grouchy J., Junca A. et al. Chromosomal analysis of human oocytes and embryos in an *in vitro* fertilization program // *In vitro* fertilization and other assisted reproduction.- Worfolk.- 1988. - P. 384 -397.
226. Kola I., Trouson A., Dowson G. et al. Trippronuclear human oocytes: Altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos // Biol. Reprod.- 1987.- Vol.37, №2.- P. 395-401.
227. Bongso A., Ng S.C., Lim I. et al. Preimplantation genetics: chromosomes of fragmented human embryos // Fertil. Steril.- 1991.- Vol.56, №1.- P. 66-70.
228. Wramsby H., Fredga K., Liedholm P. Ploidy in human cleavage stage embryos after fertilization *in vitro* // Hum. Reprod.- 1987.- Vol.2, №3.- P. 233-236.
229. Lee M., Munne S. Pregnancy after polar body biopsy and freezing and thawing of human embryos // Fertil. Steril.- 2000.- Vol.73, №3.- P. 645-647.
230. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization // Hum. Reprod. Update.- 2005.- Vol.11, № 1.- P. 33-41.
231. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Консервация генетических ресурсов.-ИЦБИ: Пущино, 1980.- 70 с.

232. *Desai N., Goldfarb J.* Examination of frozen cycles with replacement of a single thawed blastocyst // *Reprod. Biomed. Online.*- 2005.- Vol.11, №3.- P. 349-354.
233. *Laverge H., Van der Elst J., De Sutter P. et al.* Fluorescent in-situ hybridization on human embryos showing cleavage arrest after freezing and thawing // *Hum. Reprod.*- 1998.- Vol.13, №2.- P. 425-429.
234. *Grifo J.A., Tang Y.X., Munne S. et al.* Healthy deliveries from biopsied human embryos // *Hum. Reprod.*- 1994.- Vol.9, №5.- P. 912-916.
235. *Tachataki M., Winston R., Taylor D.* Quantative RP-PCR tuberous sclerosis gene, TSC2, mRNA degradation folowing cryopreservation in the human preimplantation embryo // *Mol. Hum. Rep.*- 2003.-Vol.9, №10.- P. 593-601.
236. *Salumets A., Horelli-Kuitunen N., Suikkari A.* Elevated incidence of chromosomally chaotic embryos among frozen-thawed preimplantation embryos // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*- 2004.- Vol.10, №1.- P. 59-63.
237. *Munne S., Weier H., Grifo J. et al.* Chromosome mosaicism in human embryos // *Biol. Reprod.*- 1994.- Vol.51, №3.- P. 373-379.
238. *Carroll I., Warnes G.M., Matthews C.P.* Increase in digyny explains polyploidy after *in vitro* fertilization of frozen-thawed mouse oocytes // *J. Reprod. Fert.*- 1989.- Vol.85, №2.- P. 484-489.
239. *Садлер Т.* Медична ембріологія за Ландманом.- Львів: Найтіліус, 2001.- 526 с.
240. *Balaban B., Urman B.* Comparison of two sequential media for culturing cleavage-stage embryos and blastocyst: embryo characteristics and clinical outcome // *Reprod Biomed Online.*- 2005.-Vol.10.- №.4.- P. 485-491.

241. *Gardner D., Vella P., Gardner D. et al.* Culture and transfer human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers // *Fert. Ster.*- 1998.- Vol.69, №1 .- P. 84-88.
242. *Боголюбова И.А., Боголюбова И.О., Парфенов В.И.* Особенности структурно-функциональной организации 2-х клеточных зародышей мыши при воздействии некоторых ингибиторов клеточной пролиферации // *Цитология.*- 1999.- Т.41, №8.- С. 698-706.
243. *Menezo Y., Sakkas D., Janny L.* Co-culture of the early human embryo: factor affecting human blastocyst formation *in vitro* // *Microsc. Res. Tech.*- 1995.- Vol.32, № 1.- P. 50-56.
244. *Detedsai N., Goldfarb J.* Co-cultured embryos may be subjected to widely different microenvironments: pattern of growth factor/cytokine release by Vero cells during the co-culture interval // *Hum.Reprod.*- 1998.- Vol.13, № 6.- P. 1600-1605.
245. *Kervancioglu M., Saridogan E., Atasu T.* Human Fallopian tube epithelial cell co-culture increases fertilization rates in male factor infertility but not in tubal or unexplained infertility // *Hum. Rep.*- 1997.- Vol.12, №.6.- P. 1253-1258.
246. *Spandorfer S.D., Pascal P., Parks J. et al.* Autologous endometrial coculture in patients with IVF failure: outcome of the first 1,030 cases // *J. Reprod. Med.*- 2004.- Vol.49, № 6.- P. 463-467.
247. *Lindley E., Jacobson J., Corselli J.* Cryopreservation of human cumulus cells for co-cultures and assessment of DNA damage after thawing using the comet assay // *J. Assist. Reprod. Genet.*- 2001.- Vol.18, №10.- P. 534-538.

248. *Moessner J., Dodson W.C.* The quality of human embryo growth is improved when embryos are cultured in groups than separately // *Fertil. Steril.*- 1995.- Vol.64, №5.- P. 1034-1035.
249. *Чернуха Г.Е., Сметник В.П.* Роль факторов роста в функции репродуктивной системы // *Пробл. репрод.*- 1996.- №.2.- С. 8-13.
250. *Cunha-Filho J., Lemon N., Freitas F. Et al.* Insulin growth factor-1 and insulin –like growth factor binding protein-1 and 3 in the follicular fluid of infertile patients submitted *in vitro* fertilization // *J Assist Reprod Genet.*- 2005.- Vol.22, № 5.- P. 207-211.
251. *Бурлев В.А., Гаспаров А.С., Аванесян Н.С. и др.* Факторы роста и их роль в регуляции репродуктивной функции у больных с синдромом поликистозных яичников // *Пробл. репрод.*- 1998.- №.3.- С. 17-25.
252. *Graham M., Partridge A., Lewis V. Et al.* A prospective comparison of Synthetic Serum Substitute and human serum in culture for *in vitro* fertilization-embryo transfer // *Fertil. Steril.*- 1995.- Vol.64, №5.- P. 1036-1038.
253. *Dorfmann A., Bender S., Robinson P.* Cell-free human amniotic fluid as culture medium for mouse and human embryos // *Fertil. Steril.*- 1989.- Vol.51, №4.- P. 671-674.
254. *Bastias M.C., McGeebelser S.T., Bryan S.H. et al.* *In vitro* deleterious effect of hypoxanthine in Ham nutrient mixture F-10 culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development // *Fertil. Steril.*- 1993.- Vol.60, №5.- P. 876-880.
255. *Hamamah S., Lanson M., Barthemy C. et al.* Decrease of malondialdehyde generation in human spermatozoa after human follicular fluid treatment // *Hum. Reprod.*- 1995.- Vol.10, №1.- P.11-12.

256. Кулаков В.И., Леонов Б.В. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия.- М.: Медицинское информационное агенство, 2000.- 782 с.
257. Hoshi K., Kanno Y., Katayose H. Coculture of mouse embryos with cryopreserved human oviduct epithelial cells // J. Assist. Reprod. Genet.- 1994.- Vol.11, № 7.- P. 367-372.
258. Ito F., Fujino Y., Ogita S. Serum from endometriosis patients impairs the development of mouse embryos *in vitro*-comparison with serum from tubal obstruction patient and plasmanate // Acta Obstet. Gynecol. Scand.- 1996.- Vol.75, №10.- P. 877-880.
259. Thomason E.J., Roussev R.G., Stern J.J., Coulam C.B. Prevalence of embryotoxic factor in sera from women with unexplained recurrent abortion // Am. J. Reprod. Immunol.- 1995.- Vol.34, №6.- P. 338-341.
260. Downs S.M., Dow M.P.D. Hypoxanthine-maintained two-cell block in mouse embryos: dependence on glucose and effect of hypoxanthine phosphoribosyltransferase inhibitors // Biol. Reprod.- 1991.- Vol.44, №6.- P. 1025-1039.
261. Loutradis D.K., Kiessling A.A., Kallianidis K. et al. A preliminary trial of human zygote culture in Ham's F-10 without hypoxanthine // J. Assist. Reprod. Genet.- 1993.- Vol.10, №4.- P. 271-275.
262. Daniel A.J., Armstrong T.D., Gore-Langton R.E. Growth and development of rat oocytes *in vitro* // Gamete Res.- 1989.- Vol.24, №1.- P. 109-121.
263. Carney E.W., Foote R.H. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined,

- protein-free culture medium // J. Reprod. Fertil.- 1991.- Vol.91, №1.- P. 113-123.
264. Tsai F.C., Gardner D.K. Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development *in vitro* and reduces subsequent developmental potential after transfer // Fertil. Steril.- 1994.- Vol.61, №2.- P.376-382.
265. Dandekar P.V., Glass R.H. Development of two-cell mouse embryos in protein-free and protein-supplemented media // J. In Vitro Fertil. Embryo Trans.- 1990.- Vol.7, №2.- P. 107-113.
266. Gwatkin R.B.L. Amino acid requirements for attachment and outgrowth of the mouse blastocyst *in vitro* // J. Cell Physiol.- 1966.- Vol.68, №3.- P. 335-343.
267. Findley W.E., Gibbons W.E. Protein supplementation is not required for *in vitro* preimplantation or blastocyst attachment and outgrowth in uncoated polystyrene dishes // Biol. Reprod.- 1988.- Vol.38, №. 1.- P. 76.
268. Hammadeh M., Fischer-Hammadeh C., Amer A. Et al. Relationship between cytokine concentration in serum and preovulatory follicular fluid and *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection outcome // Immunol. Allergy.- 2005.- Vol.88, №1.- P.80-97.
269. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction // Cambridge: Cambridge University Press, 1999. – 128 p.
270. Кундієв Ю.І. Антологія біоетики.- Львів: БАК, 2003.- 592 с.
271. Про затвердження умов та порядку застосування штучного запліднення та імплантації ембріона (ембріонів) та

методів їх проведення / Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 4 лютого 1997 року, № 24.

272. *Virant-Klun I.* Mini-atlas.- Denmark: Jyllinge, 2001.- 100 p.
273. *Spano M., Cordelli E., Leter G. et al.* Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay // *Mol. Hum. Reprod.*- 1999.- Vol.5, №1.- P. 29-37.
274. *Элдер К., Эйвери С., Миллз К.* IVF. Лабораторные процедуры.- London, 1990.- 23 с.
275. *Erenus M., Zouves C., Rajamahendran P. et al.* The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after *in vitro* fertilization // *Fertil. Steril.*- 1991.- Vol.56, №4.- P. 707-710.
276. *Tarkowsky A.* An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // *Cytogenetics.*- 1966.- Vol.5.- P. 394-400.
277. *Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник Н.В.* Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках // *Генетика.*- 1972.-Т.VIII, №5.-133-141.
278. *Coonen E.* Genomic constitution of gametes and preimplantation embryos.- Maastricht, 1995.- 112 p.
279. *Алов И.А.* Морфологические и прикладные аспекты патологии митоза // *Архив патологии.*- 1975, №12.- С. 64-71.
280. *Cohen J.* Videocinematography of thawed embryos // *Fertil. Steril.*- 1988.-Vol.49, №5.- P. 827-834.
281. *Wiezorek C.* Cell cycle dependence of Hoechst 33342 dye cytotoxicity on sorted living cells // *Histochem.*- 1984.- Vol.81, №5.- P. 493-495.

282. *Tejada R.I., Mitchell J.C., Norman A. et al.* A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence // *Fertil. Steril.*- 1984.- Vol.42, №1.- P. 87-91.
283. *Prochazkova J., Lichnovsky Y., Kylarova D.* Involvement of p53 and Bcl-2 family proteins in regulating programmed cell death and proliferation in human embryogenesis // *Gen. Physiol. Biophys.*- 2004.- Vol.23, №2.- P. 209-229.
284. *Menezo Y., Nicollet B., Herbaut N., Andre D.* Freezing cocultured human blastocysts // *Fertil. Steril.*- 1992.- Vol.58, №5.- P. 977-980.
285. *Anifandis G., Koutselini E., Stefanidis I. Et al.* Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality // *Reproduction.*- 2005.- Vol.130, №6.- P. 917-921.
286. *Ронин В.С., Старобинец Г.М.* Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований.- М.: Медицина, 1989.- С. 264-267.
287. *Devreker F., Hardy K., Van den Bergh M. et al.* Amino acids promote human blastocyst development *in vitro* // *Hum. Reprod.*- 2001.- Vol.16, №4.- P. 749-756.
288. *Беллман Р.* Математические методы в медицине.- М.: Мир, 1987.-200 с.
289. *Edgar D., Bourne H., Speirs S. et al.* A quantative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos // *Hum. Reprod.*- 2000.- Vol.15, №1.- P. 175-179.
290. *Scott L., Alvero R., Leondires M., Miller B.* The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation // *Hum. Reprod.*- 2000.- Vol.15, №11.- P. 2394-2403.

291. Braude P., Bolton V., Moore S. Human gene expression first occurs between the four and eight-cell stage of preimplantation development // *Nature*.- 1988.- Vol.332, №6163.- P. 459-461.
292. Алов И.А. Механизмы реакции делящихся клеток на гипотермию // *Успехи совр. биол.*- 1982.- Т.93, №1.-С. 64-71.
293. Neuber E., Powers R. Is the mouse a clinically relevant model for human fertilization failures? // *Hum. Reprod.*- Vol.15, №1.- P. 171-174.
294. Ezra Y., Simon A., Laufer N. Defective oocytes: a new subgroup of unexplained infertility // *Fertil. Steril.*- 1992.- Vol.58, №1.- P. 24-27.
295. Стефанович А.В., Бариляк И.Р. Проблемы генетического исследования ооцитов и ранних зародышей человека // *Цитол. и генет.*- 1994.- Т.28, №6.- С. 69-76.
296. Rudak E., Dor J., Mashiach S. et al. Chromosome analysis of multipronuclear human oocytes fertilized *in vitro* // *Fertil. Steril.*- 1984.- Vol.41, №4.- P. 538-545.
297. Kawamura T., Mori M., Arishi A. et al. Elective single embryo transfer: comparison of blastocyst and cleavage-stage embryo transfer // *Reprod. Med. Biol.*- 2005.- Vol.4, №1.- P. 197-201.
298. Gerris J., De Neubourg D., Mangelschots K. et al. Elective single day 3 embryo transfer halves the twinning rate without decrease in the ongoing pregnancy rate of an IVF/ICSI programme // *Hum. Reprod.*- 2002.- Vol.17, №10.- P. 2626–2631.
299. Chi H., Kim D., Koo J. et al. The suitability and efficiency of human follicular fluid as a protein supplement in human *in vitro* fertilization programs // *Fertil Steril.*- 1998.- Vol.70, № 5.- P. 871-877.

300. *Балахонов А.В.* Преодоление бесплодия.-С-Пб.: Элби, 2000.- 251 с.
301. *Белоус А.М., Грищенко В.И., Паращук Ю.С.* Криоконсервация репродуктивных клеток.- Киев: Наук. думка, 1986.- 206 с.
302. *Глушак Т.И.* Демографическая проблема – глобальная проблема человечества // Бесплодие: Вспомогательные репродуктивные технологии. – К.: Ин - т репрод. Мед. УАННП, 2000. - С. 25 - 28.
303. *Грищенко В.И.* Научные основы регулирования рождаемости.-Киев: Здоров'я, 1988.- 206 с.
304. *Грищенко В.И., Паращук Ю.С., Дахно Ф.В., Юрченко Г.Г.* Криобиология и проблема бесплодия.- К.: Наук. думка, 1990.- 135 с.
305. *Радзинский В. Е., Запертова Е. Ю., Мисник В. В.* Генетические и иммунологические аспекты привычного невынашивания беременности // Акушер.о и гинек.- 2005.- №6.- С. 24-29.
306. *Стефанович А.В., Червякова Е.В., Шеметун Е.В. и др.* Цитогенетическое исследование соматических клеток и морфофункциональные характеристики ооцитов у женщин с нарушением репродуктивной функции // Цитол. и генет.- 2004.- Т.38, №1.- С. 3-8.
307. *Юнда И. Ф.* Бесплодие в супружестве.- Киев, 1990.- 463 с.
308. *Иванов В.И., Ижевская В.Л.* Этико-правовые проблемы вмешательства в геном человека // Биомедицинская этика / Под ред. Покровского В.И., Лопухина Ю.М. М.- 1999.- С. 113-127.

309. *Игнатъев В.Н.* Этический комитет: история создания, модели, уровни и перспективы деятельности. Биомедицинская этика. М., 1997.- С. 207-223.
310. *Курило Л.Ф.* Развитие эмбриона человека и некоторые морально-этические проблемы методов вспомогательной репродукции // Пробл. репрод.- 1998.- Т.4, №3.- С. 39-50.
311. *Белоус А.М., Бондаренко В.А.* Барьерные свойства мембран при низких температурах.- Киев: Наук. думка, 1983.- 206 с.
312. *Влияние* криопротекторов на биологические системы / Т.Н.Юрченко, В.Ф.Козлова, В.И.Строна, В.Н.Репин / Под. Ред. М.И.Щраго.-К.: Наук. думка, 1989.- 238 с.
313. *Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Ліннік Т.П., Компанієць А.М.* Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів // Пробл. криоб.- 2002.- №4.- С. 9-16.
314. *Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М.* Барьерные свойства биомембран при низких температурах. Киев: Наук. думка, 1988.- 206 с.
315. *Осташко Ф.І., Осташко В.Ф.* До механізму температурного шоку клітин // Розведення і генетика тварин.- К., 2001.- Вип.34.- С. 18-23.
316. *Пушкаръ Н.С., Капрельянц А.С., Панков Е.Я.* Ультраструктура клетки при низких температурах. - К.: Наук. думка, 1978.- 144 с.
317. *Петрушко М.П.* Влияние факторов криоконсервирования на генетический аппарат эмбрионов мыши: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22/ ИПКиК НАН Украины.- Х., 1994.- 14 с.

318. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.- Киев: Наук. думка, 1982.- 256с.
319. Mandelbaum J., Belaisch-Allart J., Junca A.M. et al. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes // Hum. Reprod.- 1998.- Vol.13, № 3.- P. 161-174.
320. Pickering S., Braude P., Johnson M. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption on the meiotic spindle in the human oocytes // Fertil. Steril.- 1990.- Vol.54, №1.- P. 102-109.
321. Behr B., Gebhardt J., Lyon J. et al. Factors relating to a successful cryopreserved blastocysts transfer program // Fertil.Steril.-2002.-Vol.77, №4.-P.697-699.
322. Nakayama T., Goto Y., Kanzaki H. et al. Developmental potential of frozen-thawed human blastocysts // J. Assist. Reprod. Genet.- 1995.- Vol.12, №4.- P. 239-243.
323. Klug S., Merker H., Jackh R. et al. Effect of ethylene glycol and metabolites on *in vitro* development of rat embryos during organogenesis // Toxicol In vitro. -2001.- Vol.15, №6.- P. 635-642.
324. Fahy G. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology // Cryobiology.- 1995.- Vol.32, №1.-P.1-13.
325. Ashwood-Smith M. The cryopreservation of human embryos // Hum. Reprod.- 1986.- Vol.1, №5.- P. 319-332.
326. Van den Abbeel E., Camus M., van Waesberghe L. et al. A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen // Hum. Reprod.- 1997.- Vol.12, №7.- P. 1554-1560.

327. *Burns W.N., Gaudet T.W., Martin M.B. et al.* Survival of cryopreservation and thawing with all blastomeres intact identifies multicell embryos with superior frozen embryo transfer outcome // *Fertil. Steril.*- 1999.- Vol.72, №3.- P.527-532.
328. *Горбунов Л.В.* Оценка жизнеспособности эмбрионов млекопитающих и эффективности технологии их криоконсервирования // *Пробл. криоб.*- 2003.- №4.- С. 35-41.
329. *Горбунов Л.В., Салина А.С.* Оценка эффективности технологии криоконсервирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих // *Пробл. криоб.*- 2005.- Т.15, №3.- С. 255-263.
330. *Dulouist E., Busnel M., Carlier M. et al.* Safety of embryo cryopreservation: facts and artifacts // *Hum. Rep.*- 1999.- Vol.14, №5.-
P. 1141- 1145.
331. *Freemann L., Trownson A., Kirby C.J.* Cryopreservation of human embryos: progress on the clinical use of the technique in human *in vitro* fertilization // *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.*- 1986.- Vol.3, №1.- P. 53-61.
332. *Graham J., Ham T., Porter R. et al.* Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture // *Fert. Ster.*- 2000.- Vol.74, №3.- P. 495-497.
333. *Liu W., Zheng Y., Luo M.* Effects of removal of necrotic blastomeres from mouse cryopreserved embryos on blastocyst formation and hatching // *Theriogenology.*- 2005.- Vol.15, №5.- P. 1114-1120.
334. *Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M. et al.* Developmental potential of fully intact and partially damaged cryopreserved embryos after laser-assisted removal of necrotic blastomeres and post-thaw culture selection // *Fertil.Steril.*- 2005.-Vol.84, №4.- P. 888-894.

335. *Nagy Z., Taylor T., Elliott T.* Removal of lysed blastomeres from frozen-thawed embryos improves implantation and pregnancy rates in frozen embryo transfer cycles // *Fertil.Steril.*- 2005.- Vol.84, №.6.- P. 1606-1612.
336. *Gabrielsen A., Lindenberg S., Petersen K.* The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development // *Hum. Rep.* -2001.- Vol.16, №.10.- C. 2166-2170.
337. *Roux C., Fauque P., Brun J.* Morphometric study of zona pellucida thickness variations during *in vitro* culture of human embryos to the blastocyst stage // *Hum. Rep.*- 2002.- Vol.17, №1.- P.75.
338. *Hardarson T., Hanson C., Sjögren A. et al.* Human embryos with uneven sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation // *Hum. Reprod.*- 2001.- Vol.16, №2.- P.313–318.
339. *Hardy K., Winston R., Handyside A.* Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos *in vitro*: failure of cytokinesis during early cleavage // *J. Reprod. Fertil.*- 1993.- Vol.98, №2.- P. 549-558.
340. *Kligman I., Benadiva C., Alikani M., Munne S.* The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities // *Hum. Reprod.*- 1996.- Vol.11, №7.- P. 1492-1498.
341. *Pickering S.J., Taylor A., Jonson M.H.* An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos // *Hum. Reprod.*- 1990.- Vol.10, №7.- P. 1912-1922.

342. *Giorgetti C., Terriou P., Auquier P. et al.* Embryo score to predict implantation after *in vitro* fertilization: based on 957 single embryo transfer // *Hum. Reprod.*- 1995.- Vol.10, №9.- P. 2427-2431.
343. *Steer C., Mills C., Tan S.* The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme // *Hum. Reprod.*- 1992.- Vol.7, №1.- P. 117-119.
344. *Terada Y., Luetjens C.M., Sutovsky P., Schatten G.* Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? // *Fertil. Steril.*- 2000.- Vol.74, №3.- P. 454-460.
345. *Van Royen E., Mangelschots K., de Neubourg D. et al.* Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer // *Hum. Reprod.*- 1999.- Vol.14, №9.- P. 2345-2349.
346. *Claman P., Armant D.R., Seibel M.M. et al.* The impact of embryo quality and quantity on implantation and the establishment of viable pregnancies // *J. In Vitro Fertil. Embryo Transf.*- 1987.- Vol.4, №4.- P. 218-222.
347. *Delhanty J.* Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis // *Cytogenet. Genome. Res.*- 2005.- Vol.111, №3-4.- P. 237-244.
348. *Wells D., Bermudez M., Steuerwald N.* Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos // *Fertil Steril.*- 2005.- Vol.84, №2.- P. 343-355.

349. *Arslan M, Bocca S, Jones E.* Effect of coasting on the implantation potential of embryos transferred after cryopreservation and thawing // *Fert. Ster.*- 2005.- Vol.84, №4.- P. 867-874.
350. *Behr B., Gebhardt J., Lyon J. et al.* Factors relating to a successful cryopreserved blastocysts transfer program // *Fertil.Steril.*- 2002.- Vol.77, №4.- P. 697-699.
351. *Macas E, Imthurn B, Borsos M. et al.* Impairment of the development potential of frozen thawed human zygotes obtained after intracytoplasmic sperm injection // *Fertil. Steril.*- 1998.- Vol.69, №4.- P. 630-635.
352. *Damario M., Hammit D., Session D.* Embryo cryopreservation at the pronuclear stage and efficient embryo use optimized the chance for a liveborn infant from a single oocyte retrieval // *Fertil.Steril.*- 2000.-Vol.73, №4.- P. 767-773.
353. *Damario M., Hammit D., Galanits T.* Pronuclear stage cryopreservation after intracytoplasmic sperm injection and conventional IVF: implications for timing of the freeze.-*Fertil.Steril.*- 1999.- Vol.72, №6.- P. 1049-1054.
354. *McKenzie L., Carson S., Macrelli S. et al.* Nuclear chromosomal localization in human preimplantation embryos correlation with aneuploidy and embryo morphology // *Hum. Reprod.*- 2004.- Vol.19, №10.- P. 2231-2237.
355. *Hoover L., Baker A., Check J. et al.* Clinical outcome of cryopreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection // *Fertil. Steril.*- 1997.- Vol.67, №4.- P. 621-624.
356. *Wittermer C., Bettahar-Lebugle K., Ohl J.* Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection // *Hum. Reprod.*- 2000.- Vol.15, №12.- P. 2591-2597.

357. *Edgar DH*, Archer J, Bourne H. The application and impact of cryopreservation of early cleavage stage embryos in assisted reproduction // *Hum. Fertil.*- 2005.- Vol.8, №4.- P. 225-230.
358. *Veeck L*. Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw? // *Reprod. Biomed. Online.*- 2003.- Vol.6, №3.- P. 367-374.
359. *Senn A.*, *Vozzi C.*, *Chanson A.* Et al. Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage // *Fertil. Steril.*- 2000.- Vol.74, №5.- P. 946-952.
360. *Scott L.F.*, *Smith S*. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval // *Hum.Rep.*- 1998.- Vol.13, № 4.- P. 1003-1013.
361. *Borges E.*, *Rossi L.*, *Farah L*. The impact of pronuclear orientation to select chromosomally normal embryos // *J Assist Reprod Genet.*- 2005.-Vol.22.- №3.- P.- 107-114.
362. *Horne G.*, *Critchlow J.*, *Newman M*. A prospective evaluation of cryopreservation strategies in a two-embryo transfer programme // *Hum. Rep.* – 1997.- Vol.12, №3.- P. 542-547.
363. *Menezo Y*. Cryopreservation of IVF embryos: which stage? // *Obstet. Gynecol.*- 2004.-Vol.113, № 1.-S-29.
364. *Payne J.*, *Rabum D.*, *Couchman G.* et al. Relationship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive technique outcomes // *Fertil Steril.*- 2005.- Vol.84, №4.- P.900-909.
365. *Rawe V.Y.*, *Kopelman S.*, *Nodar F.N.* et al. Pronuclear abnormalities and cytoskeletal organization during assisted

- fertilization in a patient with multifollicular ovarian response // J. Assist. Reprod. Genet.- 2002.- Vol.19, №3.- P. 152-157.
366. *Edgar DH*, Bourne H, Jericho H. The developmental potential of cryopreserved human embryos // Mol. Cell. Endocrinol.- 2000.- Vol.169, № 1-2.- P. 69-72.
367. *Jaroudi K*, Al-Hassan S., Sieck U. Zygote transfer on day 1 versus cleavage stage embryo transfer on day 3: a prospective randomized trial // Hum. Reprod.- 2004.- Vol.19, №3.- P. 645-648.
368. *Ding J.*, Pry M., Rana N. Improved outcome of frozen-thawed blastocyst transfer with Menezo's two-step thawing compared to the stepwise thawing protocol // J Assist Reprod Genet.- 2004.- Vol.21, №6.- P. 203-210.
369. *Lehtonen E.* Changes in cell dimensions and intracellular contacts during cleavage-stage cycle in mouse embryos cells // J. Embryol. Exp. Morph.- 1980.- Vol.58.- P. 231-249.
370. *Жегунов Г.Ф.* Медицинская биология. Т.2. Размножение и развитие.- СПб.: Сотис, 2005.- 208с.
371. *Elst J.*, Van den Abbeel E., Vitrier S. et al. Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates // Hum. Reprod.- 1997.- Vol.12, №7.- P. 1513-1521.
372. *Евсиков С.В.* Роль ядерно-цитоплазматических взаимодействий в регуляции доимплантационного развития мыши: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Институт цитологии и генетики.- Новосибирск, 1992.- 17 с.
373. *Евсиков С.В.*, Морозова Л.М., Соломко А.П. Роль ядерно-цитоплазматического соотношения в регуляции развития млекопитающих. Развитие зародышей с удвоенным объемом цитоплазмы // Биополимеры и клетка.- 1990.-Т.6, №3.- С.70-74.

374. Василевская С.Е., Иванов А.В., Боярский К.Ю. Классификация и морфометрические показатели жизнеспособности бластоцист // Пробл. репрод.- 2004.- №5.- С. 42-45.
375. Utsunomiya T., Ito H., Hirai K. Developmentally retarded frozen blastocysts can be rescued by synchronizing culture prior to transfer // Reprod. Biomed. Online.- 2006.- Vol.12, №5.- С.622-629.
376. Гоголевский П.А. Контроль и улучшение системы культивирования // Пробл. репрод.- 1998, №4.- С. 35-36.
377. Lonergan P., Rizos D., Kanka J. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality // Reproduction.- 2003.- Vol.126, №3.- P. 337-346.
378. Daniel A.J., Armstrong T.D., Gore-Langton R.E. Growth and development of rat oocytes *in vitro* // Gamete Res.- 1989.- Vol.24, №1.- P. 109-121.
379. Langley M., Marek D., Gardner D. Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments // Hum. Reprod.- 2001.- Vol.16, №5.- P. 902-908.
380. Pool T. An update on embryo culture for human assisted reproductive technology: media, performance, and safety // Semin. Reprod. Med.- 2005.-Vol.23, №4.- P. 309-318.
381. De Moraes L., de Miranda Cota A. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study // Hum Reprod.- 2005.-Vol.20, №5.-P.429-430.
382. Милованов А.П., Радзинский В.Е., Болтовская М.Н. и др. Роль микроокружения в жизнеобеспечении эмбриона человека // Акушер. и гинек.- 2004.- №4.- С. 15-18.

383. *Seif M.*, Edi-Osagie E., Farquhar C. et al. Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI) // Cochrane Database Syst. Rev.- 2006.- Vol.25, №1.-1894.
384. *Tao J.*, Tamis R. Application of assisted hatching for 2-day-old frozen-thawed embryo transfer in a poor-prognosis population // J. Assist. Reprod. Genet.- 1997.- Vol.14, №2.- P. 128-130.
385. *Agostoni E.* Preimplantation development of the mammalian embryo// Ann. Ist. Super. Sanita.- 1993.- Vol.29, №1.- P. 15-25.
386. *Fleming T.*, Kwong W., Porter R. et al. The embryo and its future // Biol.Reprod.- 2004.- Vol.71, №4.- P. 1046-1054.
387. *Porter R.*, Tucker M., Graham J. Advanced embryo development during extended *in vitro* culture: observations of formation and hatching patterns in non-transferred human blastocysts // Hum. Fert.- 2002.- Vol.5, №4.- P.215-220.
388. *Lundin K*, Bergh C., Hardarson T . Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF // Hum Reprod.- 2002.-Vol.16, №12.- P. 2652–2657.
389. *Montag M.*, Van der Ven H. Pregnancy outcome after blastocyst transfer as compared to early cleavage stage embryo transfer // Hum. Reprod.- 2005.- Vol.20, №6.- P. 1747-1746.
390. *Salumets A.*, Hyden-Granskog C., Makinen S. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures // Hum. Reprod.- 2003.- Vol.18, №4.- P. 821-825.
391. *Shoukir Y.*, Campana A., Farley T., Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability // Hum. Reprod.- 1997.- Vol.12, №7.- P.1531-1536.

392. Chung H., Hong S., Lim J. In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages // Fertil. Steril.- 2000.- Vol.72, №3.- P.545-551.
393. Flidler S., Selva J., Bergere M. et al. Cryopreservation of human embryos and ova // Fertil. Steril.- 1988.- Vol.49, №5.-P.743-764.
394. Guerif F., Cadoret V., Poindron J et al. Overnight incubation improves selection of frozen-thawed blastocysts for transfer: preliminary study using supernumerary embryos // Theriogenology.- 2003.- Vol.60, №8.- P. 1457-1466.
395. Alikani M., Calderon G., Tomkin G. et al. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonger culture *in vitro* // Hum. Reprod.- 2000.- Vol.15, №12.- P. 2634-2643.
396. Богачев С.С., Лихачева Е.В., Борисевич И.Е. и др. Динамика положения хроматина в объеме интерфазного ядра // Онтогенез.-2000.-Т.31, №4.-С.243-250.
397. Паткин Е.Л. Динамика структурно-функциональной организации метафазных хромосом в раннем эмбриогенезе млекопитающих в исследованиях *in situ*: Автореф. дис. ...д-ра. биол. наук.- СПб, 1995. - 40с.
398. Иост Х. Физиология клетки: Пер с англ.- М.: Мир, 1978.- 864 с.
399. Хроменкова О.Б. Цитогенетический анализ эмбрионов млекопитающих при действии разных факторов криоконсервирования: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.- Харьков, 2003.- 14 с.
400. Chedid S., Van den Abbeel E., Van Steirteghem A. Effects of cryopreservation on survival and development of interphase- and

- mitotic-stage 1-cell mouse embryos // Hum. Reprod.- 1992.- Vol.7, №10.- P.1451-1456.
401. *Хроменкова О.Б., Жегунов Г.Ф., Жерноклев Г.В.* Нарушения митотического цикла в эмбрионах мыши после криоконсервирования // Пробл. криоб.- 2001.- №3.- С. 65-66.
 402. *Доронин Ю.К.* Диминуция хроматина, аномалии митозов и гибель клеток в ранних зародышах мышей // Цитология.- 1986.- Т.28, №.5.-С. 495-500.
 403. *Gook D., Osborn S., Johnston W.* Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle // Hum.Rep.- 1993.- Vol.8, №7.-P.1101-1109.
 404. *Saunders K., Parks J.* Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro*-matured bovine oocytes // Biol. Reprod.- 1999.- Vol.61, № 1.- P. 178-187.
 405. *Kim N., Chung H., Cha K.* Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes // Hum. Rep.-1998.- Vol.13, №8.- С. 2217-2222.
 406. *Frydman N., Selva J., Bergere M.* Cryopserved immature mouse oocytes: a chromosomal and spindle study // J. Assist. Reprod. Genet.- 1997.- Vol.14, №10, P. 617-623.
 407. *Mandelbaum J., Anastasiou O., Levy R.* Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.- 2004.- Vol.5, №113.- С. 17-23.
 408. *Coonen E., Dumoulin J., Ramaekers F.* Optimal preparation of preimplantation embryo interphase for analysis by fluorescence *in situ* hybridization // Hum. Rep.-1994.- Vol.9, №3.-P.533-537.
 409. *Mohr L., Trounson A.* Structural changes associated with freezing of bovine embryos // Biol. Reprod.- 1981.- Vol.25.- P.1009-1025.

410. *Авцын А.П., Шахламов В.А.* Ультраструктурные основы патологии клетки.- М.: Медицина, 1979.- 316с.
411. *Plachot M.* Cytogenetic analysis of oocytes and embryos // *Ann. Acad. Med. Singapore.*- 1992.- Vol.21, №4.- P. 538-544.
412. *Bongso A., Chye N., Sathathanthan H. et al.* Chromosome analysis of two-cell mouse embryos frozen by slow and ultrapid methods using two different cryoprotectants // *Fert. Ster.*- 1988.- Vol.49, №5.- P. 908-912.
413. *Johnson M., Pickering S.* The effect of dimethyl sulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte // *Development.*- 1987.- Vol.100.- P. 313-324.
414. *Титенко Н.В., Евсиков В.И.* Микроядра и цитогенетические нарушения в эмбрионах мыши до имплантации // *Цитология и генетика.*- 1977.- Т.11, №1.- С. 17-22.
415. *Bouquet M., Selva J., Auroux M.* Cryopreservation of mouse oocytes: mutagenic effects in embryo? // *Biol.Reprod.*- 1993.- Vol.49, №4.- P. 764-769.
416. *Coonen E., Derhaag J., Dumoulin J.* Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos // *Hum. Reprod.*- 2004.-Vol.19, №2.-P. 316-324.
417. *Voullaire L., Slater H., Williamson R. Et al.* Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization // *Hum. Genet.*- 2000.- Vol.106.- № 2.- P.210-217.
418. *Верлинский Ю.* Преимплантационная генетическая диагностика // *Пробл. репрод.*- 1996.- №4.- С. 68-70.
419. *Иванов М.А., Стрельников В.В., Литвиненко В.М. и др.* Опыт применения количественной флюоресцентной

- мультилокусной полимеразной цепной реакции в предимплантационной диагностике для выявления распространенных анеуплоидий // *Акушер. и гинек.*- 2005.- №2.- С. 40-46.
420. *Немцова М.В., Залетаев Д.В.* Молекулярные аспекты предимплантационной генетической диагностики // *Акушер. и гинек.*- 2005.- №2.- С. 10-13.
421. *Боголюбова И.А., Боголюбова И.О., Парфенов В.И.* Особенности структурно-функциональной организации 2-х клеточных зародышей мыши при воздействии некоторых ингибиторов клеточной пролиферации // *Цитология.*- 1999.- Т.41, №8.- С. 698-706.
422. *Munne S., Grifo J., Cohen J.* Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study // *Am. J. Hum. Genet.*- 1994.- Vol.55, №1.- P.150-159.
423. *Laverge H., Van der Elst J., De Sutter P. et al.* Fluorescent in-situ hybridization on human embryos showing cleavage arrest after freezing and thawing // *Hum. Reprod.*- 1998.- Vol.13, №2.- P. 425-429.
424. *Bielanska M., Tan S., Ao A.* Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*: incidence, type, and relevance to embryo outcome // *Hum Reprod.*- 2002.- Vol.17, № 2.- P. 413-419.
425. *Coonen E., Derhaag J., Amory L.* Aetiology of chromosomal mosaicism in human embryos at the blastocyst stage // *Hum. Rep.*- 2002.- Vol.17, №1.- P. 61.
426. *Nascimento I., Leite M., Sampaio de Araujo M.* Selection of cryoprotectants based on their toxic effects on oyster gametes and embryos // *Cryobiology.*- 2005.-Vol.51, №1.-P.113-117.

427. *Munne S.* Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18 and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer // *Am. J. Obstet. Gynecol.*- 1995.- Vol.2.- P. 1183-1185.
428. *Гнетецкая В.А., Мальмберг О.Л., Панина О.Б. и др.* Цитогенетические исследования в пренатальной диагностике // *Акушер. и гинекол.*- 2003, №2.- С. 9-13.
429. *Головачев Г.Д.* Наследственность человека и внутриутробная гибель.- М: Наука, 1983.- 290 с.
430. *Запорожан В.Н.* Молекулярная генетика в клинической медицине: достижения и перспективы // *Журн. АМН Украины.*- 2003.- Т.9, № 4.- С. 638-648.
431. *Лебедев И.Н., Островерхова Н.В., Никитина Т.В. и др.* Молекулярно-цитогенетическая характеристика хромосомного дисбаланса в клетках спонтанных абортусов человека с низкой пролиферативной активностью *in vitro* // *Генетика.*- 2003.- Т.39, №8.- С. 1111-1122.
432. *Никитин А. И.* Проблемы периконцептологии и репродуктивная функция человека (роль нарушений ранних этапов репродуктивного процесса в патологии эмбрионов и плода) // *Пробл. репрод.*- 1995.- №1.- С. 14-19.
433. *Радзинский В. Е., Запертова Е. Ю., Мисник В. В.* Генетические и иммунологические аспекты привычного невынашивания беременности // *Акушер. и гинек.*- 2005.- №6.- С. 24-29.
434. *Тавокина Л.В., Сопко Н.И., Хажиленко К.Г. и др.* Молекулярно-цитогенетическое исследование абортусов у женщин с нарушением репродуктивной функции // *Цитол. и генет.*- 2006.- Т.40, №2.- С. 72-78.

435. Coonen E. Genomic constitution of gametes and preimplantation embryos.- Maastricht, 1995.- 112 p.
436. Ferraretti A., Magli M., Kopcow L et al. Prognostic role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in assisted reproductive technology outcome. Hum. Rep.-2004.- Vol.19, №3.- C. 694-699.
437. Munne S. Preimplantation genetic diagnosis and human implantation – a review // Placenta.- 2003.- Vol.24.- P. 70-76.
438. Papadopoulos G., Templeton A.A., Fisk A. et al. The frequency of chromosome anomalies in human preimplantation embryos after *in vitro* fertilization // Hum. Reprod.- 1989.- Vol.4, №1.- P. 91-98.
439. Pieters M.H., Geraedts J.P., Meyer H. et al. Human gametes and zygotes studied by non-radioactive *in situ* hybridization // Cytogenet. Cell Genet.- 1990.- Vol.53, №1.- P. 15-19.
440. Wilton L., Voullaire L., Sargeant P. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence *in situ* hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure // Fertil. Steril.- 2003.- Vol.80, №4.- P. 860-868.
441. Plachot M. Cytogenetic analysis of oocytes and embryos // Ann. Acad. Med. Singapore.- 1992.- Vol.21.- №5-6.- P. 775-786.
442. Daphnis D., Delhanty J., Jerikovic S. Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy // Hum.Reprod.-2005.-Vol.20, №1.- P. 129-137.
443. Горин В.С., Серов В.Н., Жабин С.Г. Новые методические подходы в пренатальной диагностике хромосомных заболеваний // Пробл. репрод.-2000.- №2.- С.11 -18.

444. *Ворсанова С.Г., Берешева А.К., Казанцева Л.З.* Молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции // Проблемы репродукции.- 1998.-№4.-С.41-46.
445. *Тимошевский В.А., Назаренко С.А.* Критерии оценки частоты анеуплоидии в интерфазных ядрах клеток с помощью FISH-анализа // Цитология.- 2005.-Т.47, №.6.-С.526-532.
446. *Geraedts J., Harper J., Braude P. et al.* Preimplantation genetic diagnosis (PGD), a collaborative activity of clinical genetic departments and IVF centers.- 2001.- Vol.21.- №12.- P. 1086-1092.
447. *Пендина А.А., Кузнецова Т.В., Логинова Ю.А. и др.* Особенности метилирования прицентромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1,9 и 16 у эмбрионов человека // Цитология.- 2001.- Т.43, № 8.- С. 772-776.
448. *Astner A., Schwinger E., Caliebe A. et al.* Sonographically detected fetal and placental abnormalities associated with trisomy 16 confined to the placenta. A case report and review of the literature // Prenatal. Diagn.- 1998.- №12.- P.1308-1315.
449. *Rajaei F., Karja N., Agung B.* Analysis of DNA fragmentation of porcine embryos exposed to cryoprotectants.- 2005.- Vol.40, №5.- P.429-432.
450. *Zuccotti M., Ponce R., Boiani M. et al.* The analysis of chromatin organization allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst // Zygote.- 2002.- Vol.10, №1.- P. 73-78.
451. *Frydman N., Ray P., Romana S.* First birth baby after preimplantation genetic diagnosis performed on thawed embryos // J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.- 2003.- Vol.32, №4.-P. 363-367.

452. *Quintans C., Donaldson M., Bertolino M. et al.* Birth resulting from transfer of blastocysts cryopreserved with propanediol after spontaneous hatching // *Reprod. Biomed. Online.*- 2003.- Vol.6, №1.- P.66-68.
453. *Allegra A., Sammartano F., Scaglione P.* Monozygotic bichorionic twinning after transfer of a single frozen/thawed embryo that has undergone quartered laser-assisted zona thinning: a case report // *J. Assist. Genet.*- 2005.-Vol.22, №11-12.- P.437-441.
454. *Sutcliffe A., D'Souza S., Cadman J.* Minor congenital anomalies, major congenital malformations and development in children conceived from cryopreserved embryos // *Hum. Reprod.*- 1995.- Vol.10, №12.- P.3332-3337.
455. *Balakier H., Cabaca O., Bouman D.* Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism // *Hum. Reprod.*- 2000.- Vol.15, №11.- P. 2404-2410.
456. *Pratt H.P., Chakraborty J., Surani M.A.* Molecular and morphological differentiation of the mouse blastocyst after manipulations with cytochalasin D // *Cell.*- 1981.-Vol.26, №2. -P. 279-292.
457. *Eroglu A., Toner M., Leykin L.* Cytoskeleton and polyploidy after maturation and fertilization of cryopreserved germinal vesicle-stage mouse oocytes // *J. Assist. Reprod. Genet.*- 1998.-Vol.15, №7.- P.447-454.
458. *Munne S., Lee A., Rosenwaks Z.* Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos // *Hum. Rep.*- 1993.- Vol.8, №12.- P.2185-2191.
459. *Tesarik J., Kopečný V., Plachot M.* Ultrastructural and autoradiographic observations on multinucleated blastomeres of

- human cleaving embryos obtained by *in vitro* fertilization // Hum. Reprod.- 1996.- Vol.2.- P. 127-136.
460. Agostoni E. Preimplantation development of the mammalian embryo // Ann. Ist. Super. Sanita.- 1993.- Vol.29, №1.- P.15-25.
461. Hassold T. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions // Am J Hum Genet.- 1980.- Vol.32, №5, P. 723-730.
462. Hassold T., Jacobs P., Kline J. Effect of maternal age on autosomal trisomies // Ann Hum Genet.- 1980.- Vol.44, №1.- P. 29-36.
463. Cotter P., Caggana M., Willner J. et al. Prenatal diagnosis of a fetus with two balanced de novo chromosome rearrangements // Am J Med Genet.- 1996.- Vol.66, №2.- P.197-199.
464. Vallente R., Cheng E., Hassold T. The synaptonemal complex and meiotic recombination in humans: new approaches to old questions // Chromosoma.- 2006.- Vol.115, №3.- P.241-249.
465. Kajii T., Ferrier A., Niikawa N. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses // Hum Genet.- 1980.- Vol.55, №1.- P. 87-98.
466. Седых А.В. Математическое моделирование процессов апоптоза и некроза в культуре клеток *in vitro* // Цитология и генетика.-2004.- Т.38, №5.- С. 57-61.
467. Morell J., Mackenzie N. The separation of viable X and Y chromosome-bearing spermatozoa in domestic animal species // Tierar. Prax. Suppl.- 1989.- Vol. 4.- P.35.
468. Bradshaw J., Jung T., Fulka J. UV irradiation of chromosomal DNA and its effect upon MPF and meiosis in mammalian oocytes // Mol. Reprod. Dev. – 1995.- Vol.41, №4.- P.503-512.

469. *Морозова Л.М., Вагина И.Н., Соломко А.П.* Современное состояние и проблемы клонирования млекопитающих.- *Біополімери і клітина*.-2004.-Т.20, №1-2.- С.116-129.
470. *Новикова В.С.* Программированная клеточная гибель.- С-Пб.: Наука, 1996.-77 с.
471. *Самуилов В.Д., Олескин А.Ф., Лагунова Е.М.* Программируемая клеточная смерть // *Биохимия*.- 2000.-Т.65, №.8.- С.1029-1046.
472. *Светлаков А.В., Яманова М.В., Салмина А.Б.* Апоптоз в преимплантационном эмбриогенезе // *Пробл. репрод.*- №5.- С.15-23.
473. *Херрингтон С., Макги Д.* Молекулярная клиническая диагностика. Методы.-М.: Мир, 1999.- 558с.
474. *Huppertz B., Herrler A.* Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta // *Birth Defects Res C Embryo Today*.- 2005.-Vol.75, №4.- P.249-261.
475. *Juriscova A., Action B.* Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development // *Reproduction*.- 2004.- Vol.128.- P. 281-291.
476. *Xu J., Sc M., Cheung T. Et.al.* The incidence of cytoplasmic fragmentation in mouse embryos *in vitro* is not affected by inhibition of caspase activity // *Fertil. Steril*.- 2001.-Vol.75, №. 5.-P.986-991.
477. *Huppertz B., Herrler A.* Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta // *Birth Defects Res C Embryo Today*.- 2005.-Vol.75, №4.- P.249-261.

478. *Фуллер Б., Грин К., Грищенко В.И.* Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих // Пробл. криоб.- 2004.-№3.-С.58-71.
479. *Фильченков А.А.* Современные технологии количественной оценки апоптоза и их применение в экспериментальной и клинической онкологии.-К.: ДИА, 2003.- 76с.
480. *Никитин А.И., Китаев Э.М., Неронова Е.Г.* Нарушение формирования женских гамет и пренатальная патология // Акуш. и гинек.- 1990.- №1.- С. 45-47.
481. *Воробьева О.А., Богомолова М.В., Кузнецова Т.В. и др.* Влияние возраста на частоту гетероплоидии в ооцитах человека // Цитология.- 2000.- Т.42, №12.- С. 1165-1170.
482. *Angell R.* Cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes // Hum. Rep.- 1991.- Vol.6, №4.- P.568-573.
483. *Wramsby H., Fredga K., Liedholm P.* Chromosome analysis of human oocytes recovered from preovulatory follicles in stimulated cycles // N. Engl. J. Med.- 1987.- Vol.316, №3.- P. 121-124.
484. *Gras L., McBain J., Trounson A. et al.* The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) uniseminated human oocytes // Hum Reprod.- 1992.- Vol.7, №10.- P.1396-1401.
485. *Smith R., Walker L., Cobo A.C., Vantman D.* Contribution of chromosomal abnormalities to *in vitro* fertilization failures // Rev. Med. Chil.- 1998.- Vol.126, №5.- P. 511-519.
486. *Roberts C.G., O'Neil C.* Increase in the rate of diploidy with maternal age in unfertilized *in vitro* fertilization oocytes // Ibid.- 1995.- Vol.10, № 8.-P.2139-2141.

487. *Roberts C.G., O'Neil C.* Increase in the rate of diploidy with maternal age in unfertilized *in vitro* fertilization oocytes // *Ibid.*- 1995.- Vol.10, № 8.- P.2139-2141.
488. *Kola I., Trounson A., Dawson G.* Tripronuclear human oocytes: altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos // *Biol Reprod.*- 1987.- Vol.37, №2.-P. 395-401
489. *Wennerholm U., Bergh C., Hagberg H.* Gestational age in pregnancies after *in vitro* fertilization: comparison between ultrasound measurement and actual age // *Ultrasound Obstet Gynecol.*- 1998.- Vol.12, №3.- P.170-174.
490. *Tejada M.I., Mendoza R., Corcostegui B., Benito J.A.* Chromosome studies in human unfertilised oocytes and un-cleaved zygotes after treatment with gonadotropin-releasing hormone analogs // *Fertil. Steril.*- 1991.- Vol.56, №5.- P. 874-880.
491. *Zenzes M.T., Belkien L., Bordt J. et al.* Cytologic investigation of human *in vitro* fertilization failures // *Fertil. Steril.*- 1985.- Vol.43, № 6.- P. 883-891.
492. *Edirisinghe R., Jemmott R., Allan J.* Comparison of growth rates of fresh and frozen-thawed embryos according to chromosomal status // *J. Assist. Reprod. Genet.*- 2005.- Vol.22, №7-8.- P.295-300.
493. *Lim A.S.T., Ho A.T.N., Tsakok M.N.H.* Chromosomes of oocytes failing *in vitro* fertilization // *Hum Reprod.*- 1995.- Vol.10, № 10.-P.2570-2575.
494. *Zhivkova R.* Ploidity and chromatin status of human oocytes after failed *in vitro* fertilization // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*- 2003.- Vol.109, №2.-P. 185-189.
495. *Zenzes M., Casper R.* Cytogenetics of human oocytes, zygotes and embryos after *in vitro* fertilization // *Hum. Genet.*- 1992.- Vol.88, №4.- P.367-375.

496. Баранов В.С., Пендина А.А., Кузнецова Т.В. и др. Некоторые особенности статуса метилирования метафазных хромосом у зародышей человека доимплантационных стадий развития // Цитология.- 2005.- Т.47, №8.- С. 723-729.
497. Коваленко Т.А. Цитогенетична та морфофункціональна характеристика ооцитів людини у зв'язку з їх заплідненням *in vitro* (клініко-експериментальне дослідження). Автореф. Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22 / УНГЦ.- К.- 1999.- 23с.
498. Gaulden M. A model that explains the varying frequency of aneuploid children with maternal age (J-shaped curve) as well as aneuploidy of paternal origin // Prog Clin Biol Res.- 1989.-Vol. 318.- P.253-257.
499. Verlinsky Y, Handyside A, Grifo et al. Preimplantation diagnosis of genetic and chromosomal disorders // J Assist Reprod Genet.- 1994.- Vol.11, №5.- P. 236-243.
500. Акулова И.К. Вспомогательные репродуктивные технологии и врожденные пороки развития // Пробл. репрод.- 1997.- №2.- С. 8-14.
501. Findikli N., Kahraman S., Saglam Y. et al. Embryo aneuploidy screening for repeated implantation failure and unexplained recurrent miscarriage // Reprod Biomed Online.- 2006.- Vol.13, №1.- P.38-46.
502. Magli M., Ferraretti A., Crippa A. First meiosis errors in immature oocytes generated by stimulated cycles // Fertil Steril.- 2006.-Vol.86, №3.- P.629-635.
503. A'arabi S., Roussel J., Chandler J. Chromosomal analysis of mammalian oocytes matured *in vitro* with various culture systems // Theriogenology.- 1997.-Vol.48, №7.- P.1173-1183.
504. Fragouli E., Wells D., Whalley K. et al. Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative

- genomic hybridization analysis of human MII oocytes and first polar bodies // *Cytogenet Genome Res.*- 2006.- Vol.114, №1.- P.30-38.
505. Wang H., Hoog C. Structural damage to meiotic chromosomes impairs DNA recombination and checkpoint control in mammalian oocytes // *J Cell Biol.*- 2006.- Vol.173, №4.- P.485-495
506. Selva J., Bergere M., Molina-Gomes D. et al. Contribution of first polar body analysis to understanding of human aneuploidy mechanism // *Bull Acad Natl Med.*- 2005.-Vol.189, №8.- P. 1761-1772.
507. Menezo Y. Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: interaction with the biochemical environment // *Reprod Biomed Online.*- 2006.- Vol.12, №5.- P.616-621.
508. Balakier H. Trippronuclear human zygotes: the first cell cycle and subsequent development // *Hum. Reprod.*- 1993.- Vol.8, №11.- P. 1892-1897.
509. Macas E., Imthurn B., Rosselli M., Keller P.J. Chromosome analysis of single- and multipronucleated human zygotes proceeded after the intracytoplasmic sperm injection procedure // *J. Assist. Reprod. Genet.*- 1996.- Vol.13, №4.- P. 345-350.
510. Ma S., Kalousek D.K., Yuen B.H., Moon Y.S. The chromosome pattern of embryos derived from trippronuclear zygotes studied by cytogenetic analysis and fluorescence *in situ* hybridization // *Fertil. Steril.*- 1995.- Vol.63, №6.- P. 1246-1250.
511. Macas E., Imthurn B., Rosselli M., Keller P.J. The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection // *Hum. Reprod.*- 1996.- Vol.11, №11.- P. 2496-2501.
512. Pieters M.H., Dumoulin J.C., Ignoul-Vanvuchelen R.C. et al. Triploidy after *in vitro* fertilization: cytogenetic analysis of human

- zygotes and embryos // J. Assist. Reprod. Genet.- 1992.- Vol. 9, №1.- P. 68-76.
513. Van Soom A., Mateusen B., Leroy J. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? // Reprod Biomed Online.- 2003.- Vol.7, №6.- P. 664-70.
 514. Ivakhnenko V., Cieslak J., Verlinsky Y. A microsurgical technique for enucleation of multipronuclear human zygotes // Hum. Reprod.- 2000.- Vol.15, №4.- P. 911-916.
 515. Angell R. Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man // Hum. Genet.- 1991.- Vol. 86, №4.- P. 383-387.
 516. Grossmann M., Calafell J.M., Brandy N. et al. Origin of trippronucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection // Hum. Reprod.- 1997.- Vol.12, №12.- P. 2762-2765.
 517. Pang M., Jee B., Kim S. Chromosomal constitution of embryos derived from trippronuclear zygotes studied by fluorescence *in situ* hybridization using probes for chromosomes 4, 13, 18, 21, X and Y // Gynecol. Obstet. Invest.- 2005.- Vol.59, №1.- P. 14-18.
 518. Rosenbusch B.E., Schneider M., Hanf V. Tetraploidy and partial endoreduplication in a trippronuclear zygote obtained after intracytoplasmic sperm injection // Fertil. Steril.- 1998.- Vol. 69, №2.- P. 344-346.
 519. Rosenbusch B.E., Schneider M., Sterzik K. The chromosomal constitution of multipronuclear zygotes resulting from *in vitro* fertilization // Hum. Reprod.- 1997.- Vol.12, №10.- P. 2257-2262.
 520. Zucotti M., Ponce R., Boiani M. et al. The analysis of chromatin organization allows selection of mouse antral oocytes

- competent for development to blastocyst // *Zygote*.- 2002.- Vol.10.- P. 73-78.
521. *Tejada R.I., Mitchell J.C., Norman A. et al.* A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence // *Fertil. Steril.*- 1984.- Vol.42, №1.- P. 87-91.
522. *Battin D., Vargyas J.M., Sato F. et al.* The correlation between *in vitro* fertilization of human oocytes and semen profile // *Fertil. Steril.*- 1985.- Vol.44, №6.- P. 835-838.
523. *Beatty R.A.* The genetics of mammalian gamete // *Biol. Rev.*- 1970.- Vol.45.- P. 73-120.
524. *Межевикина Л.М., Федорова В.В., Капралова И.В.* Повышение выживаемости доимплантационных зародышей мыши в среде с рекомбинантным цитокином LIF // *Онтогенез*.- 2006.- Т.37, №1.- С.55-63.
525. *Wetzels A., Bastiaans B., Hendriks J.* The effects of co-culture with human fibroblasts on human embryo development *in vitro* and implantation // *Hum. Reprod.*- 1998.- Vol.13.- P. 1325-1330.
526. *Mishra S., Lei Z., Rao C.* A novel role of luteinizing hormone in the embryo development in cocultures // *Biol. Reprod.*- 2003.- Vol.68.- P. 1455-1462.
527. *Laverge H., De Sutter P., Desmet R. et al.* Prospective randomized study comparing human serum albumin with fetal cord serum as protein supplement in culture medium for *in vitro* fertilization // *Hum. Reprod.*- 1997.- Vol.12, №10.- P. 2263-2266.
528. *Яманова М.В., Светлаков А.В., Салмина А.Б.* Фолликулярное микроокружение ооцитов при эндокринном бесплодии // *Пробл. репрод.*-2004.- №4.- С.46-50.

529. Choi Y., Takagi M., Kamishita H. et al. Effects of follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes *in vitro* // Theriogenology.-1998.- Vol.49, №6.- P.1103-1112.
530. Nematollahi N, Valojerdi M. Effect of vero cell coculture on the development of frozen-thawed two-cell mouse embryos // J. of Assist. Reprod. Genet.- 1999.- Vol. 16, №7.- P. 380-384.
531. Dugan K., Shalika S., Smith R. Comparison of synthetic serum substitute and fetal cord serum as media supplements for *in vitro* fertilization: a prospective, randomized study // Fertil Steril.- 1997.- Vol.67, №1.-P. 166-168.
532. Georgios A., Eleni K., Ioannis S. Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality // Reproduction.- 2005.- Vol.130, №6.- P.917-921.
533. Huyser C., Fourie F., Moolman H. The influence of sera, follicular fluids and seminal plasma on human sperm-zona pellucida binding // Arch Androl.- 1986.- Vol.17, №3.-P. 179-187.
534. Ito F., Fujino Y., Ogita S. Serum from endometriosis patients impairs the development of mouse embryos *in vitro*-comparison with serum from tubal obstruction patient and plasmanate // Acta Obstet. Gynecol. Scand.- 1996.- Vol.75, №10.- P. 877-880.
535. Lane M., Maybach J., Gardner D. Addition of ascorbate during crypreservation stimulates subsequent embryo development // Human reproduction. 2002.- Vol.17, № 10.- P.2686-2693.
536. Lavoie M., Conaghan J., Pedersen R. Culture of human embryos for studies on the derivation of human pluripotent cells: a preliminary investigation // Reprod Fertil Dev.- 1998.- Vol.10, №7-8.- P.557-561.
537. Лебедева И.Ю., Кибардина Т.В., Кузьмина Т.И. Участие клеток гранулезы в опосредовании действия пролактина и

- соматотропина на ооцит-кумулюсные комплексы коров *in vitro* // Цитология.- 2005.- Т.47, №10.-С.882-887.
538. *Mansour R.T., Aboulghar M.A., Serour G.I., Abbass A.M.* Co-culture of human pronucleate oocytes with their cumulus cells // Hum. Reprod.- 1994.- Vol.9, №9.- P. 1727-1729.
539. *Anifandis G., Koutsellini E., Stefanidis I.* Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality // Reproduction.- 2005.-Vol.130, №6.-P.917-921.
540. *Khamsi F., Roberge S., Laccana I.* Effects of granulosa cells, cumulus cells, and oocyte density on *in vitro* fertilization in women // Endocrine.- 1999.- Vol.10, №2.- P. 161-166.
541. *Henman M., Catt J., Wood T. et al.* Elective transfer of single fresh blastocysts and later transfer of cryostored blastocysts reduces the twin pregnancy rate and can improve the *in vitro* fertilization live birth rate in younger women // Fertil Steril.- 2005.- Vol.84, №6.- P.1620-1627.
542. *Conway-Myers B.* Co-culture update: creating an embryotrophic environment *in vitro* // Semin. Reprod. Endocrinol.- 1998.- Vol.16, №3.- P.175-182.
543. *Locatelli Y., Cognie Y., Vallet J. et al.* Successful use of oviduct epithelial cell coculture for *in vitro* production of viable red deer (*Cervus elaphus*) embryos // Theriogenology.- 2005.- Vol.64, №8,- P. 1729-1739.
544. *Georgios A., Eleni K., Ioannis S.* Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality // Reproduction.- 2005.- Vol.130, №6.- P.917-921.
545. *Nottola S., Heyn R., Camboni A. et al.* Structural characteristics of human granulosa cells in a coculture system for *in*

- vitro* fertilization // Microsc Res Tech.- 2006.- Vol.69, №6.- P.508-16.
546. *Lai Y., Wang H., Lee C. et al.* Insulin-like growth factor-binding proteins produced by Vero cells, human oviductal cells and human endometrial cells, and the role of insulin-like growth factor-binding protein-3 in mouse embryo co-culture systems // Hum Reprod.- 1996.- Vol.11, №6.- P.1281-1286.
 547. *Esfandiari N., Falcone T., Goldberg J.* Effects of peritoneal fluid on preimplantation mouse embryo development and apoptosis *in vitro* // Reprod Biomed Online.- 2005.- Vol.11, №5.- P.615-169.
 548. *Терцу М.* Генетика и животная клетка.—М.: Мир, 1977.- 291с.
 549. *Fatehi F., Roelen B., Colenbrander B.* Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development // Zygote.- 2005.- Vol.13, №2.- P.177-185.
 550. *Андреева Л.Ф., Десницкий А.Г., Дондуа А.К.* Клеточное размножение и процессы дифференциации.- М.: Наука, 1983.- 248с.
 551. *Booth P., Humpherson P., Watson T.* Amino acid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development *in vitro* // Reproduction.- 2005.- Vol.130, №5.- P.655-668.
 552. *Humpherson P., Leese H., Sturmey R.* Amino acid metabolism of the porcine blastocyst // Theriogenology.- 2005.-Vol.64, №8.- P. 1852-1866.
 553. *Houghton F., Hawkhead J., Humpherson P. et al.* Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity // Hum Reprod.- 2002.- Vol.17, №4.- P.999-1005.

554. *Биология* клетки в культуре / Никольский Н.Н., Вахтин Ю.Б., Игнатова Т.Н. и др.-М.: Наука, 1984.-280с.
555. *Menezo Y., Testart J., Perrone D.* Serum is not necessary in human *in vitro* fertilization, early embryo culture, and transfer // *Fertil Steril.*- 1984.- Vol.42, №5.-P. 750-755.
556. *Вильянович Л.И., Кривохарченко А.С.* Культивирование двухклеточных эмбрионов мышей *in vitro* в среде ДМЕМ без белка // Пробл. репрод.- 1999.- Т.5, №4.- С.22-25.
557. *Сметанина И.Г., Татарина Л.В. Кривохарченко А.С.* Влияние состава культуральных сред на созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* // Онтогенез.-2000.- Т.31, №2.-С.139-143.
558. *Saito H., Ito M., Horikawa T. et al.* *In vitro* fertilization and embryo transfer // *Nippon Rinsho.*- 2006.- Vol.64, № 4.- P.122-126.
559. *Haggarty P., Wood M., Ferguson E. et al.* Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos // *Hum Reprod.*- 2006.- Vol.21, №3.- P.766-773.
560. *Hemmings R., Lachapelle M., Falcone T. et al.* Effect of follicular fluid supplementation on *in vitro* development of human pre-embryos // *Fertil.Steril.*- 1994.- Vol.62, №5.- P.1018-1021.
561. *Anifandis G., Koutselini E., Louridas K. et al.* Estradiol and leptin as conditional prognostic IVF markers // *Reproduction.*- 2005.- Vol.129, №4.- P.531-534.
562. *Beckett G., Hayes J.* Plasma glutathione – s – transferase in man // *J. Clin. Biochem.Nutr.*- 1987.- № 2.- P.1-24.
563. *Леонов Б.В.* Роль биологически активных соединений – серотонина, эстрадиола и простагландина $E_{2\alpha}$ в процессах раннего эмбриогенеза. Автореф. дис... докт. мед. наук. М., 1974.

564. *Dienhart M.K., Downs S.M.* Cyclic AMP reversal of hypoxanthine-arrested preimplantation mouse embryos is EDTA-dependent // *Zygote*.- 1996.- Vol.4, №2.- P.129-137.
565. *Rizos D., Lonergan P, Boland M. et al.* Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality // *Boil. Reprod.* – 2002.- Vol. 66, № 3.- P.589-595.
566. *Dugan K., Caballero-Campo P., Dominguez F et al.* Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation // *Mol Hum Reprod*.- 2002.- Vol.8, №4.- P.375-384.
567. *Spyropoulou I., Karamalegos C., Bolton V.* A prospective randomized study comparing the outcome of in-vitro fertilization and embryo transfer following culture of human embryos individually or in groups before embryo transfer on day 2 // *Hum Reprod*.- 1999.- Vol.14, №1.- P.76-79.
568. *Bongso A.* Blastocyst culture for deriving human embryonic stem cells // *Methods Mol Biol*.- 2006.-Vol.331.- P.13-22.