

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**



Методи кріобіології в репродуктивній медицині

Методичні рекомендації для самостійної роботи
аспірантів 2 курсу
галузь знань 09 Біологія
спеціальність 091 Біологія та біохімія
Дисципліна «Методи кріобіології в репродуктивній медицині»

Харків 2023

Рецензенти:

Юзько Олександр Михайлович – доктор медичних наук, професор; завідувач кафедри акушерства та гінекології закладу вищої освіти Буковинського державного медичного університету; Президент Української асоціації репродуктивної медицини.

Божок Галина Анатоліївна – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник; провідний науковий співробітник відділу кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

Затверджено до друку рішенням освітньо-наукової секції вченої ради Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 5 від 13.12.2023 р.)

Методи кріобіології в репродуктивній медицині: Методичні рекомендації для самостійної роботи аспірантів 2 курсу (галузь знань 09 Біологія, спеціальність 091 Біологія та біохімія) з дисципліни «Методи кріобіології в репродуктивній медицині» / Петрушко М.П./ [Електронний ресурс] – Х.: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 2023. – 32 с.

У методичних рекомендаціях розглядаються кріобіологічні методи, які знайшли своє застосування у допоміжних репродуктивних технологіях. Розглядаються підходи щодо кріоконсервування сперматозоїдів, ооцитів, передімплантаційних ембріонів, оваріальної та тестикулярної тканини. Особливу увагу приділено оцінці структурного та функціонального стану гамет та ембріонів людини перед та після кріоконсервування.

Для здобувачів вищої освіти на третьому освітньо-науковому рівні (доктор філософії).

ЗМІСТ

1. Розробка методів ДРТ: індукція суперовуляції, запліднення ооцитів, культивування ембріонів <i>in vitro</i> . R. Edwards та P. Steptoe – піонери ДРТ.	4
2. Історія ДРТ в Україні. Роль академіка НАН України В.І. Грищенка у розвитку ДРТ в Україні.	7
3. Роль кріобіологічних методів в підвищенні ефективності ДРТ.	9
4. Історія розробки способів кріоконсервування гамет та ембріонів людини.	10
5. Способи кріоконсервування сперматозоїдів людини.	12
6. Оцінка морфофункціональних характеристик сперматозоїдів людини перед та після кріоконсервування.	15
7. Способи кріоконсервування ооцитів людини.	17
8. Оцінка морфологічних характеристик ооцитів людини перед та після кріоконсервування	19
9. Методи кріоконсервування передімплантаційних ембріонів людини.	21
10. Роль морфологічних характеристик ембріонів у їх кріорезистентності.	23
11. Кріоконсервування тестикулярної та оваріальної тканини.	25
12. Генетичні аспекти збереження фертильності людини.	27
Контрольні питання	29
Література	30

1. Розробка методів ДРТ: індукція суперовуляції, запліднення ооцитів, культивування ембріонів *in vitro*. R. Edwards та P. Steptoe – піонери ДРТ

Прогрес наукових знань призвів до розробки та вдосконалення різноманітних репродуктивних технологій. На сьогодні до ДРТ відноситься:

Штучне запліднення (ШЗ) – є однією з форм репродуктивної технології, яке передбачає введення сперми в репродуктивний тракт жінки з метою подальшого запліднення. Перше зареєстроване використання ШЗ датується 18 століттям. На початку 20-го століття практика ШЗ поширилася на випадки чоловічого безпліддя.

Екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ) – репродуктивна технологія, яка передбачає аспірацію ооцитів з яєчників, їх запліднення та перенесення отриманих ембріонів до матки жінки.

Донорство гамет передбачає використання донорських яйцеклітин, сперми або ембріонів для допомоги у досягненні вагітності. Використання донорських гамет дозволяє людям з проблемами фертильності або генетичними розладами мати дітей, генетично пов'язаних з одним із батьків.

Сурогатне материнство: перенесення ембріона, створеного з гамет передбачуваних батьків або гамет донора, до матки сурогатної матері.

Передімплантаційна генетична діагностика (PGD) і скринінг (PGS): методи, щодо виявлення генетичних аномалій або хромосомних порушень у передімплантаційних ембріонах. Ці технології дозволяють парам, які мають ризик передачі генетичних розладів, мати здорових дітей шляхом вибору ембріонів з еуплоїдним набором хромосом.

Кріоконсервування: технологія, яка передбачає зберігання заморожених/вітрифікованих репродуктивних клітин, ембріонів та тканин за низьких температур з подальшим їх відігрівом та оцінкою морфофункціонального стану. Кріоконсервування підняло результативність репродуктивних технологій на високий рівень.

Першу спробу ЕКЗ яйцеклітин ссавців здійснив віденський ембріолог S. Schenky 1878 році. Працюючи з яйцеклітинами кроликів і морських свинок, S. Schenk зазначив, що він спостерігав поділ клітин після додавання сперми до яйцеклітин. У 1934 році Gr.Pincusi E. Енсман також спробували запліднення *in vitro* на кроликах. Вони стверджували, що зробили першу успішну вагітність за допомогою ЕКЗ, але пізніший аналіз їх дослідження показав, що технічно їх запліднення відбулося *in vivo*, а не *in vitro*. Вони імплантували яйцеклітини в матку кролиці лише через дванадцять годин, тобто до того, як яйцеклітини повністю дозріли, і запліднення, імовірно, відбулося всередині тіла.

Наступною віхою став 1951 рік, коли двоє вчених, які працювали незалежно один від одного, С. Russell в Австралії та Min-Soo Chang у Сполучених Штатах, продемонстрували, що сперматозоїди повинні пройти певні стадії дозрівання, перш ніж вони розвинуть здатність до запліднення. У 1959 році Chang зміг успішно використати ЕКЗ для запліднення кролиці.

Р. Steptoe – практикуючий гінеколог загальної лікарні Oldham, який використовував лапароскопію в гінекології, об'єднався з R. Edwards, професором репродукції людини в Кембриджському університеті, щоб спробувати досягти успішної вагітності у людей за допомогою ЕКЗ. Їхня співпраця почалася в 1968 році, коли R. Edwards відвідав лекцію Р. Steptoe про лапароскопію в Королівському медичному товаристві в Лондоні. Спочатку вони досягли успішного запліднення та клітинного поділу яйцеклітин *in vitro* зі свіжовилученою спермою, але не змогли успішно імплантувати запліднену яйцеклітину. У 1976 році R. Edwards і Р. Steptoe почали працювати з безплідною парою Brown. Під час успішної спроби R. Edwards і Р. Steptoe перенесли запліднену яйцеклітину в порожнину матки пацієнтки. 25 липня 1978 року народилася Louise Brown, перша у світі «дитина з пробірки».

Прошло більше 30 років після народження Louise Brown, коли R. Edwards був удостоєний Нобелівської премії в галузі фізіології «за розробку

технології штучного запліднення». На жаль, його друг колега, акушер-гінеколог Р. Steptoe помер, не доживши до цієї знаменної події.

За статистикою на 2023 рік з моменту народження Louise Brown понад 12 млн дітей з'явилися на світ завдяки методам ДРТ.

2. Історія ДРТ в Україні. Роль академіка НАН України В.І. Грищенка у розвитку ДРТ в Україні.

Організатором розвитку ДРТ в Україні став *Валентин Іванович Грищенко* – академік НАН України, завідувач кафедри акушерства та гінекології Харківського державного медичного університету, доктор медичних наук, професор. Він був одним із радників Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у справах Спеціальної програми репродукції людини, а з 1980 року – експертом ВООЗ. З 1983 по 2011 рр. він очолював Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України (ІПКіК НАН України).

Значних результатів у лікуванні безпліддя методом штучної інсемінації нативною та кріоконсервованою спермою донорів досягнув професор Ю. С. Паращук. Технологія штучного запліднення спермою донора є методом, який використовується в репродуктивній медицині для допомоги парам, що мають проблеми з натуральним зачаттям. Ю. С. Паращук вперше використав методи гіпотермічного зберігання та кріоконсервування для банкування сперми донорів. Учнями В.І. Грищенко було вивчено вплив низькоінтенсивного лазерного та ультразвукового випромінювання, постійного магнітного поля на морфофункціональні показники кріоконсервованих сперматозоїдів. Було доведено ефективність виділення рухомої фракції сперматозоїдів за використання цитохрому С, кріоконсервованої фолікулярної рідини, перфторану. За останнє десятиліття було розроблено ефективні протоколи заморожування-відігріву сперматозоїдів людини. Також визначено методичні й методологічні підходи до кріоконсервування чоловічих гамет.

Біля витоків української репродуктивної медицини разом із директором Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, академіком НАН України Валентином Івановичем Грищенком стояли: керівник лабораторії

кріоконсервування системи репродукції людини к.м.н., ст.н.с. Федір Власович Дахно; лікар-репродуктолог, к.м.н., ст.н.с. Володимир Іванович Піняєв та ембріолог-кріобіолог, к.б.н., ст.н.с. Наталія Несторівна Чуб (Рис. 1). 30 листопада 1984 р. цій команді вчених вперше в Україні успішно вдалося запліднити ооцит в умовах *in vitro* та побачити дроблення ембріона.



Рис. 1. Науковці ІПКіК НАН України, які вперше в Україні здійснили процедуру запліднення *in vitro* (академік НАН України В.І. Грищенко – крайній праворуч, к.б.н. В.І. Піняєв – у центрі, к.б.н. Н.Н. Чуб – за мікроскопом).

3. Роль кріобіологічних методів в підвищенні ефективності ДРТ

Кріобіологічні методи, які передбачають заморожування та зберігання біологічних зразків при наднизьких температурах, дозволяють довгостроково зберігати гамети, ембріони та оваріальну і тестикулярну тканини, відіграють вирішальну роль у підвищенні результативності ДРТ.

Так, використання сперми донорів дозволило мати дитину парам, в яких чоловік страждав на абсолютну форму непліддя. Кріоконсервування сперматозоїдів донора дозволило гарантувати використання біоматеріалу від здорових донорів, оскільки за 6 міс знаходження сперми у кріобанку, є можливість перевірити інфекційний та генетичний статус донора.

Крім того, кріоконсервування зразків донорської сперми дозволяє її зручно зберігати та забезпечує надходження у будь-який момент до ембріологічної лабораторії.

Це саме стосується і кріоконсервування ооцитів донорів.

Саме завдяки методу кріоконсервування ефективність програм з використанням донорського матеріалу збільшилася.

Кріоконсервування ембріонів значуще підвищило кумулятивну частоту настання вагітності. Раніше в порожнину матки переносили 1-3 ембріони, а решту – утилізували. Розробка ефективних методів кріоконсервування дозволила використовувати ембріони у наступних підготовлених циклах без індукції суперовуляції.

Кріоконсервування підвищило частоту настання вагітності, оскільки з'явилась можливість зробити PGD або PGS і гарантовано переносити в порожнину матки ембріон з еуплоїдним набором хромосом.

Кріоконсервування гамет, ембріонів, оваріальної та тестикулярної тканини, в рамках програми збереження фертильності у пацієнтів різних груп, дозволило дати надію тисячам людей на майбутнє батьківство.

4. Історія розробки способів кріоконсервування гамет та ембріонів людини

В 1677 році А. Levenhukі його помічник описали *animalculae* в спермі людини. Через 100 років у 1776 році Spallanzani зазначив, що сперматозоїд стає нерухомим, коли охолоджувався снігом. Spallanzani здійснив перше в світі штучне запліднення, використовуючи сперматозоїди, які були отримані безпосередньо зі статевих шляхів померлої собаки, що призвело до народження живого цуценя. 100 років потому, італійський учений Montegazza описав можливість створення кріобанків для військових, які відправляються на війну.

Між 1938 і 1945 роками багато вчених займалися заморожуванням сперматозоїдів.

У 1949 році було розроблено метод використання гліцерину, для захисту сперматозоїдів від пошкоджень під час заморожування. Метод було вдосконалено в 1953 році доктором D. Sherman.

В 1953 році була отримана перша вагітність після використання заморожених сперматозоїдів. Однак, оскільки американські суди в той час постановили, що запліднення жінок донорською спермою «суперечить державній політиці та доброму моралі», знадобилося ще одне За 10 років до оприлюднення звістки про народження дитини.

Історія кріоконсервування ооцитів людини розвивалася протягом кількох десятиліть. Перші спроби розпочалися у 1980-х роках та включали методи повільного заморожування з використанням звичайних кріопротекторів.

Перше повідомлення про успішне народження із кріоконсервованого ооцита відбулося на початку 80-х років (Trounson and Mohr, 1983; Zeilmaker et al., 1984).

У 1986 році Chen (1986) повідомив про першу вагітність, яка призвела до народження близнюків, після повільного заморожування/швидкого розморожування людських ооцитів за допомогою ДМСО.

Однак показники успіху були низькими через чутливість ооцитів до пошкоджень, викликаних утворенням кристалів льоду.

Запровадження вітрифікації з використанням високих концентрацій кріопротекторів у 1990-х і призвела до високого рівня виживання та життєздатності ооцитів після розморожування.

В даний час найбільш використовуваний протокол вітрифікації ооцитів М. Kuwayama. Після першої фази врівноваження (5-15 хв) у розчині кріопротектору, який містить 7,5% об./об. етиленгліколю та 7,5% об./об. ДМСО, ооцити переміщують у вітрифікаційний розчин, який складається з 15% об./об. етиленгліколю та 15% об./об. ДМСО із додаванням 0,5 моль/л сахарози. Після кількохсекундної інкубації у середовищі вітрифікації зразок переноситься на кріоносій та занурюється в рідкий азот при -196°C .

У 1972 році, DG. Whittingham, SP. Leibo, P. Mazur, застосовуючи повільне заморожування, здійснили кріоконсервування ембріона миші. У 1984 році на світ з'явилася Z. Leyland – перша дитина, яка народилася із замороженого ембріона.

Технології кріоконсервування гамет та ембріонів продовжують розвиватися, тривають дослідження, спрямовані на покращення розуміння біологічних процесів, які відбуваються в клітинах, оптимізацію протоколів і подальше підвищення життєздатності та генетичної стабільності клітин після розморожування.

5. Способи кріоконсервування сперматозоїдів людини

Кріоконсервування дозволяє зберігати чоловічі гамети за наднизьких температур для майбутнього використання в ДРТ.

Існує три основні методи заморожування: повільне, швидке та вітрифікація.

Усі методи характеризуються спільними етапами, які полягають у наступному:

1. Оцінка зразка перед кріоконсервуванням. Необхідно зробити спермограму за WHO та, зокрема, визначити кількість клітин в еякуляті, їх рухливість та морфологічні характеристики.
2. Виділення сперматозоїдів різними методами (цетрифугування в градієнті щільності, метод спливання «swim up» та ін.).
3. Додавання кріопротектора: до зразка додають кріозахисний розчин, який містить проникаючі та/або непроникаючі кріопротектори. Зазвичай використовують етиленгліколь, пропіленгліколь та гліцерин.
4. Вибір кріоносія та розміщення сперматозоїдів. В залежності від кількості сперматозоїдів у зразку та режиму охолодження підбирають кріоносій.
5. Процес заморожування/вітрифікації: охолодження зразка до наднизьких температур.
6. Зберігання: зразки зберігають у рідкому азоті при температурі нижче -150°C .
7. Розморожування: проводиться шляхом прямого переміщення зразка з рідкого азоту у водяну баню при температурі 40°C .
8. Видалення кріопротектору.
9. Оцінка життєздатності сперматозоїдів.

Повільне заморожування

Техніка повільного заморожування була запропонована J. Behrman і Y. Sawada і полягає в поступовому охолодженні сперматозоїдів протягом 2-4 год вручну або за допомогою автоматичного охолоджувача.

Ручний метод здійснюється шляхом поетапного додавання кріопротектора та одночасного зниження температури з поступовим зануренням зразків у рідкий азот. Оптимальна початкова швидкість охолодження зразка від кімнатної температури до 5°C становить 0,5–1°C/хв, потім зразок заморожують від 5 °C до –80 °C зі швидкістю 1–10 °C/хв. Після чого зразок занурюють у рідкий азот при –196°C.

З причин низької відтворюваності показників життєздатності клітин було запропоновано використання програмованих камер охолодження: від 20 °C до –80 °C зі швидкістю 1,5 °C/хв, а потім зі швидкістю 6 °C/хв; після завершення заморожування соломинки виймають і зберігають у рідкому азоті при –196°C.

Проте вважається, що повільне заморожування, як ручне, так і автоматичне, може викликати значні хіміко-фізичні пошкодження чоловічих гамет, ймовірно, через кристалізацію льоду.

Швидке заморожування

Швидке заморожування вперше було запропоновано D. Sherman. При цьому кріоносії витримують протягом 10 хв на відстані 15–20 см над рівнем рідкого азоту (–80°C), а потім занурюють у рідкий азот.

Недоліки, як і при повільному заморожуванні, полягають у низькій відтворюваності результатів кріоконсервування.

Кріоконсервування невеликої кількості сперматозоїдів методом вітрифікації

Повільний та швидкий методи кріоконсервування не є ефективними для кріоконсервування невеликої кількості сперматозоїдів, аспірованих із яєчка та придатка яєчка.

Вітрифікація використовується для кріоконсервування сперматозоїдів при надзвичайно низьких температурах без утворення кристалів льоду. Вітрифікація має кілька переваг перед традиційними методами – швидка процедура виконання та високі показники виживання клітин, внаслідок

відсутності утворення кристалів льоду, що допомагає підтримувати структурну цілісність і функціональну життєздатність сперматозоїдів.

Впровадження методів кріоконсервування сперматозоїдів людини зробило програми ДРТ зручними та гнучкими для пацієнтів. Це сприяло успішному збереженню фертильності, використанню донорської сперми та розширенню можливостей для пацієнтів при лікуванні безпліддя.

6. Оцінка морфофункціональних характеристик сперматозоїдів людини перед та після кріоконсервування

Збереження генетичного матеріалу чоловіків передбачає кріоконсервування цілісного еякуляту, виділену активнорухливу фракцію сперматозоїдів та чоловічих гамет, які можуть бути отримані за допомогою біопсії яєчка або придатка яєчка.

Структурні характеристики

Під час кріоконсервування структура сперматозоїдів може бути ушкоджена.

Морфологічну структуру сперматозоїдів оцінюють за критеріями, встановленими WHO. Сперматозоїд без морфологічних дефектів, визначається як нормальний. Усі відхилення від нормальної морфології – дефекти. Сперматозоїд вважається нормальним, якщо його голівка має рівний овальний контур із добре візуалізованою акросомою, яка займає 40–70% об'єму голівки. Шийка, середня частина, хвіст повинні бути без дефектів (Рис. 2).



Рис. 2. Сперматозоїди людини. Нативний препарат. DIC–контраст.

Фундаментальне значення при заплідненні як *in vivo*, так і *in vitro* має акросома, тому порушення її цілісності може серйозно погіршити функціональність клітини. Ультраструктурні зміни акросоми полягають у зморщуватості плазмолемі, втраті акросоми та утворення пухирців, ймовірно, через утворення кристалів льоду та/чи осмотичні зміни. Спонтанна акросомальна реакція може порушити запліднювальну здатність клітин. Морфологічні зміни хвостової частини можуть бути відповідальними за зниження рухливості сперматозоїдів. Вважається, що вони викликані осмотичними змінами під час кріоконсервування або неправильним розподілом/вмістом тубулінів, які є основним компонентом мікротрубочок.

Кріоконсервування знижує рухливість сперматозоїдів. Зменшення кінетичних характеристик може бути викликане змінням структури та функції мітохондрій. Порушення мітохондріальної мембрани можуть бути причиною зниження її мембранного потенціалу, що впливає на рухливість клітин.

Пошкодження ДНК

Окислювально-відновний дисбаланс може бути причиною пошкодження ДНК. Модифікації основи ДНК може індукувати надлишок ROS. Модифікації ДНК, можуть сприяти нестабільності генома та мутаціям. ROS також може змінити епігенетичний статус клітин.

Пошкодження мРНК, білків і метаболітів

Зрілі сперматозоїди вважаються мовчазними для транскрипції. Проте кріоконсервування може змінити велику кількість транскриптів, пов'язаних із функціями фертильності. мРНК сперматозоїдів мають некодуючі фрагменти РНК, регулюють посттранскрипційну експресію генів та грають визначальну роль у розвитку ембріонів.

Зміна протеомного профілю

Вважається, що кріоконсервування впливає на протеомний профіль сперматозоїдів. Виявлено 16 метаболітів, які різнилися у сперматозоїдах перед та після кріоконсервування.

7. Способи кріоконсервування ооцитів людини

Кріоконсервування ооцитів використовується як метод збереження фертильності та з метою подальшого використання в ДРТ.

Для отримання ооцитів необхідним є проведення основних етапів процедури ДРТ:

Контрольована гіперстимуляція яєчників.

Аспірація ооцитів: по досяжності зрілості яйцеклітин їх вилучають за допомогою незначної хірургічної процедури, яка називається трансвагінальною аспірацією.

Вилучення ооцитів із аспірату та морфологічний аналіз ооцит-корона-кумулюсних комплексів: проводиться ембріологом у стерильних умовах (ламінарна шафа). Вилучені ооцити переміщують у чашки Петрі з середовищем культивування, які розміщують у CO₂-інкубаторах. Денудацію ооцитів проводять для вивільнення ооцитів з оточуючих них клітин кумулюсу та гранульози.

Аналіз ступеню зрілості та морфологічний аналіз ооцитів після денудації. Проводиться для вибору тактики кріоконсервування та аналізу ефективності кріоконсервування.

Кріоконсервування ооцитів.

Використовуються два основні методи: повільне заморожування та вітрифікація.

Повільне заморожування передбачає поступове зниження температури ооцитів за допомогою охолоджувальної камери з контрольованою швидкістю.

Після експозиції в розчинах кріопротекторів ооцити переміщують на кріоносії. Під час повільного заморожування клітини спочатку охолоджують до температури від -5°C до -7°C , при якій відбувається врівноваження та сидінг. Потім ооцити охолоджуються з повільною швидкістю $0,3\text{--}0,5^{\circ}\text{C/хв}$

до досягнення температури від -30°C до -65°C , а потім занурюють у рідкий азот для зберігання при температурі -196°C .

Розморожування ооцитів: ооцити розморожують з урахуванням протоколу заморожування/вітрифікації та виду кріоносія. Якщо ооцити заморожували повільно, то при розморожуванні соломинки з ооцитами занурюють у водяну баню з температурою 37°C . Після зникнення твердої фази ооцити переносять у середовища з кріопротекторами, концентрація яких поступово знижується.

Вітрифікація передбачає швидке охолодження до низької температури без утворення кристалів льоду з використанням високих концентрацій проникаючих та непроникаючих кріопротекторів. Існує два протоколи вітрифікації: відкрита та закрита. Відкрита вітрифікація передбачає прямий контакт між ооцитами та рідким азотом, оскільки ооцити розміщують на носії відкритого типу: лопатки, капілярні піпетки, мідні пристрої, соломинки та петлі. Закрита вітрифікація передбачає непрямий контакт між ооцитами та рідким азотом, оскільки вони розміщуються у соломинках.

Якщо ооцити були вітрифіковані у відкритому носії типу CryoTech, то його занурюють у 1М розчин сахарози, після чого ооцити переносять у середовища з кріопротекторами, концентрація яких поступово знижується.

Після розморожування ооцити оцінюють на життєздатність та запліднюють за допомогою різних методів, таких як інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїда (ICSI), коли один сперматозоїд вводять безпосередньо в яйцеклітину. За останні роки кріоконсервування ооцитів людини досягло значного прогресу, оскільки результативність циклів лікування безпліддя з використанням кріоконсервованих ооцитів не менша, ніж при використанні свіжовиділених клітин. Це стало загальновизнаним і все більш популярним варіантом збереження фертильності, надаючи жінкам більшу репродуктивну автономію та розширюючи їхні можливості продовження роду.

8. Оцінка морфофункціональних характеристик ооцитів людини перед та після кріоконсервування

Ооцити є важкодоступними об'єктами кріоконсервування через деякі особливості їх будови: середній ізотонічний об'єм – $2,65 \times 10^6$ мкм³, низьке відношення площі поверхні до об'єму, низькі гідравлічна провідність та мембранна проникність до кріопротекторів.

Ооцити людини, які відрізняються за ступенем зрілості – мають різне значення проникності плазматичної мембрани, яке характеризує кріобіологічні параметри клітини.

Так, зріла яйцеклітина складається з ядра та цитоплазми, вона оточена ЗР і клітинами кумулюсу і гранульози (Рис. 3).



Рис. 3. Ооцит-корона-кумулюсний комплекс, отриманий після аспірації фолікула.

Незрілі ооцит-корона-кумулюсні комплекси, зазвичай, отримують із дрібних фолікулів (Рис. 4).

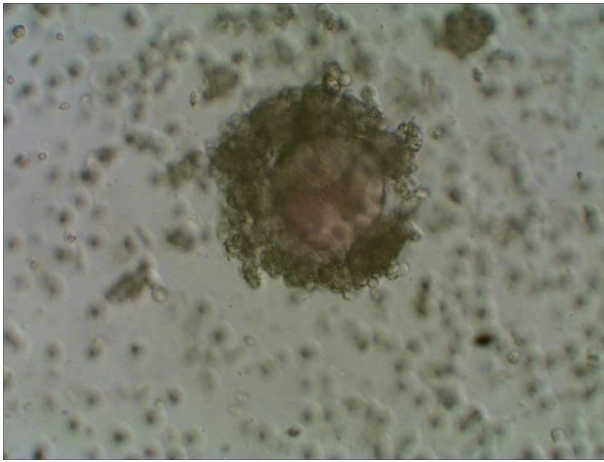


Рис. 4. Незрілий ооцит-корона-кумулясний комплекс. DIC-контраст.

В переважній більшості клінік репродуктивної медицини ооцити кріоконсервують на стадії метафази II, оскільки на сьогодні не розроблено оптимальних способів дозрівання *in vitro* незрілих ооцитів.

Ефективність протоколів кріоконсервування залежить від вихідних морфологічних характеристик ооцитів. Аномалії будови ооцитів розподіляються на інтра- та екстрацитоплазматичні. До перших відносяться розмір ооцита, зрілість ядра, наявність мейотичного веретена поділу, особливості цитоплазми: грануляція, вакуолізація, наявність гладкого ендоплазматичного ретикулуму, до других – структура першого полярного тіла, перивітелінового простору та прозорої оболонки. Саме ці характеристики виступають критерієм якості ооцитів та предикторами їх кріорезистентності.

9. Методи кріоконсервування передімплантаційних ембріонів людини

Кріоконсервування ембріонів людини використовується з метою зберігання надлишкових ембріонів, які були отримані в циклах лікування безпліддя методами ДРТ. Банкування ембріонів дозволяє зберегти ембріони, які не були перенесені в порожнину матки в стимульованому циклі, пропонуючи пацієнтам можливість використовувати їх у наступних циклах.

Основні методи кріоконсервування ембріонів людини – повільне заморожування та вітрифікація.

Повільне заморожування було першим успішним методом кріоконсервування ембріонів людини. Метод передбачає поступове охолодження ембріонів до мінусових температур за допомогою спеціального обладнання з контрольованою швидкістю.

Протоколи, засновані на методі повільного заморожування, включають стадію врівноваження, під час якої ембріони переміщують у розчини з низькими концентраціями (1,0–1,5 М) кріопротекторів. Після експозиції ембріони розміщують у кріоносії (ампули або соломки), які завантажують у заморожувач. Вирішальним етапом під час протоколу повільного заморожування є сидінг – ініціація кристалоутворення, яку можна проводити вручну або автоматично. Це відбувається при температурі від -5 до -7°C .

Після цього зразки охолоджують зі швидкістю з швидкістю $0,3\text{--}0,5^{\circ}\text{C/хв}$ до досягнення температури від -30°C до -65°C , після чого занурюють у рідкий азот.

Вітрифікація: під час вітрифікації ембріони швидко охолоджуються до надзвичайно низьких температур без утворення кристалів льоду. Розчини для заморожування, які зазвичай використовуються для вітрифікації, складаються з проникаючих (етиленгліколь, ДМСО, гліцерин, ацетамід, пропіленгліколь, з концентрацією понад 4 М) та непроникаючих (найчастіше сахарози, більше $0,5$ М) кріопротекторів. Ембріони завантажують у носій (кріосоломинку або кріопробірку) та безпосередньо занурюють у рідкий азот.

Кріоконсервовані ембріони зберігаються в резервуарах рідкого азоту при температурі нижче -150°C . Ембріони можна безпечно зберігати протягом тривалого періоду часу, починаючи від кількох місяців до кількох років, без значної втрати життєздатності.

Розморожування ембріонів здійснюється відповідно до протоколу заморожування (див. розморожування ооцитів), видаляють кріопротектори і оцінюють життєздатність. Життєздатні ембріони культивують *in vitro* та переносять у порожнину матки.

Кріоконсервування ембріонів зробило революцію в ДРТ, запропонувавши такі переваги, як збільшення кумулятивної частоти настання вагітності, підвищення гнучкості в циклах лікування безпліддя та зниження ризиків синдрому гіперстимуляції яєчників або багатоплідної вагітності, надало додаткові можливості щодо збереження фертильності та донорства ембріонів, сприяючи успіху та доступності ДРТ.

10. Роль морфологічних характеристик ембріонів у їх кріорезистентності.

Незважаючи на досягнення у розробці методів кріоконсервування ембріонів, відкритим залишається питання вибору оптимальної стадії їх розвитку для кріоконсервування. Більшість дослідників вважають, що заморожування ембріонів на стадії бластоцисти, порівняно з ембріонами 2-4 доби культивування, є найбільш раціональним, оскільки в умовах пролонгованого культивування *in vitro* можна визначити перспективні ембріони з точки зору їх кріотолерантності (рис. 5).

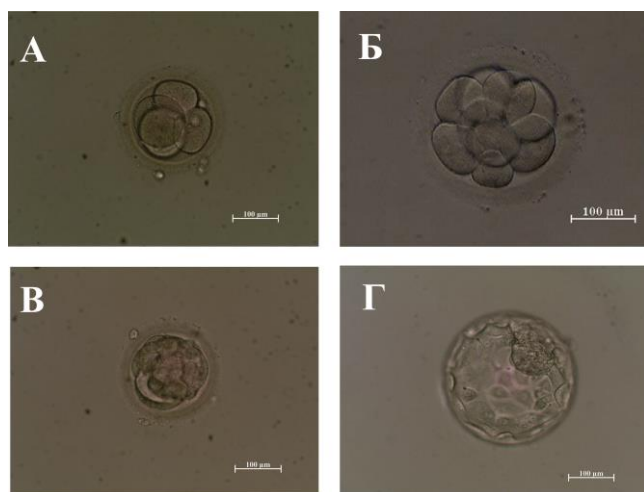


Рис. 5. Передімплантаційні ембріони людини: А – 4 бластомери; Б – 8 бластомерів, В – морула; Г – бластоциста. DIC-контраст.

Проте кріоконсервування бластоцисти є, водночас, складним завданням через її розмір і наявність бластоцеля (Рис.6).

Утворення кристалів льоду є, ймовірно, головним фактором, що впливає на виживання бластоцист, оскільки бластоцель містить велику кількість води. Щоб зменшити негативний вплив бластоцеля на рівень виживання, запропоновано проведення колапсування перед заморожуванням.

Кріорезистентність ембріонів залежить від їх індивідуальних морфологічних характеристик. Ембріони із затримкою розвитку, фрагментацію ділянок цитоплазми не використовують для банкування.

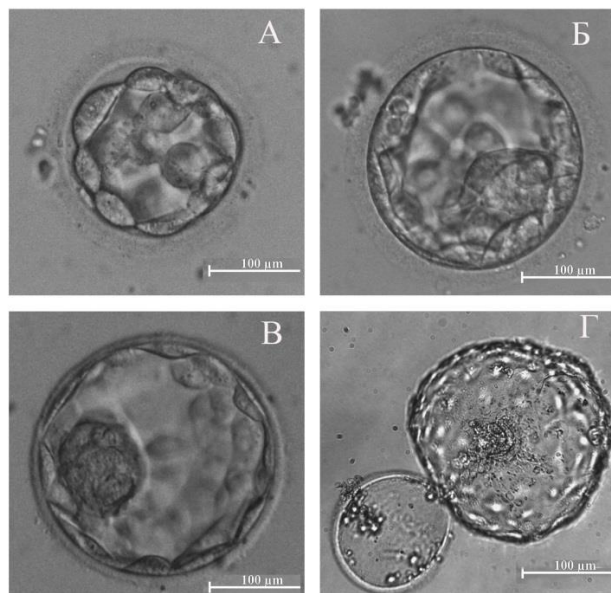


Рис. 6. Передімплантаційні ембріони людини на стадії бластоцисти: А – рання бластоциста; Б – бластоциста з 50% порожниною бластоцелю; В – розширена бластоциста; Г – початок вилуплення бластоцисти з *ZP*. DIC-контраст.

Так, надлишкові ембріони з морфологічними характеристиками, які відповідають варіантам норми, кріоконсервують на стадії дроблення (день 2 або 3) або на стадії бластоцисти (день 5 або 6).

Характеристики, які зазвичай використовуються для оцінки якості ембріонів на стадії дроблення перед та після розморожування, включають кількість бластомерів та симетричність їх розташування, наявність фрагментації цитоплазматичних ділянок та відновлення мітозу після культивування *in vitro*.

11. Кріоконсервування тестикулярної та оваріальної тканини

За останнє десятиліття підвищилася обізнаність пацієнтів/родини та лікарів щодо побічних ефектів медичного лікування хвороб різної етіології, які мають гонадотоксичний вплив, а також щодо можливостей збереження фертильності.

Кріоконсервування тканини яєчка є єдиним способом збереження фертильності у хлопчиків препубертатного віку. Хоча ця методика вважається експериментальною, оскільки процедури отримання зрілих сперматозоїдів з препубертатної тканини яєчка все ще знаходяться в стадії розробки, програми кріоконсервування тканини яєчка використовуються у клініках всього світу.

Протокол заморожування тканини зрілого яєчка складається з подрібнення тканини в чашці Петрі з дисоціацією клітин у середовищі G-MOPS-PLUS протягом 10 хв. До суспензії клітин додають розчин кріопротектору, після чого її переносять у соломинки високого рівня безпеки (CryoBioSystem, Франція). Соломини поміщають у програмовану камеру, яка знижує температуру від 20 до -150°C зі швидкістю $0,3\text{--}0,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, а потім переносять у рідкий азот для зберігання при -196°C .

Кріоконсервування тканини яєчника є важливою опцією тоді, коли для стимуляції яєчників недостатньо часу. Його використання можливе у дівчат до пубертатного віку з онкологічною патологією, для лікування якої використовують гонадотоксичні препарати.

Після оварієктомії кортикальний шар яєчника розрізають на фрагменти 5×5 мм та товщиною 1–2 мм, після чого їх розміщують у кріозахисному розчині. Для кріоконсервування використовують класичні кріопротектори: ДМСО, 1,2-ПД, ЕГ та гліцерин у різних комбінаціях та концентраціях. На сьогодні насичення оваріальної тканини кріозахисними розчинами нестандартизовано, воно триває 15 – 90 хв.

Кріоконсервування тканини яєчника може виконуватися за допомогою повільного заморожування або шляхом вітрифікації.

При повільному заморожуванні охолодження тканини починають від кімнатної температури зі швидкістю 2 град/хв до температури сидінгу (-7°C), потім – 0,3 град/хв до -30°C (або -50°C), далі переносять у рідкий азот. При вітрифікації оваріальну тканину насичують розчинами кріопротекторів у високій концентрації та переносять на відкриті носії, які занурюють безпосередньо у рідкий азот. Перед трансплантацією кріоконсервовану тканину розморожують

Для відновлення репродуктивної функції кріоконсервовану оваріальну тканину реімплантують орто- або гетеротопічно (під шкіру передпліччя або черевної стінки, під капсулу нирки).

12. Генетичні аспекти збереження фертильності людини

Прогрес у генетичних дослідженнях сприяє нашому розумінню методів збереження фертильності та генетичних факторів, які впливають на фертильність. Поточні дослідження допомагають визначити нові генетичні маркери, розробити вдосконалені методи генетичного тестування та покращити розуміння генетичних аспектів, пов'язаних зі збереженням фертильності та допоміжним відтворенням.

Морфофункціональні характеристики гамет та ембріонів, які, безумовно, є важливим показником їх збереження після заморожування-відігріву не дають повної інформації про можливі пошкодження ДНК, зміну рівня мРНК та транскрипційних факторів. Існують протиріччя щодо частоти пошкодження генетичного апарату в сперматозоїдах людини після кріоконсервування, зокрема стану ДНК (рис.7). Основною причиною пошкодження ДНК вважають окислювальний або оксидативний стрес, який виникає якщо утворення активних форм кисню (АФК) перевищує швидкість їх руйнування численними антиоксидантами та ферментативними системами.

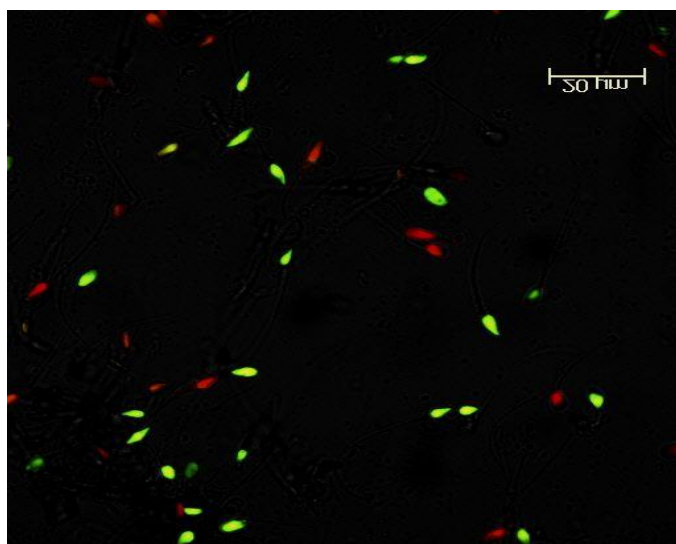


Рис. 7. Сперматозоїди людини з фрагментацією ДНК. Забарвлення акридин-помаранчевим. Флуоресцентна мікроскопія. А – сперматозоїд із нормальною ДНК, Б – сперматозоїд із пошкодженою ДНК.

Вплив кріоконсервування на геном ооцита визначається шляхом урахування частоти хромосомних аберацій, ступеню фрагментації ДНК, метилювання та рівня експресії генів. Зниження частоти настання вагітності при використанні кріоконсервованих ооцитів МП людини можуть бути пояснені змінами профілю експресії генів, які задіяні у підтримці хромосомної структури (KIF2C і KIF3A) та регуляції клітинного циклу (CHEK2 і CDKN1B).

Показано, що експресія генів білка теплового шоку (Hsp 70); окислювального (MnSOD і CuSOD) і холодового стресу (CirpB, Rbm3); зупинки клітинного циклу (Trp53), апоптозу (Bax, Bcl2 і p53) після впливу факторів кріоконсервування в ембріонах людини не змінюється.

Важливо відзначити, що генетичні аспекти збереження фертильності дуже індивідуальні та залежать від конкретних обставин, генетичних ризиків і особистого вибору. Консультації з медичними працівниками, зокрема генетичними консультантами та фахівцями з фертильності, можуть надати індивідуальні рекомендації з приводу генетичних ризиків при збереженні фертильності шляхом кріоконсервування.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Основні історичні віхи розвитку кріотехнологій.
2. Роль В.І. Грищенка у розвитку ДРТ в Україні.
3. Підвищення ефективності ДРТ шляхом застосування кріотехнологій.
4. Кріоконсервування сперматозоїдів людини: методи, кріопротектори, обладнання.
5. Які характеристики сперматозоїдів необхідно визначати перед та після кріоконсервування.
6. Способи кріоконсервування ооцитів людини.
7. Переваги вітрифікації ооцитів, порівняно з повільним методом кріоконсервування.
8. Які морфологічні характеристик ооцитів людини важливо аналізувати перед та після кріоконсервування
9. Методи кріоконсервування передімплантаційних ембріонів людини.
10. Важливість морфологічних характеристик ембріонів у їх кріорезистентності.
11. Показання щодо кріоконсервування тестикулярної та оваріальної тканини.
12. Пошкодження ДНК гамет після кріоконсервування.

ЛІТЕРАТУРА

Основна література

1. Гольцев АМ, Петрушко МП, Піняєв ВІ. Кріоконсервування гамет та ембріонів: життя до запитання. Київ, 2020, Наукова думка, 8 інф.-обл. аркушів, 112с.
2. Buderatska N, Gontar J, Petrushko M, Yurchuk T, Ilyin I, Piniayev V, Fuller B. Embryological characteristics and preimplantation genetic testing for aneuploidy of embryos derived from cryopreserved oocytes of women of different reproductiv eages. Biopreserv Biobank. 2022. doi: 10.1089/bio.2022.0055.
3. Buderatska N, Gontar J, Ilyin I, Lavrinenko S, Petrushko M, Yurchuk T. Does human oocyte cryopreservation affect equally on embryo chromosome aneuploidy? Cryobiology. 2020;93:33-36.
4. Dolmans MM, Donnez J. Fertility preservation in women for medical and social reasons: Oocytes vs ovarian tissue. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2021 Jan;70:63-80.
1. Donnez J, Kim S. Principles and Practice of Fertility preservation. Cambridge University Press, 2011. 507 p.
5. Petrushko M, Yurchuk T. Use of biological and synthetic polymers for human spermatozoa cryopreservation. CryoLetters 2022. 43(4):222–226.
6. Petrushko M, Piniayev V, Yurchuk T, The history of assisted reproductive technologies: from prohibition to recognition. History of science and technology. 2021;11(2).
7. Petrushko M, Yurchuk T, Todorov P, Hristova E, Piniayev V, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P, Isachenko V. New method for cryoprotectant-freefreezing of human oligoasthenoteratozoospermic spermatozoa with high-molecular polymer. Cryobiology. 2021 Dec;103:39-44.;
8. Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. State of the art in assisted reproductive technologies for patients with advanced maternal age. Zygote. 2023 Apr;31(2):149-156. doi: 10.1017/S0967199422000624. Epub 2023 Feb 22.
9. Yurchuk T, Petrushko M, Gapon A, Piniayev V, Kuleshova L. The impact of cryopreservation on the morphology of spermatozoa in men with oligoasthenoteratozoospermia. Cryobiology. 2021;S0011-2240(21)00059-6.
10. Yurchuk T. Cryopreservation of Immature Oocytes at Germinal Vesicle Stage. When Gamete Maturation Performance Seems to Be Most Appropriate? Probl. Cryobiol. Cryomed. 2021;31(2):161–167.
11. Yurchuk T, Petrushko M, Gapon A, Piniayev V, Kuleshova L. The impact of cryopreservation on the morphology of spermatozoa in men with oligoasthenoteratozoospermia. Cryobiology. 2021;S0011-2240(21)00059-6.

Допоміжна література

1. Diakiw SM, Hall JMM, VerMilyea MD, Amin J. e tal. Development of anartificial intelligence model for predicting the likelihood of human embryo

euploidy based on blastocyst images from multiple imaging systems during IVF. *Hum Reprod.* 2022 Jul 30;37(8):1746-1759.

2. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and Sterility.* 2011; 96(2):277–85.

3. Cobo A, Meseguer M, Remohí J, et al. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod.* 2010 ;25(9):2239–46.

4. Benjamin P. Best cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research.* 2015;18(5):422–36.

5. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology.* 2007; 67(1):73–80.

7. Rienzi L, Romano S, Albricci L, et al. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod.* 2010; 25(1):66–73

8. Paoli D, Lombardo F, Lenzi A, et al. Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 791:137–50.

9. Shapira M, Raanani H, Meirow D. IVF for fertility preservation in breast cancer patients-efficacy and safety issues. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32(8):1171–8.

10. Yurchuk TO, Pavlovich OV, Gapon GO, Pugovkin AY, Petrushko MP. Lipid peroxidation and DNA fragmentation in fresh and cryopreserved spermatozoa of men with different spermatogenesis state *Ukr. Biochem. J.* 2021;93,3, 24–29.

Петрушко М.П.

Методи кріобіології в репродуктивній медицині

Методичні рекомендації для самостійної роботи

аспірантів 2 курсу

галузь знань 09 Біологія

спеціальність 091 Біологія та біохімія

Дисципліна «Методи кріобіології в репродуктивній медицині»

Електронний ресурс. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 2023.