

УДК 618.177-089.888.11

^{1,2}Будерацька Н. О., ¹Гонтар Ю. В., ¹Ільїн І. Є., ²Петрушко М. П., ¹Лавриненко С. В.

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ТА ЛОКАЛІЗАЦІЇ МЕЙОТИЧНОГО ВЕРЕТЕНА В ООЦИТАХ ЛЮДИНИ ДО ТА ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

¹Медичний центр «ІГР», м. Київ

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

nataly_igr@ukr.net

Мета роботи – визначення впливу кріоконсервування методом вітрифікації на морфологію та локалізацію веретена другого поділу мейозу ооцитів людини. Для досягнення поставленої мети була розроблена класифікація морфологічних форм мейотичного веретена та його розташування по відношенню до першого полярного тіла. Експериментальне дослідження було виконано на 84 донорських ооцитах жінок, що приймали участь у програмах лікування безпліддя методами ДРТ. Вивчали структуру та локалізацію мейотичного веретена в нативних та кріоконсервованих ооцитах людини за допомогою поляризаційної системи Oosight (Hamilton Thorne, США). Після кріоконсервування життєздатними виявилось 95,2% яйцеклітин. Результати нашого дослідження показали, що 77% ооцитів після кріоконсервування зберігають морфологічні характеристики веретена поділу. Було виявлено, що фактори кріоконсервування можуть призводити до зміни мейотичного веретена та його руйнації. Вперше продемонстровано, що фактори кріоконсервування можуть індукувати передчасну активацію ооцитів, що може мати несприятливі наслідки для якості ембріонів.

Ключові слова: кріоконсервування; вітрифікація; ооцити; мейотичне веретено.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом НДР «Вивчення впливу факторів кріоконсервування при вітрифікації на морфофункціональні характеристики репродуктивних клітин та ембріонів», № держ. реєстрації III-4,2.2.6.108.

Вступ. Вітрифікація ооцитів – найбільш ефективна технологія збереження жіночих гамет, яка

дозволяє уникнути багатьох юридичних, етичних та медичних проблем, на відміну від кріоконсервування ембріонів [1]. Успішна вітрифікація жіночих гамет відкриває нові перспективи у циклах лікування безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [2, 3, 4].

Облік тільки морфологічних параметрів ооцита є недостатнім, щоб спрогнозувати якість та імплантаційний потенціал ембріона. Наявність першого полярного тіла не завжди являється критерієм зрілості яйцеклітини. За допомогою поляризаційного мікроскопу, візуалізуючи наявність веретена другого поділу мейозу, можна стверджувати, що ооцит знаходиться на стадії метафази II [5, 6].

Проте, в науковій літературі відсутня класифікація морфологічних характеристик та локалізації веретена поділу, яка б дозволила використовувати їх як предиктор кріорезистентності ооцитів та якості отриманих з них ембріонів. Адже порушення мейотичного веретена метафази II можуть, привести до аномальної сегрегації хромосом після запліднення кріоконсервованих ооцитів, а це, в свою чергу, до анеуплоїдії ембріонів.

Мета роботи – визначення впливу кріоконсервування методом вітрифікації на морфологію та локалізацію веретена другого поділу мейозу ооцитів людини. Для досягнення поставленої мети була розроблена класифікація морфологічних форм мейотичного веретена ооцита та його розташування по відношенню до першого полярного тіла.

Матеріали та методи дослідження. Усі маніпуляції з гаметами та ембріонами проводили відповідно до Європейського протоколу з захисту ембріонів [12]. Дослідження проводили на базі ТОВ «Медичний центр ІГР» в 2016р. Експериментальне

дослідження було виконано на 84 донорських ооцитах. Середній вік донорів жіночих гамет склав $27,7 \pm 3,35$ р. Ооцити отримували під час пункції фолікулів в циклах ДРТ. Після денудації, яйцеклітини перевіряли на наявність мейотичного веретена за допомогою поляризаційної системи Oosight (Hamilton Thorne, США). Ооцити культивували в чашках зі скляним дном (FluoroDish, World Precision Instruments, Китай), що містили 15 мкл культурального середовища Global (LifeGlobal, США) з додаванням 10% людського альбуміну (LifeGlobal, США), вкритого мінеральною олією (LifeGlobal, США).

Для попередження деполімеризації веретена, в чашку розміщували не більше 3-х ооцитів. Візуалізацію мейотичного веретена проводили на термостойку (TokaiHit, Японія) з підігрівом 37°C . Температура в ембріологічній лабораторії була не нижчою за 28°C . При візуальному аналізі оцінювали наявність мейотичного веретена, його морфологію

та орієнтацію осі веретена відповідно до полярного тіла.

Нами були розроблені наступні критерії оцінки морфологічних варіантів веретена поділу (рис. 1):

- A – компактне, ромбоподібне, з чіткими краями;
- B – змінена форма, розмиті краї;
- C – слабка візуалізація;
- D – візуалізація на межі полярного тіла і цитоплазми (телофаза I);
- E – не візуалізується;
- F – зміна орієнтації осі веретена відповідно до полярного тіла;
- G – збільшене в розмірі.

Кут розміщення веретена поділу відносно полярного тіла був наступним (рис. 2):

- a – $0-20^\circ$;
- b – $21-45^\circ$;
- c – $46-90^\circ$;
- d – $91-180^\circ$.

Вітрифікація ооцитів виконувалась через 2–3 год після трансвагінальної пункції фолікулів. Для вітрифікації використовували криотоп метод [13, 14].

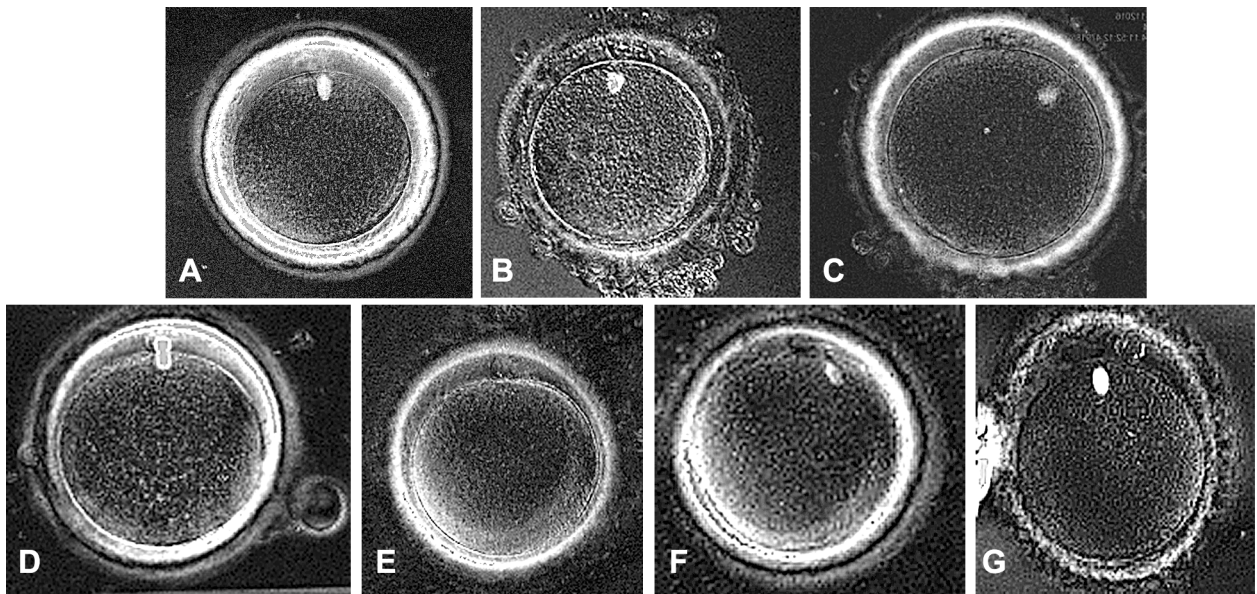


Рис. 1. Морфологічні варіанти мейотичного веретена:

- A – компактне, ромбоподібне, з чіткими краями; B – змінена форма, розмиті краї; C – слабка візуалізація;
- D – візуалізація на границі полярного тіла і цитоплазми (телофаза I); E – не візуалізується;
- F – зміна орієнтації осі веретена відповідно до полярного тіла; G – збільшене в розмірі. DIC контраст; $\times 400$.

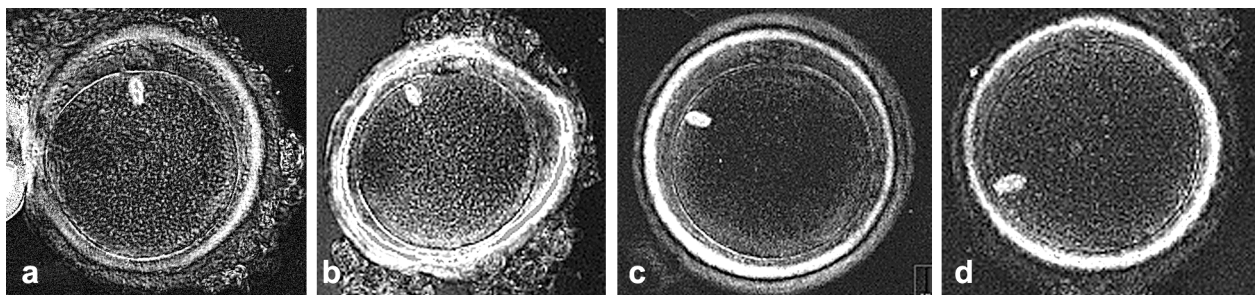


Рис. 2. Варіанти розміщення веретена поділу відносно полярного тіла:

- a – $0-20^\circ$; b – $21-45^\circ$; c – $46-90^\circ$; d – $91-180^\circ$. DIC контраст; $\times 400$.

Експозицію ооцитів проводили в 300 мкл розчину 7,5% етіленгліколю (ЕГ) + 7,5% диметилсульфоксиду (ДМСО) у TCM199 середовищі з додаванням 20% синтетичного замінювача сироватки (SSS) при кімнатній температурі протягом 12–15 хв. Тривалість експозиції ооцита в розчинах кріопротекторів залежала від його властивості відновлювати початкову форму. Після еквілібрації ооцити занурювали в розчин для вітрифікації, який вміщував 15% EG + 15% ДМСО + 0,5М сахарози. Через 60 сек ооцити переносили на носій Criotec (Cryotech, Японія) з мінімальною кількістю рідини і занурювали в рідкий азот.

При розморожуванні, носій з ооцитами перенесли в попередньо нагрітий до 37°C, розчин 1,0 М сахарози в TCM199 середовищі + 20% SSS. Через 1 хв ооцити опускали на дно лунки з розчином 0,5 М сахарози в середовищі TCM199 з 20% SSS при кімнатній температурі протягом 3 хв.

Після цього, ооцити переносили в розчин TCM199 з 20% SSS на 5 хв при кімнатній температурі з наступним культивуванням у культуральному середовищі до запліднення. Всі жіночі гамети розміщали у кількості по одному під відповідними номерами у чашках Oosafe діаметром 60 мм (SparMed, Denmark). Через 2 год після культивування оцінювали локалізацію та морфологію мейотичного веретена. Ооцити до та після кріоконсервування аналізували на наявність веретена першого мейотичного поділу, з урахуванням розроблених нами критеріїв.

Статистичні гіпотези перевіряли за допомогою критеріїв t, χ^2 при рівнях значимості $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Після кріоконсервування 84 ооцитів життєздатними виявилися 95,2% (n=80). Серед них – з наявним веретеном поділу – 38 ооцити, які мали чітко веретено категорії А; 22 ооцити – категорії В, 18 ооцитів – зі слабкою візуалізацією та 6 ооцитів мали веретено, збільшене у розмірі. Ооцити, що були віднесені до інших типів, а саме, з відсутнім веретеном поділу, на стадії телофази або зі зміною орієнтації веретена відносно полярного тіла, не кріоконсервували.

Оцінка морфології веретена поділу дозволила встановити, що у свіжовиділених ооцитах 45,2% (n=38) клітин мали компакте веретено, проте після кріоконсервування кількість таких ооцитів зменшилася до 28,6% (n=24). Дана розбіжність є статистично значимою при рівні достовірності $p < 0,025$. Зменшення кількості ооцитів з веретеном категорії А відбувалось за рахунок змін у структурі веретена, характеристики якого стали відповідати іншим категоріям, а саме, змін зазнали 20 ооцитів

(23,8%). Так, після кріоконсервування, у 7,1% випадків з'явилися ооцити категорії Е (n=6), де веретено не було візуалізовано, що може свідчити про його пошкодження. Були виявлені яйцеклітини з веретеном категорії D – на стадії телофази, які становили 9,5% (n=8), що свідчить про передчасну активацію яйцеклітини (до введення сперматозоїда у жіночу гамету (табл. 1)).

Таблиця 1 – Розподіл морфологічних варіантів веретена поділу в ооцитах людини до та після кріоконсервування

Морфологічні критерії	Нативні		Кріоконсервовані	
	абс.ч.	%	абс.ч.	%
A	38	45,24	24	28,57*
B	22	26,19	16	19,05
C	18	21,45	18	21,43
D	–	–	8	9,52*
E	–	–	6	7,14*
F	–	–	3	3,57*
G	6	7,14	9	10,71

Примітка: * – відмінність значуща у порівнянні з нативними ооцитами, $p < 0,05$.

Нативні та кріоконсервовані гамети оцінювали за розташуванням веретена поділу по відношенню до першого полярного тіла. Ооцити категорії **a** – становили 40,5% (n=34), **b** – були виявлені у 29,8% (n=25), категорія **c** складала 23,8% (n=20), категорія **d** – 5,9% (n=5) (табл. 2).

Таблиця 2 – Розподіл варіантів локалізації веретена поділу в ооцитах людини до та після кріоконсервування

Критерії оцінювання веретена поділу за локалізацією	Нативні		Кріоконсервовані	
	абс.ч.	%	абс.ч.	%
a	34	40,48	18	21,43
b	25	29,76	22	26,19
c	20	23,81	22	26,16
d	5	5,95	8	9,52
Веретено поділу не візуалізується або телофаза	–	–	14	16,67

Примітка: * – відмінність значуща у порівнянні з нативними ооцитами, $p < 0,05$.

Після кріоконсервування були виявлені зміни локалізації веретена у 19 клітин (22,6%). Значущо зменшилась кількість ооцитів з веретеном категорії **a** – з 40,5% (n=34) до 21,4% (n=18) ($p < 0,005$). При цьому фактори кріоконсервування не вплинули на локалізацію веретена категорій b, c, d.

Нами вперше були розроблені критерії морфологічних особливостей та локалізації мейотичного веретена поділу ооцитів людини. Попередня спроба Rama R. з співавт була заснована на вимірюванні довжини та ширини мейотичного веретена, оскільки ці показники мають позитивну прогностичну цінність щодо ембріонального розвитку [15].

В роботі Rienzi L. проведено аналіз стану веретена поділу до і після кріоконсервування ооцитів, проте відсутня класифікація структури веретена та місця його локалізації. В роботі робиться висновок про те, що фактори кріоконсервування призводять до руйнації мейотичного веретена з можливістю його відновлення після інкубації при 37 °С в культуральному середовищі [16].

В нашому дослідженні також було виявлено, що фактори кріоконсервування можуть призводити до зміни морфологічних характеристик веретена поділу та його руйнації.

Проте, нами вперше продемонстровано, що фактори кріоконсервування можуть індукувати передчасну активацію ооцитів, що може мати несприятливі наслідки для якості ембріона.

Веретено поділу в ооцитах людини, як було показано раніше, є дуже чутливим до різних факторів кріоконсервування [17]. Було показано, що знаходження ооцитів протягом 10-хв при кімнатній температурі призводить до руйнації мейотичного веретена і обмежену можливість відновлювання при фізіологічній температурі [18].

Wang з співавт, повідомили про вплив охолодження на структуру веретена поділу ооцитів людини за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі. Автори пропонують звести до мінімуму експозицію клітин в розчинах кріопротекторів, які викликають дегідратацію клітин, що, імовірно, спричиняє порушення веретена [19].

Ембріони, які отримані з ооцитів з чіткою візуалізацією веретена поділу, краще запліднюються, розвиваються та імплантуються, в порівнянні з яйцеклітинами, в яких веретено не візуалізується [7, 8, 9]. Розташування мейотичного веретена по відношенню до першого полярного тіла також корелює з рівнем запліднення, дробленням ембріона,

та його якістю [10]. Морфологія веретена ооцита також має взаємозв'язок з еуплоїдністю ембріона. Відповідно до світових даних, з яйцеклітин, в яких візуалізується чітке, правильної форми веретено, отримують більше еуплоїдних ембріонів, в порівнянні з ооцитами, в яких веретено візуалізується слабо або взагалі відсутнє [11].

Висновки з дослідження і перспективи подальших досліджень у цьому напрямку. Результати нашого дослідження показали, що 77 % ооцитів після кріоконсервування зберігають морфологічні характеристики веретена поділу. В нашому дослідженні було виявлено, що фактори кріоконсервування можуть призводити до зміни морфологічних характеристик мейотичного веретена та його руйнації. Вперше продемонстровано, що фактори кріоконсервування індукують передчасну активацію ооцитів, що може мати несприятливі наслідки для якості ембріона.

Тому, оцінювання мейотичного веретена до кріоконсервування є важливим критерієм як відбору ооцитів, так і прогнозу їх якості у подальшому. Це відкриває нові можливості для жінок репродуктивного віку зі збереженням своїх статевих клітин та використання їх для запліднення у найоптимальніший період свого життя. Представлений підхід з оцінювання структури та локалізації веретена поділу жіночих гамет є допоміжним методом відбору при створенні банку донорських ооцитів. Застосування оцінки мейотичного веретена має перспективи не тільки для використання у програмах донації ооцитів, але й у новому напрямку ДРТ, а саме при донації цитоплазми ооцита. Одним із методів вказаної технології є перенос веретена поділу, що візуалізується у поляризованому світлі, з ооцита пацієнтки до донорської яйцеклітини, з якої попередньо аспіровано генетичний матеріал. Перевагою цього методу є відсутність синхронізації циклів «донор-реципієнт», що дозволяє скоротити час на виконання маніпуляцій, раціонально використовувати витратні матеріали та надати можливість пацієнтам мати біологічно рідну дитину («дитина від трьох батьків») та запобігти виникненню мітохондріальних захворювань.

Література

1. Бударецька Н. О. Ооцити як альтернатива ембріонам при кріоконсервуванні для використання у допоміжних репродуктивних технологіях / Н. О. Бударецька, М. П. Петрушко // Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2016. – Т. 26 (4). – С. 375–382.
2. Cobo A. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method / A. Cobo, M. Kuwayama, S. Perez [et al.] // Fertil. Steril. – 2008. – Vol. 89. – P. 1657–1664.
3. Cobo A. Use of Cryobanked Oocytes in an Ovum Donation Program: A Prospective, Randomized, Controlled Clinical Trial / A. Cobo, M. Meseguer, J. Remohí, A. Pellicer // Obstetrical&Gynecological Survey. – 2010. – Vol. 65. – P. 775–777.

4. Cooke S. Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development / S. Cooke, J. Tyler, G. Driscoll // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 18. – P. 2397–2405.
5. Fang C. Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in in vitro and in vivo matured human oocytes / C. Fang, M. Tang, T. Li [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2007. – Vol. 24. – P. 547–551.
6. Hyslop L. A. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease / L. A. Hyslop, P. Blakeley, L. Craven [et al.] // *Nature.* – 2016. – Vol. 534. – P. 383–386.
7. Konc J. Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with Polscope / J. Konc, R. Kanyó, S. Cseh // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2004. – Vol. 21. – P. 349–353.
8. Kuwayama M. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes / M. Kuwayama, G. Vajta, O. Kato, S. P. Leibo // *Reprod. Biomed. Online.* – 2005. – Vol. 11(3). – P. 300–308.
9. Larman M. G. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes / M. G. Larman, M. G. Minasi, L. Rienzi, D. K. Gardner // *Reprod. Biomed. Online.* – 2007. – Vol. 15(6). – P. 692–700.
10. Tilia L. Is oocyte meiotic spindle morphology associated with embryo ploidy? A prospective cohort study / L. Tilia, C. Venetis, S. Kilani [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2016. – Vol. 105 (4). – P. 1085–1092.
11. Madaschi C. Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation / C. Madaschi, T. Souza Bonetti, D. Almeida Ferreira Braga [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol. 90. – P. 194–198.
12. Moon J. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI / J. Moon, C. Hyun, S. Lee [et al.] // *Human Reprod.* – 2003. – Vol. 18. – P. 817–820.
13. Mitochondrial Replacement Techniques Ethical, Social, and Policy Considerations / Editors : Anne Clai-borne, Rebecca English, and Jeffrey Kahn. – National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine : National Academies Press, 2016. – Available from : <https://www.nap.edu/read/21871/chapter/1>.
14. Protocol on Embryo Protection A Working Party of the 24th Meeting of the Steering Committee on Bioethics of the Council of Europe. Report. – Strasbourg, 2003. – 44 p.
15. Rama Raju G. A. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging / G. A. Rama Raju, G. J. Prakash, K. M. Krishna, K. Madan // *Reprod. Biomed. Online.* – 2007. – Vol. 14 (2). – P. 166–174.
16. Rienzi L. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures / L. Rienzi, F. Martinez, F. Ubaldi // *Hum. Reprod.* – 2004. – Vol. 19 (3). – P. 655–659.
17. Sathananthan A. H. The effects of cooling human oocytes / A. H. Sathananthan, A. Trounson, L. Freemann, T. Brady // *Hum. Reprod.* – 1988. – Vol. 3. – P. 968–977.
18. Pickering S. J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte / S. J. Pickering, P. R. Braude, M. H. Johnson [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1990. – Vol. 54. – P. 102–108.
19. Wang W.H. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy / W. H. Wang, L. Meng, R. J. Hackett [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2001. – Vol. 16. – P. 2374–2378.

References

1. Buderats'ka NO, Petrushko MP. Otsiti yak al'ternativa yembrionam pri kriokonservuvanni dlya vikoristannya u dopomizhnikh reproduktyvnykh tekhnologiyakh. *Problemi kriobiologii i kriomeditsini.* 2016;26(4):375–82.
2. Cobo A, Kuwayama M, Perez S, et al. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop metod. *FertilSteril.* 2008;89:1657–64.
3. Cobo A, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A. Use of Cryobanked Oocytes in an Ovum Donation Program: A Prospective, Randomized, Controlled Clinical Trial. *Obstetrical&Gynecological Survey.* 2010;65:775–7.
4. Cooke S, Tyler J, Driscoll G. Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod.* 2003;8:2397–405.
5. Fang C, Tang M, Li T, Peng WL, Zhou CQ, Zhuang GL, Leong M. Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in in vitro and in vivo matured human oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24:547–51.
6. Hyslop LA, Blakeley P, Craven L, Richardson J, Fogarty NM, Fragouli E, Zhang Q, et al. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. *Nature.* 2016;534:383–6.
7. Konc J, Kanyó R, Cseh S. () Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with Polscope. *J Assist Reprod Genet.* 2004;21:349–53.
8. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2005;11(3):300–8.
9. Larman MG, Minasi MG, Rienzi L, Gardner DK. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2007;15(6):692–700.
10. Tilia L, Venetis C, Kilani S, Cooke S, Chapman M. Is oocyte meiotic spindle morphology associated with embryo ploidy? A prospective cohort study. *Fertil Steril.* 2016;105(4):1085–92.

11. Madaschi C, Souza Bonetti T, Almeida Ferreira Braga D, Pasqualotto F, Iaconelli A, Borge E. Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. *FertilSteril*. 2008;90:194–8.
12. Moon J, Hyun C, Lee S, Son W, Yoon S, Lim J. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Human Reprod*. 2003;18:817–20.
13. Mitochondrial Replacement Techniques Ethical, Social, and Policy Considerations. Editors: Anne Claiborne, Rebecca English, and Jeffrey Kahn. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine: National Academies Press; 2016. Available from: <https://www.nap.edu/read/21871/chapter/1>.
14. Protocol on Embryo Protection A Working Party of the 24th Meeting of the Steering Committee on Bioethics of the Council of Europe. Report. Strasbourg; 2003. 44p.
15. Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(2):166–74.
16. Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J, Greco E. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod*. 2004;19(3):655–9.
17. Sathananthan AH, Trounson A, Freemann L and Brady T. The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod*. 1988;3:968–77.
18. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A and Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *FertilSteril*. 1990;54:102–8.
19. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R and Keefe DL. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Hum Reprod*. 2001;16:2374–8.

УДК 618.177-089.888.11

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ И ЛОКАЛИЗАЦИИ МЕЙОТИЧЕСКОГО ВЕРЕТЕНА В ООЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Будерацкая Н. А., Гонтар Ю. В., Ильин И. Е., Петрушко М. П., Лавриненко С. В.

Резюме. Цель работы – определение влияния криоконсервирования методом витрификации на морфологию и локализацию веретена второго деления мейоза ооцитов человека. Для достижения поставленной цели была разработана классификация морфологических форм мейотического веретена ооцита и его расположения по отношению к первому полярному телу. Экспериментальное исследование было выполнено на 84 донорских ооцитах женщин, принимавших участие в программах лечения бесплодия методами ВРТ. Изучали структуру и локализацию мейотического веретена в нативных и криоконсервированных ооцитах человека с помощью поляризационной системы Oosight (Hamilton Thorne, США). После криоконсервирования жизнеспособными выявилось 95,2% яйцеклеток. 45,2% свежeweделенных ооцитов имели компактное веретено деления, однако после криоконсервирования количество таких яйцеклеток уменьшилось до 28,6%. Результаты нашего исследования показали, что 77% ооцитов после криоконсервирования сохраняют морфологические характеристики веретена деления. Было обнаружено, что факторы криоконсервирования могут приводить к изменению мейотического веретена и его разрушению. Впервые показано, что факторы криоконсервирования могут индуцировать преждевременную активацию ооцитов, что может иметь неблагоприятные последствия для качества эмбрионов.

Ключевые слова: криоконсервирование; витрификация; ооциты; мейотическое веретено.

UDC 618.177-089.888.11

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF MORPHOLOGICAL FEATURE AND LOCALIZATION OF MEIOTIC SPINDLE IN HUMAN OOCYTES BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION

Buderatska N., Gontar J., Ilyin I., Lavrynenko S., Petrushko M.

Abstract. Using only oocyte morphological parameters is not enough to predict the quality and implantation potential of the future embryo. As well known, the presence of the first polar body is not always a criterion for oocyte maturity. Evidence of oocyte metaphase II stage is the presence of second meiotic division spindle which can be visualized by a polarizing microscope. However, there is no classification of morphological characteristics and localization of meiotic division spindle in the scientific data. This classification would allow predicting oocyte cryoresistance and quality of embryos obtained from them. The disturbances of the meiotic division spindle of metaphase II stage can lead to abnormal segregation of chromosomes after fertilization of cryopreserved oocytes and as a result to aneuploidy of embryos.

The aim of this work is to determine the influence of cryopreservation by vitrification method on the morphology and localization of second meiotic division spindle of human oocytes.

We have studied and developed a classification of the oocyte's meiotic spindle apparatus morphological forms and its location relative to the first polar body to achieve this goal. An experimental study was performed on 84 donor oocytes of women who took part in infertility treatment programs by ART. The structure and localization of the meiotic spindle in native and cryopreserved human oocytes was studied using the Oosight polarization system (Hamilton Thorne, USA).

The meiotic spindle structure was evaluated and classified. The spindle's grade characteristics are as follows: A – compact rhomboid spindle with defined edges, B – modified spindle form with blurred edges, C – weak visualization, D – spindle on the 1st polar body border and cytoplasm (telophase I), E – spindle not visualized, G – increased in a size. The location was graded as the follows: «a» – 0–20° due to the 1st polar body, «b» – 21–45°, «c» – 46–90°, «d» – 91–180°.

The criteria for the morphological features and localization of the meiotic division spindle of human oocytes was first ascertained. After cryopreservation, the survival rate of oocytes was 95.2%.

Evaluation of meiotic division spindle morphology enabled us to establish that 45.2% of freshly isolated oocytes had a compact spindle, but after cryopreservation the amount of such oocytes decreased to 28.6%. The decrease in oocyte quantity in the spindle of category A was due to changes in the spindle structure. After cryopreservation, appeared oocytes of category E (with the absence of meiotic spindle) up to 7.1%. This can indicate damage of meiotic spindle. The amount of oocytes with category D spindle (at the telophase stage) which also appeared was 9.5%. This shows premature activation of oocyte after freeze-thawing. After cryopreservation localization changes were found spindle cells in 19 (22.6%). There was a significant decrease in the number of oocytes with a spindle in category a – from 40,5% to 21,4%.

It has been established that cryopreservation factors can lead to morphological characteristic changes of second meiotic division spindle and its destruction. It was shown that cryopreservation factors can induce premature oocyte activation which can lead to adverse consequences for the future embryo quality.

Keywords: cryopreservation; vitrification; oocytes; meiotic spindle.

Стаття надійшла 14.03.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування