

Вплив кріоконсервування методом вітрифікації на морфологічні особливості та локалізацію мейотичного веретена поділу ооцитів людини

Н.О. Будерацька, Ю.В. Гонтар, С.В. Лавриненко, І.Є. Ільїн,
О.І. Парницька, К.І. Ільїна, Е.В. Капустін
Медичний центр «ІГР» м. Київ

Influence of Cryopreservation by Vitrification on Morphology and Localization of Meiotic Division Spindle of Human Oocytes

N.O. Buderatska, Yu.V. Gontar, S.V. Lavrynenko, I.Ye. Ilyin,
O.I. Parnytska, K.I. Ilyina, E.V. Kapustin
Medical Center 'IGR', Kyiv

Наявна система оцінки морфологічних параметрів ооцита є недостатньою для прогнозування якості та імплантаційного потенціалу ембріона, оскільки залишає поза увагою стан мейотичного веретена.

Мета роботи – дослідження впливу кріоконсервування методом вітрифікації на морфологічні особливості та локалізацію веретена другого поділу мейозу ооцитів людини. Для цього було розроблено класифікацію морфологічних форм мейотичного веретена ооцита та визначено його розташування по відношенню до першого полярного тіла.

Роботу виконували на базі ТОВ «Медичний центр ІГР» (Україна) в 2016 р. Були визначені критерії оцінки морфологічних параметрів веретена поділу: *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: *a* – 0°–10°; *b* – 11°–40°; *c* – 41°–90°; *d* – 91°–180°.

Вітрифікація ооцитів виконувалась через 2–3 години після трансвагінальної пункції фолікулів. Для вітрифікації використовували кріотоп-метод [M. Kuwayama, 2005]. Ооцити до та після кріоконсервування з урахуванням розроблених нами критеріїв аналізували на наявність веретена першого мейотичного поділу.

Із 126 кріоконсервованих ооцитів життєздатними виявилися 118 (93,6%). Оцінка морфологічних показників веретена поділу дозволила встановити, що у свіжовиділених ооцитах 49,2% ($n = 62$) клітин мали компактне веретено, проте після кріоконсервування кількість таких ооцитів зменшилася до 35,6% ($n = 42$). Після кріоконсервування 5,94% ооцитів належали до категорії *E* ($n = 7$), тобто мали пошкоджене веретено. Було виявлено 6,78% яйцеклітин з веретеном категорії *D* ($n = 8$), в яких відбулася передчасна активація яйцеклітини (до введення сперматозоїда у жіночу гамету).

Після кріоконсервування були виявлені зміни локалізації веретена поділу. Значуще зменшилась кількість ооцитів із веретеном категорії *a* – з 44,5% ($n = 56$) до 31,2% ($n = 37$) ($p < 0,05$). При цьому фактори кріоконсервування не вплинули на локалізацію веретена категорій *b–d*.

Таким чином, 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.

The current system for assessment of oocyte morphological parameters is not sufficient to predict the quality and implantation potential of the future embryo, since it does not consider the meiotic spindle state.

This research aim was to determine the influence of cryopreservation by vitrification on morphology and localization of second meiotic division spindle of human oocytes. For this purpose there has been developed the classification of morphological forms of oocyte meiotic spindle and determined its localization relative to the first polar body.

This research was performed at the Medical Center 'IGR' (Ukraine) in 2016. There were determined the criteria to assess the morphological parameters of division spindle such as: *A* – compact, rhomboid spindle with defined edges; *B* – modified spindle form with blurred edges; *C* – weak visualization; *D* – spindle on the polar body border and cytoplasm (telophase I); *E* – spindle non-visualized; *F* – change in spindle axis orientation towards a polar body; *G* – increased size. The angle of spindle location towards a polar body was as follows: *a* – 0°–10°; *b* – 11°–40°; *c* – 41°–90°; *d* – 91°–80°.

The oocytes were vitrified 2–3 hrs after transvaginal puncture of follicles. The Cryotop method was used for vitrification [M. Kuwayama, 2005]. The oocytes prior to and after cryopreservation were statistically analyzed for the first meiotic division spindle presence according to the criteria designed.

From 126 cryopreserved oocytes 118 (93.6%) occurred to be viable. The assessment of morphological indices of division spindle enabled establishing the fact, that the freshly isolated oocytes 49.2% ($n = 62$) of cells had a compact spindle, but after cryopreservation a number of these oocytes reduced down to 35.6% ($n = 42$). After cryopreservation 5.94% of oocytes belonged to category *E* ($n = 7$), i. e. they had a damaged spindle. There were revealed 6.7% of oocytes with the category *D* spindle ($n = 8$), where a premature activation of oocytes (prior to spermatozoon introduction into a female gamete) occurred. After cryopreservation the changes in spindle division location were found. A number of oocytes with the category *a* spindle was significantly reduced from 44.5% ($n = 56$) down to 31.2% ($n = 37$) ($p < 0.05$). Herewith the cryopreservation factors had no effect on the category *b–d* spindle location.

Thus, the cryopreservation factors may result in changes of morphological features of meiotic spindle and its destruction. There was demonstrated that cryopreservation factors induced a premature activation of oocytes, that could have adverse consequences for the quality of embryos.

