

---

---

# МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

---

© Питько В. А., Логінова О. О., Сініло Н. М., Павлов І. В., Черкашина Я. О.

УДК 618.177-089.888.11.616.697-008.8-08

**Питько В. А., Логінова О. О., Сініло Н. М., Павлов І. В.,  
Черкашина Я. О.**

## ВИКОРИСТАННЯ PVP У ПРОЦЕДУРІ ICSI ТА ЙОГО ВПЛИВ НА ЯКІСТЬ ЕМБРІОНІВ

**ДЗ «Український медичний центр акушерства, гінекології та репродуктології  
міністерства охорони здоров'я України» (м. Харків)**

**nardidiana@gmail.com**

**Вступ.** Розвиток лабораторних методів лікування фактору чоловічого безпліддя в циклах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) призвело до появи революційної технології, а саме інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда в ооцит (ICSI) [6]. На сьогоднішній день частота виконання процедури ICSI в Європі становить 69% від загальної кількості всіх циклів ДРТ [8]. При цьому багато клінік вибирають ICSI в якості стандартної техніки запліднення, навіть коли немає показань на її проведення або відсутній чоловічий фактор безпліддя [2]. Процедура ICSI вимагає забору окремих сперматозоїдів до ін'єкційної піпетки для введення їх в ооцити. При цьому сперматозоїди необхідно іммобілізувати. Найбільш поширеним методом іммобілізації, який не вимагає спеціального обладнання, є метод при якому сперматозоїди переміщуються у в'язке середовище для зниження їх рухливості, з подальшим перетином хвоста, так званий метод класичного ICSI [9]. У переважній більшості клінік ДРТ для цих цілей використовуються середовища, до складу яких входить полівінілпіролідон (PVP). Під час проведення процедури ICSI разом із сперматозоїдом всередину ооцита потрапляє незначна кількість PVP, і оскільки PVP не може дифундувати назовні, і не розщеплюється лізосомальними ферментами, він залишається в яйцеклітині протягом тривалого періоду часу [3], що може негативно позначитися на процесі запліднення. Також є численні літературні дані про те, що середовища, що містять PVP, негативним чином впливають на сперматозоїди, що знаходяться в них і ступінь цього впливу залежить від часу експозиції клітин в таких середовищах [4,5,7].

Таким чином, необхідні нові підходи для зменшення токсичного ефекту PVP при маніпуляціях зі спермою, а також під час проведення процедури ICSI за допомогою зниження концентрації PVP, зменшення часу експозиції спермів в PVP або використання систем відбору сперматозоїдів, що не містять в своєму складі PVP.

**Мета роботи** полягала в зменшенні негативного впливу PVP на статеві клітини і ембріони людини при проведенні процедури ICSI, шляхом зниження його концентрації в середовищі іммобілізації.

**Об'єкт і методи дослідження.** Було проведено 25 процедур ICSI. Середня кількість зрілих ооцитів, отриманих після прицільної пункції фолікулів, склала 11,2 ооцита на жінку. Всього було отримано 280 зрілих ооцитів, які були оцінені і розділені на дві рівнозначні групи.

Сперматозоїди були підготовлені шляхом центрифугування в градієнті густини з наступним флотуванням методом Swim-UP [1].

Чашки для ICSI були підготовлені за методом, рекомендованим виробником середовищ.

Для іммобілізації сперматозоїдів використовувалося середовище, що містить PVP у таких концентраціях: для першої групи 5%, для другої групи 10%.

В роботі використовувалися середовища виробництва Cook Medical (Australia).

Процедура ICSI проводилася за допомогою інвертованого мікроскопа Olimpus ix-71 і мікрomanipулятора Narishige (Japan).

**Результати досліджень та їх обговорення.** На сьогоднішній день PVP широко застосовується в повсякденній практиці екстракорпорального запліднення при виконанні методики ICSI, а також при різних маніпуляціях, що проводяться зі сперматозоїдами.

Однак все частіше з'являються свідчення про токсичний вплив PVP, не тільки на ооцити, а й на сперматозоїди при проведенні маніпуляцій, які потрібно провести перед процедурою ICSI [4,5,7]. Так, деякими авторами показано, що середовища на основі PVP призводять до значної фрагментації ДНК сперматозоїдів [7]. Крім того, PVP виявляється в ембріонах, пригнічуючи їх розвиток, і скорочуючи кількість клітин на стадії бластоцисти [4].

Ми провели дослідження з оцінки впливу пониженого вмісту PVP в середовищі іммобілізації сперматозоїдів на подальше запліднення і розвиток ембріонів до переносу їх в порожнину матки (5 добу). З таблиці видно, що зниження концентрації PVP у 2 рази призводило до достовірного підвищення кількості запліднених яйцеклітин на 6,4%. Кількість ембріонів з вираженою фрагментацією (>10%) значно знижувалась в разі використання PVP у концентрації 5%. При цьому не відбувалося пригнічення розви-

**Вплив концентрації PVP на розвиток ембріонів**

Концентрація PVP у середовищі іммобілізації, %	Кількість ооцитів, шт.	Оцінка запліднення через 16-20 годин	Оцінка ембріонів через 72 години після запліднення		Оцінка ембріонів через 120 годин після запліднення (кількість бластоцист)
			Ембріони з фрагментацією >10%	Ембріони з кількістю бластомерів >8	
5	140	108 (77,1%)	12 (11,1%)	70 (64,8%)	46 (42,6%)
10	140	99 (70,7%)	21 (21,2%)	62 (62,6%)	38 (38,4%)

тку ембріонів, тобто ембріонів, які досягли стадії 8 бластомерів було більше в групі, в якій використовувалось середовище зі зменшеним вмістом PVP. На 5-у добу розвитку оцінювали кількість ембріонів, які досягли стадії бластоцисти. Як видно з

**таблиці**, підвищення вмісту PVP в середовищі іммобілізації призводило до зменшення кількості отриманих бластоцист.

Таким чином, можна зробити **висновок**, що наявність PVP в середовищі іммобілізації сперматозоїдів призводить не тільки до зменшення кількості запліднених ооцитів, а й до зниження якості отриманих методом ICSI ембріонів, порушення процесу дроблення і швидкості нарощування клітинної маси ембріонами.

**Перспективи подальших досліджень.** Для подальшого удосконалення процедури селекції та іммобілізації сперматозоїдів в процесі проведення ICSI необхідно мінімізувати або ж зовсім виключити PVP з середовищ, в яких проводиться експозиція і відбір сперматозоїдів, таким чином, усунувши можливість попадання PVP в ооцит і, відповідно, в ембріон.

### Література

1. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. ВОЗ: Медико-генетический научный центр РАМН (перевод на русский язык), 2012. – 291 с.
2. Dutch Society of Obstetrics and Gynaecology (NVOG). Guideline: Male Subfertility. The Netherlands: Utrecht, 2010.
3. Jean M. Intracytoplasmic sperm injection with polyvinylpyrrolidone: a potential risk / M. Jean, S. Mirallie, M. Bourdineau [et al.] // Fertil. Steril. – 2001. – Vol. 76. – P. 419-420.
4. Kato Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction / Y. Kato, Y. Nagao // Reprod. Med. Biol. – 2012. – № 11. – P. 165-176.
5. Kato Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle / Y. Kato, Y. Nagao // Theriogenology. – 2009. – Vol. 72. – P. 624-635.
6. Palermo G. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte / G. Palermo, H. Joris, P. Devroey [et al.] // Lancet. – 1992. – Vol. 340. – P. 17-18.
7. Sujit Raj Salian B.Sc. Frozen-thawed spermatozoa from oligozoospermic ejaculates are susceptible to in situ DNA fragmentation in polyvinylpyrrolidone-based sperm-immobilization medium / B.Sc. Sujit Raj Salian, Ph.D. Guruprasad Kalthur, M.Sc. Shubhashree Uppangala [et al.] // Andrology. – 2012. – Vol. 98, № 2. – P. 321-325.
8. The European IVF-Monitoring Consortium for the European Society of Human Reproduction and Embryology. Assisted reproductive technology in Europe: results generated from European registers by ESHRE, 2012 / Hum. Reprod., 2016. – P. 1638-1652.
9. Van Steirteghem A. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection / A. Van Steirteghem, Z. Nagy, H. Joris [et al.] // Hum. Reprod. – 1993. – № 8. – P. 1061-1066.

УДК 618.177-089.888.11.616.697-008.8-08

#### ВИКОРИСТАННЯ PVP У ПРОЦЕДУРІ ICSI ТА ЙОГО ВПЛИВ НА ЯКІСТЬ ЕМБРІОНІВ

**Пітько В. А., Логінова О. О., Сініло Н. М., Павлов І. В., Черкашина Я. О.**

**Резюме.** На сьогоднішній день PVP широко застосовується в повсякденній практиці екстракорпорального запліднення при виконанні методики ICSI, а також при різних маніпуляціях, що проводяться зі сперматозоїдами. Однак все частіше з'являються свідчення про токсичний вплив PVP, не тільки на сперматозоїди, а й на ооцити при проведенні маніпуляцій, які потрібно провести перед процедурою ICSI. Ми провели дослідження з оцінки впливу пониженого вмісту PVP в середовищі іммобілізації сперматозоїдів на подальше запліднення і розвиток ембріонів до переносу їх в порожнину матки. Показано, що наявність PVP в середовищі іммобілізації сперматозоїдів призводить не тільки до зменшення кількості запліднених ооцитів, а й до зниження якості отриманих методом ICSI ембріонів, порушення процесу дроблення і швидкості нарощування клітинної маси ембріонами.

**Ключові слова:** ооцити, сперматозоїди, ICSI, ембріони, PVP.

УДК 618.177-089.888.11.616.697-008.8-08

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ PVP В ПРОЦЕДУРЕ ICSI И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА КАЧЕСТВО ЭМБРИОНОВ

**Пітько В. А., Логінова О. А., Сініло Н. Н., Павлов І. В., Черкашина Я. О.**

**Резюме.** На сегодняшний день PVP широко применяется в повседневной практике экстракорпорального оплодотворения при выполнении методики ICSI, а также при различных манипуляциях, проводимых со сперматозоидами. Однако все чаще появляются свидетельства о токсическом влиянии PVP, не только на

сперматозоиды, но и на ооциты при проведении манипуляций предшествующих процедуре ICSI. Мы провели исследования по оценке влияния пониженного содержания PVP в среде иммобилизации сперматозоидов на последующее оплодотворение и развитие эмбрионов до переноса их в полость матки. Показано, что наличие PVP в среде иммобилизации сперматозоидов приводит не только к уменьшению количества оплодотворенных ооцитов, но и к снижению качества полученных методом ИКСИ эмбрионов, нарушению процесса дробления и скорости наращивания клеточной массы эмбрионами.

**Ключевые слова:** ооциты, сперматозоиды, ICSI, эмбрионы, PVP.

UDC 618.177-089.888.11.616.697-008.8-08

### THE USE OF PVP IN ICSI PROCEDURE AND ITS INFLUENCE ON EMBRYO QUALITY

Pitko V. A., Loginova O. O., Sinilo N. M., Pavlov I. V., Cherkashyna Ya. O.

**Abstract.** At present the frequency of ICSI procedure performing in Europe amounts to 69% of the total number of ART cycles. Polyvinylpyrrolidone (PVP) is widely used in the daily practice of in vitro fertilization with ICSI techniques implementation, as well as for various spermatozoa manipulations.

Literature data indicate that the media containing PVP have the negative influence on spermatozoa within them and the extent of this effect depends on the time exposure of cells in such environments.

However, the data regarding the toxic effects of PVP not only on spermatozoa, but also on oocytes are stated more often because during ICSI procedure the small amount of PVP gets inside the oocyte with spermatozoon, and since PVP can not diffuse out, and is not splitted by lysosomal enzymes, it stays in the oocyte for an extended period of time, which can adversely affect the process of fertilization.

*The aim of the study* was to reduce the negative PVP influence on germ cells and human embryos during ICSI procedure by decreasing its concentration in the immobilization environment.

The assessment of influence of the low PVP content in the environment of spermatozoa immobilization for the further fertilization and embryos development before transferring them into the uterine cavity was performed. It was determined that the presence of PVP in the environment of spermatozoa immobilization caused not only reduction of the number of fertilized oocytes, but also impaired the quality of embryos obtained by ICSI, affected the process of fragmentation and the rate of cell mass increasing in embryos.

It was conducted 25 ICSI procedures with 280 mature oocytes that were evaluated and divided into two equal groups. The medium containing PVP was used for spermatozoa immobilization in following concentrations: 5% in the first group, 10% in the second one.

The cups for ICSI were prepared according to the method recommended by the media manufacturer.

The environments produced by Cook Medical (Australia) were used in research.

The study regarding evaluation of the influence of low PVP content in the environment of spermatozoa immobilization for the further fertilization and development of embryos before transferring them into the uterine cavity (day 5) was carried out. The decrease of PVP concentration in 2 times caused significant increase in the number of fertilized oocytes by 6.4%. The number of embryos with marked fragmentation (>10%) significantly decreased to 11.1% in comparison with 21.1% in the case of PVP usage in 5% concentration. In the process the inhibition of embryos development was absent, namely the embryos that reached the stage of 8 blastomeres were presented more in group where environment with reduced PVP content was used. On 5 day of development the number of embryos that reached the blastocyst stage was evaluated. The increase of PVP content in the immobilization environment caused the decrease in the number of obtained blastocysts 42.6% compared to 38.4%.

In prospect a more detailed study based on wider sampling should be carried out to provide the better results while reducing PVP concentration.

**Keywords:** oocytes, spermatozoa, ICSI, embryos, PVP.

Рецензент – проф. Громова А. М.

Стаття надійшла 08.12.2016 року