

©С. В. Хміль, М. С. Хміль, Р. П. Микула, Л. Б. Пелех, Р. Б. Баран

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»
Медичний центр «Клініка професора С. Хміля»

КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ ЯКОСТІ ЯЙЦЕКЛІТИН У ПРОГРАМАХ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ

КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ ЯКОСТІ ЯЙЦЕКЛІТИН У ПРОГРАМАХ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ. У статті представлено основні критерії оцінки якості яйцеклітин, отриманих при пункції фолікулів, які застосовуються в репродуктивній медицині з метою прогнозування результату запліднення *in vitro*.

КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЯЙЦЕКЛЕТОК В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ. В статье представлены основные критерии оценки качества яйцеклеток, полученных при пункции фолликулов, которые применяются в репродуктивной медицине с целью прогнозирования результата оплодотворения *in vitro*.

EVALUATION CRITERIA OF OOCYTES QUALITY IN PROGRAMS *IN VITRO* FERTILIZATIONS. The article presents the main criteria for assessing the quality of oocytes obtained by follicle puncture used in reproductive medicine to predict the result of *in vitro* fertilization.

Ключові слова: екстракорпоральне запліднення, якість яйцеклітин.

Ключевые слова: экстракорпоральное оплодотворение, качество яйцеклеток.

Key words: *in vitro* fertilization, oocytes quality.

На сьогодні екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ) є одним із ефективних методів боротьби з безпліддям в багатьох країнах світу. Досягнення в цій галузі дають можливість багатьом безплідним парам відчути радість батьківства. Методика запліднення *in vitro* дає змогу подолати майже всі форми як чоловічого, так і жіночого безпліддя [1].

Процедура екстракорпорального запліднення складається з таких етапів: забір ооцитів, запліднення їх сперматозоїдами високої якості, культивування ембріонів та трансфер їх у порожнину матки. Висока якість яйцеклітин та ембріонів – один із ключових аспектів успішного результату ЕКЗ. Саме тому сучасна репродуктивна медицина та ембріологія розробляють все нові підходи для правильної, максимально точної їх оцінки з метою не лише отримання вагітності, але й народження здорової дитини [1–3].

Сьогодні фахівці приділяють велику увагу методам відбору ембріонів, які мають найвищий імплантаційний потенціал, оскільки важливим залишається підвищення частоти запліднення при одночасному зниженні частоти багатоплідних вагітностей. Дедалі більше країн приймають законодавчі обмеження щодо числа ембріонів на перенос. Внаслідок цих обмежень зростає частка селективного переносу одного ембріона, і змінюються тенденції лабораторій ЕКЗ в галузі пошуку нових підходів для ідентифікації найбільш життєздатних ембріонів [4, 5].

У перші десятиліття застосування допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) лікарі-репродуктологи, для підвищення шансів жінки завагітніти, намагались отримати якнайбільшу кількість ооцитів у протоколах стимуляції. Контрольована оваріальна стимуляція (КОС), на відміну від природного циклу, де дозрівання яйцеклітини є результатом ретельного природного відбору, пригнічує

добір. У результаті аспірації отримують яйцеклітини, якість яких потребує детальної оцінки. Розробка та впровадження в практику методу ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) дають можливість отримати вагітність у циклах, де причиною безпліддя виступає фактор тяжких форм чоловічого безпліддя (криптозооспермія, азооспермія та ін.). Проте дослідження свідчать про те, що при нормальних показниках спермограми відсоток запліднення може бути набагато нижчим від очікуваного. В даному випадку важливу роль відіграє якість яйцеклітин [30–32].

Ооцити – це вузькоспеціалізовані клітини, які беруть участь у формуванні, активації та подальшому функціонуванні ембріонального геному, підтримці основних процесів, таких, як гомеостаз, обмін речовин, тривалість клітинного циклу. Біологічна компетентність ооцитів визначається як внутрішня здатність до мейотичного дозрівання. Даний процес багатаетапний та включає каскад складних клітинних реакцій. Активація власного геному ембріона людини відбувається приблизно на 3-тю добу, починають працювати більш 4 тис. генів, які забезпечують подальше дроблення, компактизацію, формування бластоцисти, імплантацію і весь наступний розвиток. До цього моменту важливим є синтез та накопичення матричних РНК, протеїнів, поживних речовин, які акумулюються в ооциті. Саме тому для запліднення і розвитку ембріона істотне значення має якість яйцеклітин, а правильна їх оцінка полегшує прогнозування результату [30].

Заключний етап для оптимального розвитку – синхронізація між ядерною і цитоплазматичною зрілістю. Мейотичний стан ооцитів (GV, MI, MII), визначають за наявністю/відсутністю першого полярного тіла в циклах ICSI, це дає можливість судити про ступінь готовності ооцита до запліднення. Тільки ооцити на стадії профазі I другого мейотичного поділу (MII) придатні для запліднення

методом ICSI. У циклах IVF/ICSI в повсякденній клінічній практиці оцінка яйцеклітин основана на морфологічних параметрах [6, 38]:

- Помірна інтенсивність забарвлення і компактність клітини кумулюсу [7, 38].

- Чітко виражені межі *corona radiata* та променів у ній, однорідність її структури [8, 38].

- Оцінка прозорої оболонки (*zona pellucida*). Її зовнішній вигляд та структура дозволяють прогнозувати якість ооцитів та ембріонів. Яйцеклітини із дефектною *zona pellucida* корелюють із зниженням кількості та якості отриманих бластоцист, частотою імплантації та ранньою вагітністю [8, 38].

- Зміни у величині (малі та гігантські) та формі самого ооцита (видовжені чи неправильної форми) – суттєво впливають на якість клітин, і, як правило, такі клітини не підлягають процедурі ІКСІ [9, 38].

- Якість цитоплазми (наявність цитоплазматичних включень, вакуолізація, цитоплазматична зернистість). Щодо цитоплазматичної зернистості, то вона може бути або однорідною – поширюватись на всю гамету, або мати центральну локалізацію. Доведено, що саме центральна локалізація цитоплазматичної зернистості корелює із відсотком настання вагітності. На відміну від цього, слабка або помірна зернистість була прийнята як звичайна риса ооцитів [12, 29, 38].

- Дефекти блискучої оболонки (її потовщення є показанням до проведення процедури ІКСІ усіх отриманих ооцитів) [38].

- Характеристика перивітелінового простору (наявність дебрису, перетинок). Збільшений перивітеліновий простір часто поєднується з різко збільшеним першим полярним тілом, що служить прогностичним фактором низького потенціалу розвитку таких клітин, це відбивається на деякому зниженні відсотка зигот в циклах ІКСІ [29, 38].

- Стан полярного тіла (форма, величина, наявність фрагментації). У дослідженнях деяких авторів було показано, що морфологічні параметри першого полярного тільця (збільшення розміру або дегенерація) корелюють зі зниженням відсотка зигот. Є дослідження, у яких проводили оцінку запліднення та подальший розвиток двох груп ооцитів – із нефрагментованими (група I) та фрагментованими (група II) першими полярними тільцями. Авторами було виявлено статистично достовірний зв'язок між морфологічними параметрами першого полярного тільця і якістю отриманих ембріонів, при цьому частота настання вагітності після переносу ембріонів, що розвивались із ооцитів I групи, була значно вищою, ніж при переносі ембріонів, отриманих із ооцитів II групи. Таким чином було показано, що морфологічні параметри першого полярного тільця можуть служити критерієм для відбору найякіснішого матеріалу в програмах ДРТ [33, 34, 37].

Часто в практиці ембріологів трапляються яйцеклітини із так званим «синдромом крихких мембран». У такому випадку мембрани, під час проколу їх ін'єкційною голкою для ICSI, не створюють опору і голка проходить дуже легко. Результати досліджень продемонстрували, що поведінка плазматичної мембрани під час процедури ICSI корелює із частотою запліднення (2 PN). Ооцити із «крихкими мембранами» легко дегенерують, це можна

пояснити відсутністю захисного ефекту *лійки*, і, відповідно, порушенням герметизації. Помічено, що яйцеклітини з крихкими мембранами мають меншу здатність виштовхувати друге полярне тільце, яке згодом конденсується у цитоплазмі, утворюючи пронуклеус [28, 35].

Зменшена здатність утворювати два пронуклеуси та виштовхувати друге полярне тільце може бути пов'язана із втратою селективності інтактної мембрани до іонів або інших речовин. Порушуються клітинні процеси, насамперед, синтез та організація мікротрубочок. Крім того, розрив мембрани може вплинути на кортикальні компоненти цитозолю, що призводить до порушення структури мікротрубочок, що відповідають за сегрегацію хромосом і виштовхування (у вигляді полярного тіла) під час другого поділу мейозу. Цілісність оолеми також може впливати на здатність зиготи до формування ембріонів доброї якості. Число ембріонів, які дробляться, отриманих з ооцитів із крихкими мембранами, значно менше, порівняно з числом ембріонів, отриманих з яйцеклітин, що мають високу стійкість мембрани під час процедури ICSI [36].

Проте всі морфологічні критерії для класифікації та скринінгу ооцитів мають суб'єктивний характер і є досить суперечливими, оскільки немає чіткої кореляції з генетичною компетентністю гамет. Присутність в ооциті генетичних дефектів на хромосомному і геномному рівнях в деяких випадках може не впливати на фенотип ембріона, який за морфологічними характеристиками може не поступатися іншим нормальним ембріонам на 2–3-тю добу дроблення [9, 28].

Одним із нових підходів оцінки морфофункціональної компетентності ооцитів є застосування поляризаційного мікроскопа з метою візуалізації веретена поділу. Численні дослідження присвячені особливостям локалізації веретена поділу та кореляції з показниками запліднення і дроблення ембріонів. Зокрема, встановлено, що розташування веретена поділу відносно першого полярного тільця може служити прогностичним інструментом. В ооцитів з відхиленням розташування веретена поділу з позиції полярного тіла більше 90° зафіксовано нижчі відсотки запліднення та дроблення [15, 16].

Більшість авторів згодна, що при нормальній візуалізації веретена поділу в зрілому ооциті можна передбачити темпи запліднення, дроблення і якість ембріонів. Тим не менш, результати впливу на імплантаційний потенціал та настання вагітності суперечливі [17].

Основним завданням багатьох науково-дослідних проектів є розробка нових неінвазивних методів дослідження та пошук молекулярних маркерів, які прогнозуватимуть якість яйцеклітин. Процес формування ооцитів тісно пов'язаний з їх мікрооточенням, яке відповідає за цілісність процесів нормального розвитку та функціонування. Складові елементи фолікула – три різні типи соматичних клітин (тека, зернистих і купчастих), базальна пластинка, фолікулярна рідина, мають активну регуляторну роль в диференціації ооцитів [10, 11].

Визначення ключових молекул і сигнальних шляхів у межах комплексу фолікул–кумуляус–ооцит – це один із нових підходів, який тільки розвивається, але, на думку багатьох науковців, буде відігравати важливу роль в отриманні надійних молекулярних маркерів якості ооцитів та приведе до підвищення ефективності показників ДРТ [12, 14]. Як показує ряд досліджень, фолікулярна рідина,

отримана разом з ооцитом під час фолікулярної аспірації, може мати прогностичну цінність [18, 19]. Результати серії молекулярних аналізів, спрямованих на вимірювання рівнів стероїдних гормонів у фолікулярній рідині, та їх зв'язок із показниками якості яйцеклітин та успіхом процедури ЕКЗ досить суперечливі [20–22]. Однак встановлено чітку кореляцію між концентрацією деяких низькомолекулярних метаболітів та якістю ооцитів, ступенем їх зрілості та результатом ЕКЗ, зокрема із молекулами-попередниками біосинтезу гомоцистеїну, міо-інозитулу, D-аспарагінової кислоти, аланіну і гліцину [23–25].

Активні форми кисню (АФК), що синтезуються як нормальні продукти аеробного метаболізму, успішно інактивуються безліччю захисних механізмів. Будь-який потенційний дисбаланс між АФК і системою антиоксидантного захисту призводить до окиснювального стресу

в клітинах та може викликати пошкодження ДНК і стати пусковим механізмом апоптозу. Висока концентрація АФК у фолікулярній рідині сприяє формуванню ооцитів з порушеним веретеном поділу та в подальшому зростанню імовірності анеуплоїдії в ембріона. Так, більш високі рівні активних форм кисню і більш низькі рівні антиоксидантів були виявлені у фолікулярній рідині жінок, які не змогли завагітніти після процедури ЕКЗ [26, 27].

ВИСНОВОК. Вивчення морфологічних особливостей ооцитів людини стає важливим завданням для підвищення ефективності запліднення *in vitro*, настання вагітностей і народження здорових дітей. Оцінка якості ооцита – перший крок у селекції ембріонів, саме тому необхідним є подальше дослідження даного етапу екстракорпорального запліднення, а також залежність його від інших факторів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Yulian Zhao, Brinsden, Edward Wallach *In vitro* fertilization: Four decades of reflections and promises / Yulian Zhao, Paul Brezina, R. Peter // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – Vol. 1810. – P. 843–852.
2. Are there non-invasive markers in human oocytes that can predict pregnancy outcome? / Suha Kilani, Simon Cooke, Andrew Kan, Michael Chapman // *Reproductive BioMedicine*. – 2009. – Vol. 18, No 5. – P. 674–680. – Online; www.rbmonline.com/Article/3675 on web 13 March 2009.
3. Oskari Heikinheimo. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine / Oskari Heikinheimo, William E. Gibbons // *Molecular Human Reproduction*. – 1998. – Vol. 4, No.8. – P. 745–756.
4. Громенко Ю. Ю. Влияние факторов оценки качества перенесенных эмбрионов на прогнозирование частоты наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения / Ю. Ю. Громенко, И. Р. Исхаков // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2012. – Т. 7, вып. № 2. – С. 27–30.
5. Maheshwari A. Global variations in the uptake of single embryo transfer / A. Maheshwari, S. Griffiths, S. Bhattacharya // *Human Reproduction Update*. – 2011. – Vol. 17. – P. 107–120.
6. Eppig J. J. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes / J. J. Eppig, R. M. Schultz, M. O'Brien, F. Chesnel // *Dev. Biol.* – 1994. – Vol. 164. – P. 1–9.
7. What criteria for the definition of oocyte quality / G. Coticchio, E. Sereni, L. Serrao [et al.] // *Ann. N Y Acad Sci.* – 2004. – Vol. 1034. – P. 132–144.
8. Wang Q. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors / Q. Wang, Q. Y. Sun // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2007. – Vol. 19. – P. 1–12.
9. Morphological and cytogetic analysis of human giant oocytes and giant embryos / H. Balakier, D. Bouman, A. Sojecki [et al.] // *Hum Reprod.* – 2002. – Vol. 17 – P. 2394–2401.
10. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation / M. M. Matzuk, K. H. Burns, M. M. Viveiros, J. J. Eppig // *Science*. – 2002. – Vol. 296(5576). – P. 2178–2180.
11. Hennet M. L. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation / M. L. Hennet, C. M. Combelles // *Int. J. Dev. Biol.* – 2012. – Vol. 56. – P. 10–12.
12. What criteria for the definition of oocyte quality? / G. Coticchio, E. Sereni, L. Serrao [et al.] // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – P. 132–144.
13. FCorrelation between first polar body morphology and further embryo development / P. Fancsovsits, Z. G. Tothne, A. Murber [et al.] // *Acta Biol. Hung.* – 2006. – Vol. 57. – P. 331–338.
14. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of *in vitro* fertilization / M. Attaran, E. Pasqualotto, T. Falcone [et al.] // *International Journal of Fertility & Women's Medicine*. – 2000. – Vol. 45. – P. 314–320.
15. Dr Markus Montag Oocyte assessment and embryo viability prediction: birefringence imaging // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2008. – Vol. 17, No 4. – P. 454–460.
16. Meiotic spindle visualization in living human oocytes / L. Rienzi, F. Ubaldi, M. Iacobelli [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2005. – Vol. 10. – P. 192–198.
17. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by PolScope before insemination. / W. H. Wang, L. Meng, R. J. Hackett, D. L. Keefe // *Human Reproduction*. – 2001. – Vol. 16. – P. 1464–1468.
18. Andersen C. Y. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after *in vitro* fertilization / C. Y. Andersen // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 1993. – Vol. 77, No 5. – P. 1227–1234.
19. Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography on the HCG day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles / L. T. Merce, S. Bau, M. J. Barco [et al.] // *Human Reproduction*. – 2006. – Vol. 21, No. 5. – P. 1218–1226.
20. Botero-Ruiz W. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocyte *in vitro* / W. Botero-Ruiz, N. Laufer, A. H. DeCherney // *Fertility and Sterility*. – 1984. – Vol. 41, No 6. – P. 820–826.
21. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential / C. Mendoza, E. Ruiz-Requena, E. Ortega [et al.] // *Human Reproduction*. – 2002. – Vol. 17, No 4. – P. 1017–1022.
22. The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection / B. Asimakopoulos, D. Abu-Hassan, E. Metzzen [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2008. – Vol. 90, No. 1. – P. 60–64.
23. IVF outcomes are associated with biomarkers of the

- homocysteine pathway in monofollicular fluid / J. C. Boxmeer, N. S. MacKlon, J. Lindemans [et al.] // *Human Reproduction*. – 2009. – Vol. 24, No 5. – P. 1059–1066.
24. Chiu T. T. Y. Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: relationship with oocyte quality / T. T. Y. Chiu, M. S. Rogers, E. L. K. Law [et al.] // *Human Reproduction*. – 2002. – Vol. 17, No 6. – P. 1591–1596.
25. D'Aniello G. Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid / G. D'Aniello, N. Grieco, M. A. Di Filippo [et al.] // *Human Reproduction*. – 2007. – Vol. 22. – No 12. – P. 3178–3183.
26. Alberto Revelli. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics / Alberto Revelli, Luisa Delle Piane, Simona Casano, Emanuela Molinari // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2009. Vol. 7. – P. 40.
27. Effect of follicular fluid oxidative stress parameters on intracytoplasmic sperm injection outcome / M. A. Bedaiwy, S. A. El-Nashar, J. M. Goldberg [et al.] // *Gynecological Endocrinology*. – 2012. – Vol. 28, No. 1. – P. 51–55.
28. Van Blerkom J. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence / J. Van Blerkom, P. Davis, S. Alexander // *Hum Reprod*. – 2000. – Vol. 15. – P. 2191–2633.
29. Rienzi L. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature / L. Rienzi, G. Vajta, F. Ubaldi // *Human. Reprod. Update*. – 2011. – Vol. 17, No 1. – P. 34–45.
30. Gamete origin in relation to early embryo development / A. Van Soom, L. Vandaele, K. Goossens [et al.] // *Theriogenology*. – 2007. – № 68 (Suppl. 1). – P. 131–137.
31. Swain J. E. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization / J. E. Swain, T. B. Pool // *Hum. Reprod. Update*. – 2008. – № 14. – P. 431–446.
32. Is the retrieval of high numbers of oocytes desirable in patients treated with gonadotrophin-releasing hormone analogues (GnRHa) and gonadotrophins? / A. Pellicer, A. Ruiz, R. M. Castellvi [et al.] // *Human Reproduction*. – 1989. – № 4. – P. 536–540.
33. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome L. Rienzi, F. M. Ubaldi, M. Iacobelli [et al.] // *Fertil Steril*. – 2008. – № 90. – P. 1692–1700.
34. Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality / P. A. Navarro, M. M. de Araujo, C. M. de Araujo [et al.] // *Int. J. Gynaecol. Obstet*. – 2009. – № 104. – P. 226–229.
35. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection / G. Palermo, M. Alikani, M. Bertoli [et al.] // *Hum. Reprod*. – 1996. – № 11. – P. 172–176.
36. Mohamed A. Danfour, Mohamed S. Elmahaishi Human oocyte oolemma characteristic is positively related to embryo developmental competence after ICSI procedure Middle / A. Mohamed // *East Fertility Society Journal*. – 2010. – № 15. – P. 269–273.
37. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients / T. Ebner, M. Moser, M. Sommergruber [et al.] // *Human Reproduction*. – 2002. – Vol. 17, № 9. – P. 2415–2418.
38. Emanuela Lazzaroni-Tealdi, David H. Barad Oocyte Scoring Enhances Embryo-Scoring in Predicting Pregnancy Chances with IVF Where It Counts Most/ *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal. December 2, 2015 1-13.

Отримано 09.02.16