

М.П. ПЕТРУШКО

Харьковский центр репродукции человека

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕОПЛОДОТВОРЕННЫХ ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА



Представлены результаты морфофункционального и цитогенетического анализа 341 ооцита, неоплодотворенного в ходе проведения программы ЭКО. Выясняются основные причины «неудач» при оплодотворении ооцитов in vitro. Показана зависимость частоты хромосомных аномалий ооцитов, составившая 40,2 %, от возраста пациенток и степени зрелости клеток.

© М.П. ПЕТРУШКО, 2003

Введение. Оплодотворение и предшествующие ему события (созревание гамет, овуляция) можно без преувеличения назвать кульминационными моментами репродуктивного процесса, во многом определяющими судьбу эмбриона. Поэтому важным этапом в технологии экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является анализ причин неудач оплодотворения. Несмотря на многочисленные работы, посвященные терапии бесплодия методом ЭКО, многие проблемы остаются неразрешенными до настоящего времени. Основная из них — это невысокая результативность лечения. При проведении процедуры ЭКО оплодотворяется 60–80 % ооцитов, однако свое дальнейшее развитие в культуре до момента переноса проходит около 50 % всех эмбрионов [1]. В литературе имеются данные о зависимости качества яйцеклеток, получаемых при аспирации, от возраста женщины, схем индукции суперовуляции и метода получения ооцитов [2, 3]. Немаловажную роль играет строгое соблюдение техники культивирования in vitro и влияние различных сред на способность клеток к оплодотворению и дальнейшему развитию [4].

В последнее время все большее внимание уделяется цитогенетическому анализу половых клеток, так как установлено, что 50 % и более зародышей, погибающих на предимплантационных стадиях, а также во время имплантации, несут те или иные хромосомные аномалии [5], и причинами неудач при проведении программ ЭКО могут быть нарушения в хромосомном наборе гамет и эмбрионов.

Целью нашей работы явился цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов. При этом оценивали морфологические свойства получаемых гамет, условия культивирования, оплодотворения и дробления, принимался во внимание возраст супружеских пар, их соматический анамнез.

Материалы и методы. Материалом для цитогенетических исследований служили неоплодотворенные ооциты, которые получены у пациентов, участвующих в программе ЭКО Харьковского центра репродукции человека.

Этап индукции суперовуляции, аспирации ооцитов, подготовка спермиев к оплодотворению и культивирование гамет и эмбрионов проводили по стандартной технологии программы ЭКО.

Для цитогенетического анализа использовали неоплодотворившиеся ооциты, т. е. ооциты, в которых не обнаруживали признаков оплодотворения через 20–24 ч после реинсеминации. Морфологические особенности клеток контролировали с помощью инвертированного микроскопа фирмы Leitz ($\times 400$). Для приготовления хромосомных препаратов применяли метод Тарковского. Неоплодотворенные ооциты выдерживали 20 мин в 0,9%-ном растворе цитрата натрия, затем помещали на стекло и фиксировали раствором метанол/уксусная кислота в соотношении 3 : 1. Препараты высушивали. Окрашивание проводили красителем Романовского-Гимза в течение 10 мин.

Результаты исследований и их обсуждение. У 432 пациенток, которые проходили лечение бесплодия методом ЭКО в Харьковском центре репродукции человека, было аспирировано 3526 ооцитов, 2750 (78 %) из которых оплодотворились. У 776 (22 %) ооцитов через 20 ч после оплодотворения отсутствовали морфологические признаки оплодотворения — не визуализировались два пронуклеуса, отсутствовало второе полярное тельце. Все неоплодотворенные ооциты были использованы для приготовления цитогенетических препаратов. Из 776 фиксированных ооцитов пригодными для цитогенетического анализа оказались 386, что составило 49,7 % (табл. 1). В остальных случаях наблюдали дегенеративные изменения (сильная конденсация или деспирализация хроматина, слипание хромосом). Невысокий процент препаратов, пригодных для цитогенетического анализа, связан, по нашему мнению, с тем, что ооциты фиксировали через 72 ч после их аспирации. За это время в неоплодотворенной яйцеклетке происходят деструктивные изменения, что делает невозможным проведение хромосомного анализа [7].

Для анализа частоты встречаемости гетеропloidии ооцитов в зависимости от возраста исследовали три клинические группы. Первую группу составили 38 пациенток в возрасте до 25 лет, вторую — 41 человек от 25 до 35 лет и третью — 40 пациенток старше 35 лет. Оказалось, что с возрастом пациенток увеличивается как частота анеупloidии, так и частота полипloidии половых клеток (табл. 2).

Диплоидные клетки составили 15 % всех проанализированных ооцитов. Интересным явился

тот факт, что из 51 диплоидной клетки 12 характеризовались гигантскими размерами, причем во всех гигантских ооцитах присутствовало первое полярное тело. В диплоидных ооцитах нормальных размеров полярное тело не визуализировалось.

В 86 клетках обнаружили различные аномалии числа хромосом и хромосомные aberrации.

Полученное в наших исследованиях увеличение частоты хромосомной патологии с возрастом имеет тенденцию, аналогичную таковой в естественной популяции, однако показатели патологий спонтанной фертильности несколько ниже [8].

После аспирации клетки оценивали по степени зрелости кумулюса, плотности Corona radiata, состоянию цитоплазмы. Зрелые ооциты инсеминировали через 4 ч, незрелые клетки культивировали от 6 до 12 ч перед инсеминацией. Как зрелые были оценены 157 ооцитов. Такие клетки имели круглую, ровную, светлую ооплазму, рас-

Таблица 1
Результаты цитогенетического исследования неоплодотворенных ооцитов человека

Показатель	Карิโอтип	Количество ооцитов	Общее количество
Норма	23,X	204	12
	МII, 26X, +C,+C,+F	1	
	МII, 26X, +B,+C,+F	1	
	МII, 25X, +F,+E	1	
	МII, 25X, +C,+F	2	
Гипергаплоидия	МII, 24X,+C	1	74
	МII, 24X,+G	2	
	МII, 24X,+E	2	
	МII, 23X, +Acht	1	
	МII, 23X, +Ccht	1	
	МII, 19,X,-C,-E,-FG	1	
	МII, 20X,-C,-E,-F	2	
	МII, 20X, -C,-C,-E	2	
	МII, 20X,-C,-E,-E	2	
	МII, 20X,-C,-F,-F	2	
Гипогаплоидия	МII, 21X, -E,-E	4	51
	МII, 22X,-C	17	
	МII, 22X,-G	16	
	МII, 22X,-D	10	
	МII, 22X,-F	12	
	МII, 22,X,-B	1	
Диплоидия			51
Ооциты с ПКХ			45
Всего			386

Таблица 2

Аномалии кариотипа неоплодотворенных ооцитов в зависимости от возраста женщины

Хромосомный статус	До 25 лет, n = 38	25–35 лет, n = 41	Более 35 лет, n = 40
Гаплоидные ооциты (23,X)			
количество ооцитов на женщину, M ± m	2,05 ± 0,16	1,6 ± 0,16*	1,5 ± 0,17*
абс.кол./%	78 (22,9)	65 (19)	61 (17,9)
Диплоидные ооциты 46,X			
количество ооцитов на женщину, M ± m		0,4 ± 0,13*	0,7 ± 0,2**
абс.кол./%	4 (1,2)	18 (5,3)	29 (8,5)
Анеуплоидные ооциты (<,> 23,X)			
количество ооцитов на женщину, M ± m		0,6 ± 0,16	1,3 ± 0,2**
абс.кол./%	11 (3,2)	24 (7,0)	51 (15,0)

* Достоверность отличий в сравнении с группой пациенток до 25 лет ($P < 0,05$). **Достоверность отличий в сравнении с группой пациенток до 25 лет ($P < 0,01$).

Таблица 3

Зависимость хромосомных аномалий ооцитов от степени зрелости аспирированных клеток

Ооциты	Зрелые		Незрелые		Перезревшие	
	абс. кол.	%	абс. кол.	%	абс. кол.	%
Гаплоидные (23,X)	109	31,9	30	8,8	65	19,1
Диплоидные (46,XX)	5	1,5	36	10,6	10	2,9
Анеуплоидные (<,> 23,X)	43	12,6	30	8,8	13	3,8

тяжкую, правильную, лучистую Corona radiata, светлые, большие клетки гранулезы. Из них 48 (30,6 %) имели аномальный кариотип. Среди незрелых и перезревших клеток процент аномалий кариотипа составил 68,8 и 26,1 (табл. 3).

В последние годы появилось достаточное количество работ, в которых представлены результаты цитогенетического анализа неоплодотворенных ооцитов, однако данные, приведенные авторами, достаточно противоречивы. Так, частота гетероплоидий в таких клетках составляет от 22 до 60 % [9–19]. Наиболее характерными типами аномалий неоплодотворенных ооцитов является анеуплоидия, полиплоидия и структурные перестройки хромосом.

Первой по частоте встречаемости хромосомной аномалией ооцитов является анеуплоидия. По данным одних авторов, частота гипо- и гипергаплоидии одинакова [20], другие авторы отмечают, что гипогарплоидия встречается намного чаще гипергаплоидии [21].

Второй хромосомной аномалией ооцитов является диплоидия. Причина диплоидии — нарушение экстрезии полярного тела в первом

делении созревания. Кроме того, нередкими бывают и другие формы полиплоидии — три- и тетраплоидные ооциты [22, 23].

И, наконец, структурные перестройки хромосом встречаются у 6–7 % всех неоплодотворенных ооцитов [24].

В литературе имеется ограниченное число публикаций, в которых представлены данные о структурных перестройках мейотических хромосом. Это может быть связано с трудностью их анализа, поскольку мейотические хромосомы на стадии МП высококомпактизованы и не поддаются дифференциальному окрашиванию [25].

Предполагается, что высокая частота хромосомных аномалий женских гамет связана с режимом гиперстимуляции яичников, возрастом женщины, выбором метода получения ооцитов или техники культивирования *in vitro* [26].

В популярном изложении основ и современных представлений о гаметогенезе, формировании мужского и женского пронуклеусов после оплодотворения яйцеклетки Propping [27] отмечает, что из-за особенностей мейоза

женские гаметы значительно сильнее, чем мужские, предрасположены к хромосомным aberrациям. Автор считает, что анализ контролирующих механизмов гаметогенеза и раннего эмбриогенеза необходим для дальнейшего усовершенствования эффективных методов лечения бесплодия.

Считают, что после трех неудачных попыток оплодотворения вне организма необходимо кариотипирование супружеской пары [28, 29].

Показано, что в зависимости от схем стимуляции фолликулогенеза изменяется средняя частота анеуплоидии [30]. Достоверных различий в возникновении хромосомных аномалий в зависимости от препаратов, применяемых для индукции овуляции, не находят многие авторы [31–33]. Если после проведенной индукции овуляции получено большое количество ооцитов низкой степени зрелости, то пропорционально возрастает риск хромосомных aberrаций в этих клетках, увеличивается возможность полиспермного оплодотворения и ошибок деления [34]. Высказывается предположение, что успех оплодотворения *in vitro* зависит от генетической полноценности ооцита [35].

Показано, что с уменьшением частоты оплодотворения возрастает количество анеуплоидных клеток и хромосомных фрагментов [36].

Старение гамет как в женских половых путях, так и в культуре снижает их способность участвовать в оплодотворении [37]. Продолжительность периода, приводящего к такому результату, для ооцитов исчисляется часами, а для сперматозоидов — сутками [38]. При оплодотворении *in vitro* дегенеративные изменения ооцитов и избыток компетентных сперматозоидов могут привести к полиспермному оплодотворению [39, 40]. При ЭКО можно специфическим образом влиять на активацию ооцитов и предупреждать наступление дегенеративных изменений путем использования ооцитов, не достигших полной зрелости, и своевременного их оплодотворения в процессе культивирования [41, 42].

Новые перспективы в клинической и преимплантационной цитогенетике открыла техника микроманипуляционной биопсии полярного тела [43–45]. У большинства млекопитающих и человека полярное тело содержит хромосомы, которые не участвуют в истинной метафазной

пластинке и не имеют веретена деления. Хромосомы полярного тела обычно рассеиваются в цитоплазме при его деградации. Цитогенетический анализ полярного тела позволяет производить скрининг пациентов, включенных в программу экстракорпорального оплодотворения, и выявлять наличие гамет, несущих хромосомные аномалии без нанесения вреда для дальнейшего развития эмбриона.

Цитогенетический анализ, осуществляемый при проведении программ вспомогательных репродуктивных технологий, позволяет оценить качество получаемых гамет, этап, на котором остановилось развитие эмбрионов, аномалии процесса оплодотворения и дробления и целый ряд других патологических изменений, определить которые иными способами не представляется возможным [46]. Цитогенетические исследования позволяют лучше понять и осмыслить причины неудач при проведении программ экстракорпорального оплодотворения, улучшить «качество» гамет и эмбрионов, используемых в ЭКО, снизить риск рождения детей с генетическими и хромосомными аномалиями, что ведет к еще более широкой популярности вспомогательных методов лечения бесплодия.

Выводы. Цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов дает возможность установить причины отсутствия фертилизации; средняя частота формирования гетероплоидии в неоплодотворенных ооцитах человека составляет 40,2 %; с возрастом повышается частота нестабильности хромосомного набора женских репродуктивных клеток; требуется индивидуальный подход в подборе схем индукции суперовуляции, так как с возрастанием числа незрелых ооцитов, полученных при пункции фолликулов, увеличивается риск хромосомной патологии; рекомендуется проведение предимплантационной генетической диагностики для предотвращения использования гамет, несущих хромосомные аномалии.

SUMMARY. The results of morpho-functional and cytogenetic analyses of 341 oocytes unfertilized in the course of extracorporal fertilization programme are presented. The causes of the «failure» during *in vitro* fertilization of the oocytes are discussed. Relation of the frequency of oocyte chromosome abnormalities (40,2 %) on the patient age and cell maturity has been shown.

РЕЗЮМЕ. Представлено результати морфофункціонального і цитогенетичного аналізу 341 ооцита, незаплідненого в ході проведення програми екстракорпорального запліднення. З'ясовуються причини «невдачі» при заплідненні ооцитів *in vitro*. Показана залежність частоти хромосомних аномалій ооцитів, що склала 40,2 %, від віку пацієнток і ступеня зрілості клітин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Munne S., Cohen J. Chromosomal abnormalities in human embryos // Hum. Repr. Update. — 1998. — 4, № 6. — P. 842–855.
2. Манк М. Биология развития млекопитающих : Методы. — М.: Мир, 1990. — 406 с.
3. Wimmers M.E.C., Van der Merve J.V. Chromosome studies on early human embryos-fertilized in vitro // Hum. Reprod. — 1983. — 3. — P. 894–900.
4. Battin D., Vargyas I. M., Sato F., Brown J., Marr R. P. The correlation between in vitro fertilization of human oocytes and semen profile // Fertil. and Steril. — 1985. — P. 44.
5. Дыбан А. П., Баранов В. С. Цитогенетика развития млекопитающих. — М., 1978. — 216 с.
6. Юнда И. Ф. Бесплодие в супружестве. — Киев, 1990. — 463 с.
7. Грищенко В. И., Парашук Ю. С., Дахно Ф. В., Юрченко Г. Г. Кробиология и проблема бесплодия. — Киев, 1990. — 135 с.
8. Almeida P. A., Bolton V. N. Immaturity and chromosomal abnormalities in oocytes that fail to develop pronuclei following insemination in vitro // Hum. Reprod. — 1993. — № 2. — P. 229–232.
9. Plachot M., Junca A., Mandelbaum I. et al. Chromosome investigation in early life // Hum. Reprod. — 1987. — № 2. — P. 29–35.
10. Roslyn R. Angell. Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man // Hum. Genet. — 1991. — № 86. — P. 383–387.
11. Sai Ma, Dagmar K., Kalousek et al. The chromosomal complements of cleaved human embryos resulting from in vitro fertilization // J. in vitro Fert. Embr. Transfer. — 1990. — № 1. — P. 16–20.
12. Schencer J. Preembryo : Therapeutic approaches // Ann Med. — 1993. — № 3. — P. 256–270.
13. Schencer J. G. Осложнения при лечении бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения // Пробл. репродукции. — 1995. — № 1. — P. 74–79.
14. Sutter P.D., Dhont P. M., Merchiers E., Coetsier T., Verschraegen-Spae M. R., Coppens M. A 45, X/46, XX/47, XXX Female mosaic detected by cytogenetic analysis of unfertilized IVF oocytes // J. Assisted Reprod. and Genet. — 1993. — № 6. — P. 434–437.
15. Thadani V.M. Mice produced from eggs-fertilized in vitro at a very low sperm: eggs ratio // J. Exp. Zool. — 1982. — № 1. — P. 277–283.
16. Trounson A. O., Mohr L. R., Wood C., Leeton J. F. Effect of delayed insemination on in vitro fertilization, culture and transfer of human embryos // J. Reprod. Fert. — 1982. — 64, № 1. — P. 285–291.
17. Pickering S., Taylor A., Jonson M. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos // Mol. Hum. Reprod. — 1995. — 10, № 7. — P. 1912–1922.
18. Wramsby H., Fredga K., Ziedholm P. Chromosome analysis of human oocytes recovered from preovulatory follicles in stimulated cycles // N. Engl. J. Med. — 1987. — № 316. — P. 121–124.
19. Wramsby H., Fredga K., Ziedholm P. Ploidy in human cleavage stage embryos after fertilization in vitro // Hum. Reprod. — 1987. — № 2. — P. 233–236.
20. Michaeli I., Feigin M., Ithetler Y., Isaac Ben Nun, Beyth Y., Amiel A. Chromosomal analysis of unfertilized oocytes and morphologically abnormal preimplantation embryos from an in vitro fertilization program // J. in vitro Fert. Embr. Transfer. — 1990. — № 6. — P. 341–346.
21. Zenzes M. T., Belkien L., Bordt I., Ran Y., Schneider H. P. G., Nieschlag E. Cytologic investigation of human in vitro fertilization failures. — 1985. — № 6. — P. 883–891.
22. Kola I., Trouson A., Dowson G., Rogers P. Triprenuclear human oocytes: Altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos // Biol. Reprod. — 1987. — № 37. — P. 395–401.
23. Wentz A. C., Repp J. E., Maxon W. S., Pittavag D. E., Torbit C. A. The problem of polyspermy in in vitro fertilization // Fertil. and Steril. — 1983. — № 40. — P. 748.
24. Martin R. H., Balkan W., Burns K., Rademaker A.W., Lin C.C., Rudd N. L. The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa // Hum. Genet. — 1983. — № 63. — P. 305–309.
25. Ezra Y., Aceman P., Schencer J. G. Update of in vitro fertilization // Isr. J. Obstet. Gynec. — 1991. — № 2. — P. 149–152.
26. Ezra Y., Schencer J. G. Appraisal of in vitro fertilisation // Eur. J. Obstet. Gynec. — 1993.
27. Propping D., Talber P. F., Zaneveld L. J. D., Charter I. V. Fertilization and Implantation // Human fertilization : Hum. Fert. Int. Workshop. — Essen. — 1978. — P. 152–164.
28. Sutter P. D., Dhont P. M., Vanluchene E., Vandekerckhove D. Correlations between follicular fluid steroid analysis, maturity and cytogenetic analysis of human oocytes which remained unfertilized after in vitro fertilization // Fertil. and Steril. — 1991. — 55, № 2. — P. 958–963.
29. Steptoe P. C., Edwards R. G., Purdy J. M. Clinical aspects of pregnancies established with cleaving embryos grown in vitro // J. Obstet. Gynaecol. — 1980. — P. 757–787.
30. Pellestor F. Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes // Hum Genet. — 1991. — 86, № 1. — P. 283–288.
31. Pieters M.H.E.C., Geraedts J.P.M., Dumoulin J. C. M. et al. Cytogenetic analysis of in vitro fertilization (IVF) failures // Hum. Genet. — 1989. — № 81. — P. 367–370.
32. Plachot M., De Grouchy J., Junca A. et al. Chromosomal analysis of human oocytes and embryos in an in vitro fertilization program // In vitro fertilization and other assisted reproduction. — Worfolk, 1988. — P. 384–397.

33. *Tejada M. I., Mendoza R., Corcostegui B., Benito J.A.* Chromosome studies in human unfertilized oocytes and un-cleaved zygotes after treatment with gonadotropin-releasing hormone analogs // *Fertil. and Steril.* — 1991. — № 5. — P. 874–880.
34. *Edirisinghe W. R., Wales R. G., Chopman H. M., Yovich J. L.* Assisted fertilization of mouse oocytes and preliminary results for human oocytes using zona drilling // *J. in vitro Fert. and Embr. Transf.* — 1991. — № 1. — P. 48–55.
35. *Никитин А. И.* Проблемы периконцептологии и репродуктивная функция человека (роль нарушений ранних этапов репродуктивного процесса в патологии эмбрионов и плода) // *Пробл. репродукции.* — 1995. — № 1. — P. 14–19.
36. *Tarin J., Pellicer A.* Consequences of high ovarian response to gonadotropins: a cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes // *Fertil. and Steril.* — 1990. — № 4. — P. 665–670.
37. *Hunter R.H.F.* Viellissement in vitro ou in vivo de l'ovocyte ou du spermatozoïde et aptitude au développement // *Contracept Fertil.* — 1992. — № 9. — P. 896–902.
38. *Bordson Br. I., Sears L.* The appropriate upper age limit for semen donors: A review of the genetic effects of paternal age // *Fertil. and Steril.* — 1991. — № 3. — P. 397–401.
39. *Boyers S. B., Diamond M. P., Lavy G., Russel J. B., DeCherney A. H.* The effect of polyploidy on embryo cleavage after in vitro fertilization in human // *Fertil. and Steril.* — 1987. — № 4. — P. 624–627.
40. *Soupart P., Strong P. A.* Ultrastructural observation on polyspermic penetration of zona pellucida-free human oocytes inseminated in vitro // *Fertil. and Steril.* — 1975. — № 26. — P. 523.
41. *Michelmann H. W., Mettler L.* Cytogenetic investigations on human embryonic stages // *Fertil. and Steril.* — 1985. — № 2. — P. 320–322.
42. *Papadopolos G., Templeton A. A., Fisk A., Randall I.* The frequency of chromosome anomalies in human preimplantation embryos after in vitro fertilization // *Hum. Reprod.* — 1989. — № 1. — P. 91–98.
43. *Bongso A., Ng Soon-Chye, Lim I., Fay C. Y., Ratnam S.* Preimplantation genetics: chromosomes of fragmented human embryos // *Fertil. and Steril.* — 1991. — № 1. — P. 66–70.
44. *Verlinsky Y., Kuliev A. M.* Preimplantation diagnosis of genetic diseases. — New York, 1992. — 166 p.
45. *Verlinsky Y., Pergament E., Strom Ch.* The preimplantation genetic diagnosis of genetic diseases // *J. in vitro Fert. and Embr. Transfer.* — 1990. — № 1. — P. 1–5.
46. *Стефанович А.В., Барияк И.Р.* Проблемы генетического исследования ооцитов и ранних зародышей человека // *Цитология и генетика.* — 1994. — 28, № 6. — С. 69–76.

Поступила 8.01.03