

М.П. ПЕТРУШКО, В.И. ГРИЩЕНКО,

Н.Н. ЕРОГОВА, В.И. ПИНЯЕВ

Харьковский центр репродукции человека

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРЕХПРОНУКЛЕАРНЫХ ЗИГОТ ЧЕЛОВЕКА В ПРОГРАММЕ ЭКО



Изучены морфо-функциональные и цитогенетические характеристики 34 трехпронуклеарных зигот человека, полученных при оплодотворении ооцитов in vitro. Показано, что 50 % таких эмбрионов триплоидны. Обсуждаются возможные механизмы образования указанной патологии.

© М.П. ПЕТРУШКО, В.И. ГРИЩЕНКО, Н.Н. ЕРОГОВА,
В.И. ПИНЯЕВ, 2004

Введение. Благодаря развитию методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), в особенности метода культивирования гамет и эмбрионов в условиях *in vitro*, появилась уникальная возможность изучать морфо-функциональные, цитогенетические и молекулярно-генетические особенности эмбрионов человека с момента оплодотворения и до стадии вылупившейся бластоцисты. Одной из аномалий оплодотворения ооцитов человека при проведении программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является появление полипронуклеарных зигот. По данным литературы [1–3], от 1 до 6,5 % всех оплодотворенных ооцитов *in vitro* трехпронуклеарны.

Очевидным становится вопрос корреляции между возникновением трехпронуклеарных зигот и триплоидией, поскольку триплоидия — наиболее часто встречающаяся спонтанная геномная абберация в эмбриогенезе человека. У 2–4 % всех диагностированных беременностей определяется указанная хромосомная патология [4]. До развития методов ВРТ существовали лишь теоретические выкладки о возникновении триплоидии у человека и экстраполяция данных, полученных на модельных животных (мышь, золотистый хомячок, крыса, кролик) [5]. Использование метода культивирования гамет и эмбрионов в условиях *in vitro* позволило выяснить причины ее возникновения и изучить триплоидные эмбрионы с применением разнообразных методологических подходов.

Целью настоящего исследования явился анализ частоты возникновения трехпронуклеарных зигот при проведении программы ЭКО, установление степени корреляции в возникновении зигот с тремя пронуклеусами и триплоидией, изучение морфологических характеристик и темпов дробления таких эмбрионов *in vitro*.

Материалы и методы. В работе использовали трехпронуклеусные эмбрионы человека, полученные у пациентов, которые проходили курс лечения бесплодия методом ЭКО в Харьковском центре репродукции человека.

Этап индукции суперовуляции, аспирации ооцитов, подготовка спермиев к оплодотворению и культивирование гамет и эмбрионов проводили по стандартной технологии программы ЭКО [6].

Через 16–20 ч после инсеминации зиготы с тремя пронуклеусами переносили в отдельную лунку со средой культивирования. Наблюда-



Рис. 1. Трехпронуклеусная зигота человека через 18 ч после инсеминации. Ув. 200

ние за развитием эмбриона проводили в течение 7 сут до достижения стадии вылупившейся бластоцисты. Фиксировали эмбрионы по методу Тарковского [7]. Препараты окрашивали в течение 10 мин 1 %-ным раствором Гимза. Анализ метафазных пластин проводили при увеличении $\times 900$.

Результаты исследований и их обсуждение. Получено 2750 зигот после инсеминации 3526 ооцитов. В 34 обнаружили три пронуклеуса (рис. 1).

Все 34 трехпронуклеарные зиготы культивировали в условиях *in vitro* и через каждые 24 ч отмечали морфологические характеристики дробящихся эмбрионов и количество бластомеров.

Прижизненное наблюдение за морфологическими характеристиками и темпами дробления трехпронуклеусных зигот позволило установить, что 44,1 % из них остановили свое развитие на стадии зиготы.

Для дробящихся эмбрионов характерно наличие трех бластомеров через 24 ч культивирования, а не двух, как обычно происходит с нормально оплодотворенными ооцитами.

Так, из 34 клеток в 10 (29,4 %) через 24 ч культивирования наблюдали наличие трех бластомеров. Четыре таких эмбриона продолжили свое дальнейшее развитие и достигли стадии вылупившейся бластоцисты.

Кроме того, темпы дробления трехпронуклеарных эмбрионов опережают аналогичные показатели нормально оплодотворенных ооцитов, поскольку достижение стадии вылупившейся бластоцисты было отмечено через

96–100 ч культивирования (для двупронуклеусных эмбрионов этот временной параметр составляет 120–144 ч).

Все 34 эмбриона были зафиксированы по методу Тарковского, однако пригодными для цитогенетического анализа оказались 18 препаратов. Было обнаружено, что 9 эмбрионов содержали триплоидный набор хромосом, 4 — 69 XXX, один — 69 XXУ, 4 клетки оказались анеуплоидными.

Анализ частоты возникновения трехпронуклеарных зигот показал, что у женщин старше 35 лет данная аномалия оплодотворения встречается чаще, чем у женщин молодого возраста (таблица).

Для всех пациенток использовали протоколы индукции суперовуляции с применением агонистов рилизинг-гормона и метродина, поэтому мы не можем сделать вывод о влиянии схем индукции суперовуляции на возникновение данной патологии оплодотворения. В исследуемой группе в 32 (94,12 %) случаях трехпронуклеусные зиготы возникали после оплодотворения сперматозоидами из нормоспермических эякулятов и только в двух случаях (5,88 %) — при олигоастеноспермии.

Аномальное число пронуклеусов наблюдали в 5 ооцитах (14,7 %), которые в момент аспирации характеризовались как зрелые, в 18 (52,9 %) перезрелых ооцитах и в 11 (32,4 %) незрелых клетках. Как было показано нами ранее, в перезрелых ооцитах вероятность аномального оплодотворения в три раза выше, чем в зрелых

Частота возникновения трехпронуклеарных зигот в зависимости от возраста пациенток

Показатель	I группа, n = 5	II группа, n = 7	III группа, n = 7
Средний возраст пациенток, годы	23,4 $\pm$ 0,68	30,9 $\pm$ 0,8	35,5 $\pm$ 0,7
Количество клеток с трехпронуклеарными зиготами на пациентку	1,4 $\pm$ 0,24	1,8 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,3*
Частота клеток с трехпронуклеарными зиготами от оплодотворенных, %	0,3 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,06	2,7 $\pm$ 0,2*

* $p < 0,05$ — достоверность отличий в сравнении с первой и второй группой.

[8]. Кроме того, число трехпронуклеусных зигот пропорционально возрастало с увеличением частоты оплодотворения аспирированных ооцитов (рис. 2).

Не вызывает сомнения, что возникновение трехпронуклеарных зигот — одна из аномалий оплодотворения *in vitro*.

Важным является вопрос о корреляции между числом пронуклеусов в оплодотворенной яйцеклетке и ее генетическим балансом. Этот вопрос достаточно актуален, поскольку момент анализа зигот в технике ЭКО является наиболее ответственным, и эмбрионы с наличием трех пронуклеусов отбрасываются в связи с высоким риском возникновения хромосомной патологии плода [9].

Триплоидные зародыши возникают по причине дигинии либо диандрии. При дигинии удвоенный набор хромосом в зиготу привносится женской гаметой, при диандрии — мужской.

Диплоидные ооциты могут возникать в результате блокады мейоза в анафазе первого деления созревания, при этом не выделяется первое полярное тельце, и в ооците присутствуют два гаплоидных набора хромосом, которые и формируют два пронуклеуса. Третий пронуклеус образуется при проникновении в ооцит спермия с гаплоидным числом хромосом [10].

Присутствие диплоидного набора хромосом на стадии метафазы 2, образующейся в результате нарушения выделения полярного тельца в первом делении созревания, является одной из первых по частоте встречаемости хромосомной аномалией ооцитов. Частота их появления составляет от 2 до 14 % [11].

Следующий механизм возникновения триплоидии — блокада мейоза на анафазе второго деления созревания. При этом не отделяется второе полярное тельце. При оплодотворении гаплоидным спермием также образуется трехпронуклеарная зигота.

Диандрия возникает при оплодотворении гаплоидного ооцита диплоидным спермием либо при оплодотворении гаплоидного ооцита двумя гаплоидными сперматозоидами. Диплоидия спермиев возникает при блоке первого или второго деления созревания. На основании весьма тщательных цитогенетических исследований было показано, что все диплоидные спермии неподвижны и не могут принимать

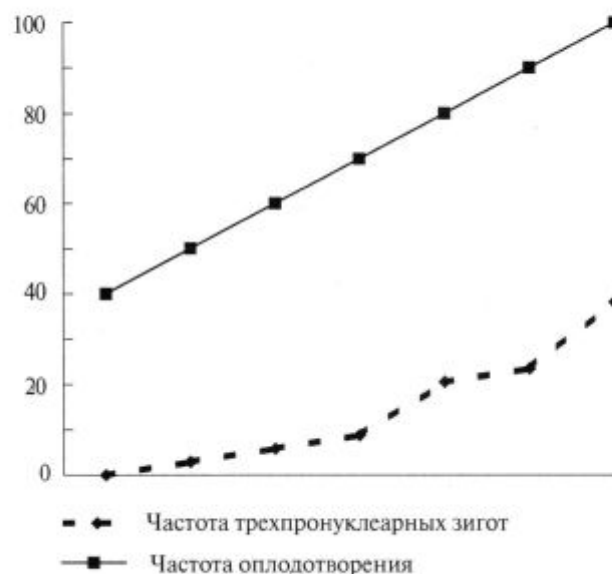


Рис. 2. Частота возникновения трехпронуклеусных зигот в зависимости от частоты оплодотворения; по вертикали — процент оплодотворения; по горизонтали — количество клеток, %

участие в оплодотворении [12]. Прогресс развития методов вспомогательных репродуктивных технологий заставил исследователей вернуться к решенному еще в 70-х годах вопросу. Причиной этого стало открытие и широкое использование техники интрацитоплазматической инъекции спермия в ооцит (ICSI). При отсутствии подвижных сперматозоидов в эякуляте в ооцит вводится неподвижный спермий. Казалось бы, что введение единичного спермия в ооцит гарантирует отсутствие диандрических эмбрионов. Однако цитогенетические исследования показали, что 4 % всех эмбрионов, инъецированных единственным сперматозоидом, имеют три пронуклеуса, причем до 30 % триплоидных зародышей имеют генотип XYY, что явно указывает на природу возникновения таких эмбрионов [13, 14]. Описан тетраплоид 92, XXYY, после ICSI [15].

И, наконец, самым распространенным типом диандрии является полиспермное оплодотворение. При технологии ЭКО, когда в лунку с ооцитами добавляется аликвота активноподвижных сперматозоидов, вероятность полиспермного оплодотворения увеличивается, по данным одних авторов, при возрастании числа добавляемых спермиев [16], по другим данным — при увеличении времени преинку-

бации аспирированных ооцитов, при котором вероятность перезревания клеток довольно высока [17]. По данным этих авторов, в перезревших ооцитах происходят деструктивные изменения, которые выражаются в отсутствии кортикальной реакции, препятствующей проникновению лишних спермиев.

Что касается удельного веса дигинии и диандрии в возникновении триплоидных зародышей, то одни авторы полагают, что 60 % триплоидов обусловлены дигинией, а на долю диандрии приходится 40 % [18], другие авторы считают, что в результате диспермии образуется 85 % полиспермных эмбрионов, а на долю дигинии приходится лишь 15 % [16].

Одни авторы категорически настаивают на запрете использования трехпронуклеарных зародышей для эмбриопереноса ввиду высокого риска триплоидии [19]. По данным других авторов, только 30 % зигот с тремя пронуклеусами триплоиды, остальные же имеют нормальное число хромосом [20]. С помощью современных молекулярно-генетических методов исследований (FISH-анализ) было показано, что уровень триплоидии у трехпронуклеарных зигот в 1,5 раза меньше, чем по данным цитогенетического анализа [21].

Так, среди 24 проанализированных трехпронуклеусных зигот 19 (79,2 %) имели нормальный кариотип, 2 (8,33 %) имели гипергаплоидию, 3 (12,5 %) — гипогарплоидию [22].

С помощью метода гибридизации *in situ* были исследованы хромосомные наборы трехпронуклеарных зигот. Оказалось, что только 13 % из них триплоидны [23].

Таким образом, эмбрионы с тремя пронуклеусами не всегда являются триплоидами. Во-первых, возможны случаи, при которых за пронуклеус принимают цитоплазматическую вакуоль. Во-вторых, возможна элиминация третьего пронуклеуса [22, 24]. В последних опубликованных работах предлагается (с использованием техники микроманипуляций) проводить энуклеацию одного ядра из клетки, чтобы обеспечить нормальное количество хромосом развивающегося эмбриона [25].

Выводы. Частота возникновения трехпронуклеарных зигот человека в программе экстракорпорального оплодотворения составляет 1,23 %. Зиготы с тремя пронуклеусами досто-

верно чаще встречаются у женщин старше 35 лет. Частота возникновения трехпронуклеарных зигот зависит от морфо-функциональных характеристик ооцитов, а также от качественных и количественных характеристик спермограммы. Большинство трехпронуклеусных клеток прекращает свое развитие на стадии зиготы. Эмбрионы, развившиеся из трехпронуклеарных зигот в условиях *in vitro*, демонстрируют высокий уровень асинхронности развития. Половина трехпронуклеусных эмбрионов триплоидны. Необходимым является ведение четкого контроля наличия пронуклеусов во избежание переноса эмбрионов, несущих аномальный набор хромосом, что в свою очередь ведет к ранним эмбриональным потерям и высокой частоте спонтанных аборт.

SUMMARY. Morphofunctional and cytogenetic characteristics of 34 trippronuclear human zygotes obtained during *in vitro* fertilization have been studied. It has been shown that 50 % of them were triploid. Possible mechanisms of formation of this pathology are discussed.

РЕЗЮМЕ. Вивчено морфо-функціональні та цитогенетичні характеристики 34 трьохпронуклеарних зигот людини, отриманих при заплідненні ооцитів *in vitro*. Показано, що 50 % таких ембріонів триплоїдні. Обговорюються можливі механізми утворення даної патології.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьева О.А., Богомолова М.В., Кузнецова Т.В., Козлов В.В. Влияние возраста на частоту гетероплоидии в ооцитах человека // Цитология. — 2000. — 42, № 12. — Р. 1165–1170.
2. Стефанович А.В., Барилляк И.Р. Проблемы генетического исследования ооцитов и ранних зародышей человека // Цитология и генетика. — 1994. — 28, № 6. — С. 69–76.
3. Kola I., Trouson A., Dowson G., Rogers P. Trippronuclear human oocytes: Altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos // Biol. Reprod. — 1987. — № 37. — P. 395–401.
4. Michelmann H.W., Bonhoff A., Mettler L. Chromosome analysis in polyploid human embryos // Hum. Reprod. — 1986. — № 1. — P. 243–246.
5. Дыбан А.П., Баранов В.С. Цитогенетика развития млекопитающих. — М.: Наука, 1978. — 216 с.
6. Элдер К. IVF. Лабораторные процедуры. — Bourn-Hallan group, 1990. — 23 с.
7. Tarkowsky A. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // Cytogenetic. — 1966. — № 5. — P. 394–400.
8. Грищенко В.И., Петрушко М.П., Геродес А.Г. Хромосомный анализ неоплодотворенных ооцитов в

- программе ЭКО // Пробл. репродукции. — 1997. — № 3. — С. 56–58.
9. Balakier H. Trippronuclear human zygotes: the first cell cycle and subsequent development // Hum. Reprod. — 1993. — 8, № 11. — P. 1892–1897.
10. Boyers S.P., Diamond M.P., Lavy G. et al. The effect of polyploidy on embryo cleavage after in vitro fertilization in humans // Ibid. — 1987. — 48, № 4. — P. 624–627.
11. Rosenbusch B.E., Schneider M., Sterzik K. Chromosome analysis of multipronuclear human oocytes fertilized in vitro // Fertil. and Steril. — 1984. — 41, № 4. — P. 538–545.
12. Grossmann M., Calafell J.M., Brandy N., Vanrell J.A., Rubio C., Pellicer A., Egozcue J., Vidal F., Santalo J. Origin of trippronuclear zygotes after intracytoplasmic sperm injection // Hum. Reprod. — 1997. — 12, № 12. — P. 2762–2765.
13. Macas E., Imthurn B., Rosselli M., Keller P.J. The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection // Hum. Reprod. — 1996. — 11, № 11. — P. 2496–2501.
14. Macas E., Imthurn B., Rosselli M., Keller P.J. Chromosome analysis of single- and multipronuclear human zygotes proceeded after the intracytoplasmic sperm injection procedure // J. Ass. Reprod. and Genet. — 1996. — 13, № 4. — P. 345–350.
15. Rosenbusch B.E., Schneider M., Hanf V. Tetraploidy and partial endoreduplication in a trippronuclear zygote obtained after intracytoplasmic sperm injection // Fertil. and Steril. — 1998. — 69, № 2. — P. 344–346.
16. Munne S., Cohen J. Chromosomal abnormalities in human embryos // Hum. Reprod. Update. — 1998. — 4, № 6. — P. 842–855.
17. Никитин А.И., Китаев Э.М., Неронова Е.Г. Нарушение формирования женских гамет и пренатальная патология // Акушерство и гинекология. — 1990. — № 1. — С. 45–47.
18. Beatty R.A. The genetics of mammalian gamete // Biol. Rev. — 1970. — 45. — P. 73–120.
19. Никитин А.И. Проблемы периконцептологии и репродуктивная функция человека (роль нарушений ранних этапов репродуктивного процесса в патологии эмбрионов и плода) // Пробл. репродукции. — 1995. — № 1. — С. 14–19.
20. Plachot. Chromosome analysis of oocytes and embryos // Preimplantation Genetics / Eds Y. Verlinsky, A. Kuliev. — New York: Plenum press, 1997. — P. 103–112.
21. Ma S., Kalousek D.K., Yuen B.H., Moon Y.S. The chromosome pattern of embryos derived from trippronuclear zygotes studied by cytogenetic analysis and fluorescence in situ hybridization // Fertil. and Steril. — 1995. — 63, № 6. — P. 1246–1250.
22. Pieters M.H., Dumoulin J.C., Ignoul-Vanvuchelen R.C., Bras M., Evers J.L., Geraedts J.P.J. Triploidy after in vitro fertilization: cytogenetic analysis of human zygotes and embryos // J. Ass. Reprod. and Genet. — 1992. — 9, № 1. — P. 68–76.
23. Rosenbusch B.E., Schneider M., Sterzik K. The chromosomal constitution of multipronuclear zygotes resulting from in vitro fertilization // Hum. Reprod. — 1997. — 12, № 10. — P. 2257–2262.
24. Rudak E. Chromosome analysis of multipronuclear human oocytes fertilized in vitro // Fertil. and Steril. — 1984. — 41. — P. 538–545.
25. Ivakhnenko V., Cieslak J., Verlinsky Y. A microsurgical technique for enucleation of multipronuclear human zygotes // Hum. Reprod. — 2000. — 15, № 4. — P. 911–916.

Поступила 08.01.03