МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

На правах рукописи

МАКАРОВА Наталья Петровна

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОСТОВУЛЯТОРНЫХ ООЦИТОВ И ИХ РОЛЬ В ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОМ РАЗВИТИИ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

03.03.04. – Клеточная биология, цитология, гистология 03.03.05 – Биология развития, эмбриология

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:

Заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук Курило Любовь Федоровна

ОГЛАВЛЕНИЕ

BB	ЕДЕНИЕ	4
СП	ІИСОК СОКРАЩЕНИЙ	13
ГЛ	АВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	15
1.1	Современные данные о морфологическом созревании женских полови	ЫΧ
	клеток человека	15
1.2	Морфофункциональная характеристика женских половых клеток и	ИХ
	роль в развитии эмбрионов человека	28
1.3	Роль морфологических характеристик клеток эмбриона и блестяш	ей
	оболочки в процессе спонтанного хетчинга	41
ГЛ	АВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
2.1	Сбор образцов и культивирование эмбрионов	48
2.2	Изучение числа копий митохондриальной ДНК в ооцитах в различны	МИ
	морфологическими аномалиями	52
2.3	Проведение преимплантационного генетического скрининга эмбрионо	ЭΒ,
	полученных из ооцитов с различной морфологией	53
2.4	Электронно-микроскопическое исследование ооцитов	55
2.5	Изучение экспрессии генов мРНК генов <i>CTSL2</i> , <i>GATA3</i> , <i>CGB</i>	56
2.6	Статистическая обработка данных	57
ГЛ	АВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И И	ΙX
	СУЖДЕНИЕ	
3.1	. Изучение параметров оплодотворения и раннего эмбриогенеза ооцит	ΌΒ
	с морфологическими нарушениями	
3.2		
	с различными морфологическими аномалиями	
3.3		
	выявленными морфологическими нарушениями	

3.4.	Электронно-микроскопическое изучение ооцитов с н	арушением
	морфологии цитоплазмы	121
3.5.	Изучение влияния морфологических особенностей ооцитов	на процесс
	выхода эмбрионов из блестящей оболочки	128
3.6.	Изучение молекулярно-генетических маркеров разрыва	блестящей
	оболочки и качества эмбрионов	140
3.7.	Поиск связи между наличием блестящей оболочкой	ооцита и
	имплантационным потенциалом бластоцисты	142
ГЛА	ВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .	147
ЗАК.	ЛЮЧЕНИЕ	176
выв	воды	177
СПИ	ІСОК ЛИТЕРАТУРЫ	180

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Цитофизиологическое состояние женских половых клеток существенно влияет как на пре-, так и на постимплантационное развитие эмбрионов, поэтому выявление молекулярно-биологических особенностей ооцитов является одной из наиболее актуальных задач современной клеточной биологии и биологии развития.

Ооциты человека долгое время оставались малоизученными клетками вследствие недоступности этого материала. Комплексный количественный, морфофункциональный и хронологический анализ доовуляторных стадий развития женских половых клеток человека в нашей стране впервые был выполнен Л.Ф. Курило [1981, 1989, 1998, 2000]. развитием экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) зрелые постовуляторные ооциты человека, которые подвергаются оплодотворению, культивированию и прижизненной оценке, стали доступными для изучения. D. Sakkas et al. (2015) установили роль гамет в развитии эмбриона человека в следующей пропорции: 10-15% вклада вносит сперматозоид, а от женской половой клетки зависит 70-80% успешного развития эмбриона. Согласно данным литературы, среди ооцитов существуют значительные морфологические вариации, которые могут влиять на способность к развитию и на потенциальную способность эмбриона к имплантации [65, 124, 25-29, 306].

Наблюдаемые при культивировании in vitro типы аномалий постовуляторных ооцитов можно условно разделить на две группы: К экстрацитоплазматические И цитоплазматические [310]. экстрацитоплазматическим аномалиям относят нарушение строения и формы зоны пеллюцида, дебрис в перивителлиновом пространстве и его резкое увеличение, аномалии первого полярного тельца (увеличение в размере, мультифрагментация), a дегенерация, также нарушение симметрии плазмолеммы ооцита. К цитоплазматическим аномалиям, определяемым на световом уровне при оценке зрелого ооцита, относят гранулярность

цитоплазмы клетки, рефрактерные тельца, вакуоли. Однако влияние описанных типов морфологических нарушений женских половых клеток на развитие эмбрионов in vitro и имплантацию окончательно не определено иза отсутствия систематизированных знаний о значении структурных и функциональных изменений гамет в развитии эмбриона от стадии зиготы до процесса высвобождения бластоцисты из блестящей оболочки.

Выявление морфологических маркеров качества и жизнеспособности постовуляторных ооцитов человека позволит проводить оценку ооцита с целью прогнозирования имплантационного потенциала полученного эмбриона.

Степень разработанности темы исследования

Литературные сведения 0 морфофункциональных изменениях постовуляторных женских половых клеток, их влиянии на развитие эмбриона человека в условиях in vitro фрагментарны. В клинических работах в основном представлены данные, касающиеся вопросов стимуляции функции яичников, числа полученных ооцит-кумулюсных комплексов и зрелых клеток при различных заболеваниях органов репродуктивной системы [36, 37, 118, 318]. В экспериментальных работах на моделях животных показаны ультраструктурные особенности ооцитов разных стадий развития, их микроокружения – клетки кумулюса, тека-клетки, corona radiata, зависимости от нарушений гормонального статуса. При этом в публикациях отсутствуют сведения о влиянии цитофизиологических и молекулярнобиологических изменений женских половых клеток на развитие эмбриона, на особенности его дробления и формирование бластоцисты, а также на его высвобождение из блестящей оболочки [126, 164, 236, 392].

Цель исследования. Установить закономерности влияния цитофизиологических и молекулярно-биологических особенностей постовуляторных ооцитов на преимплантационное развитие эмбрионов человека.

Для успешного решения поставленной цели были определены следующие задачи исследования:

- 1. Оценить распространенность различных типов морфологических изменений женских половых клеток человека в популяции российских женщин.
- 2. Исследовать взаимосвязь между процессом нормального и аномального оплодотворения и различными типами морфологических изменений ооцитов человека. Выявить наиболее значимые морфологические нарушения ооцитов, негативно влияющие на формирование зигот человека в условиях *in vitro*.
- 3. Охарактеризовать молекулярно-биологические особенности эмбрионов человека на 3-и сутки культивирования *in vitro* в зависимости от типа морфологических нарушений ооцитов, из которых данные эмбрионы были получены.
- 4. Проанализировать частоту анеуплоидии в клетках эмбрионов человека, полученных при оплодотворении ооцитов с выделенными типами нарушений. Выявить наиболее тяжелое морфологическое повреждение ооцита, приводящее к высокому риску нерасхождения хромосом в бластомерах эмбрионов.
- 5. Установить связь между повреждениями внутриклеточных структур и развитием эмбрионов с помощью электронно-микроскопического исследования.
- 6. В качестве одного из критериев молекулярно-биологического статуса женской половой клетки оценить количественное содержание митохондриальной ДНК в ооцитах с различными типами морфологических изменений.
- 7. Проанализировать частоту самостоятельного спонтанного хетчинга эмбрионов человека на стадии бластоцисты, полученных из женских гамет с выявленными морфологическими типами нарушений. Оценить

влияние морфологических особенностей клеток трофобласта и эмбриобласта на процесс освобождения бластоцисты от блестящей оболочки.

- 8. Проанализировать уровень экспрессии генов, отвечающих за процесс хетчинга, в клетках трофэктодермы при культивировании эмбрионов человека.
- 9. На основании изученного процесса спонтанного хетчинга эмбрионов на стадии бластоцисты проанализировать эффективность технологии частичного и полного удаления зоны пеллюцида у эмбрионов с различными морфологическими особенностями.

Научная новизна

Впервые проведена комплексная оценка влияния цитоплазматических и экстрацитоплазматических форм нарушений ооцитов человека на раннее доимплантационное развитие эмбриона. Установлено, что наиболее тяжелая из форм морфологических нарушений ооцитов — центральная гранулярность цитоплазмы — негативно влияет на оплодотворение и дробление эмбриона человека, вызывая аномальное расхождение хромосом, что требует применения программ преимплантационного генетического скрининга для успешной имплантации бластоцисты и рождения здорового ребенка.

Впервые изучено число копий мтДНК в ооцитах с различными типами морфологических изменений. Получены уникальные данные о взаимосвязи между числом копий мтДНК и аномалиями зрелой женской половой клетки человека. Показано, что по сравнению с морфологически неизмененными постовуляторные ооциты с цитоплазматическим нарушениями имеют резко сниженное число копий мтДНК. В работе прослежена взаимосвязь частоты анеуплоидии в ядрах бластомеров эмбрионов человека и морфологических изменений ооцитов, из которых получены данные эмбрионы.

Выявлено, что ультраструктурные нарушения цитоплазмы зрелых постовуляторных ооцитов — гипертрофия гладкого эндоплазматического ретикулума и разрушение митохондрий — характеризуются на

светооптическом уровне выраженной гранулярностью цитоплазмы. Это следует учитывать при экстракорпоральном оплодотворении и культивировании эмбрионов человека.

Впервые на эмбрионах человека изучена экспрессия мРНК генов, участвующих в процессе спонтанного хетчинга (ген катепсина L2, экспрессирующийся в клетках трофобласта и эмбриобласта – CTSL2; ген семейства транскрипционных факторов, участвующий в бластуляции – GATA3 и β-субъединица хорионического гонадотропина – CGB), и установлена взаимосвязь уровня их экспрессии с цитофизиологическими особенностями клеток трофобласта и эмбриобласта бластоцист.

Получены уникальные данные по применению метода полного удаления зоны пеллюцида, который позволяет увеличить частоту имплантации эмбрионов человека на стадии бластоцисты с качеством трофобласта класса В и ниже.

Научно-практическая значимость

На основе полученных данных о цитофизиологических и молекулярнобиологических особенностях постовуляторных ооцитов человека и их взаимосвязи с доимплантационным развитием эмбрионов обоснована необходимость и значимость морфологической оценки женских гамет для успешного развития эмбриона человека в доимплантационном периоде. Показано, что цитоплазматические типы нарушений женских половых клеток следует учитывать на всех этапах доимплантационного развития эмбриона для увеличения частоты развития беременности в программах лечения бесплодия методами экстракорпорального оплодотворения. В работе апробирована технология полного удаления зоны пеллюцида, которая эффективной является максимально при низком качестве клеток трофэктодермы – класс В и ниже. Охарактеризованные формы нарушений морфологии женских половых клеток являются прогностически значимыми маркерами качества ооцитов для оптимизации условий культивирования эмбрионов человека in vitro.

Важно отметить, что предлагаемые методы работы с гаметами и эмбрионами человека соответствуют принципам биомедицинской этики и не нарушают права эмбриона [ст.18 Конвенции Совета Европы о защите прав человека и достоинства человеческого существа при использовании достижений биологии и медицины, 1997].

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 — «Клеточная биология, цитология, гистология» и 03.03.05 — «Биология развития, эмбриология».

Методология и методы исследования

Методология заключалась в системном подходе и комплексном анализе результатов морфологического исследования женских половых клеток и их сопоставления с данными о раннем доимплантационном эмбрионов человека, полученными развитии генетическими молекулярными методами. В рамках диссертационного исследования был проведен критический анализ отечественных и зарубежных работ в области строения постовуляторных ооцитов человека, ИХ морфологических особенностей и показателями эмбриологического развития. На основании анализа были сформулированы цель и задачи исследования. В работе были использованы постовуляторные ооциты, зиготы, эмбрионы человека, исследование которых проведено с соблюдением всех международных этикоправовых норм обращения с эмбрионами человека [ст.18 Конвенции Совета Европы о защите прав человека и достоинства человеческого существа при использовании достижений биологии и медицины, 1997].

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования и их решением, использованием комплекса современных молекулярных, генетических и морфологических методов, достаточным объемом данных для каждой модели исследования,

адекватным применением методов статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении их с данными современной литературы.

Основные положения диссертационной работы доложены на XXII Международной конференции Российской ассоциации репродукции человека (Геленджик, 2012); XIII Всероссийском научном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2012); XXV Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 2012); XXIII Международной конференции Российской ассоциации репродукции человека «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Волгоград, 2013); 2nd Biomarker Meeting: Personalized Reproductive Medicine; Biomarkers for the Assessment of Ovarian Reserve, Gametes, Embryos, Endometrium and Pregnancy (Валенсия, Испания, 2014); XXIV Международной конференции Российской ассоциации репродукции человека (Москва, 2014); XV Всероссийском форуме «Мать и дитя» (Москва, 2014); VII Региональном форуме «Мать и дитя» (Геленджик, 2014); XXI Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторнополиклиническая помощь: от менархе до менопаузы» (Москва, 2015); IX Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2015); XXV Международной конференции Российской ассоциации репродукции человека (Сочи, 2015); XXI FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics (Барселона, Испания, 2015); XXVI и XXVII Международной конференции Российской ассоциации репродукции человека (Москва, 2016; Санкт-Петербург, 2017); Proceedings of 5th Asia Pacific Gynecology and Obstetrics Congress (Лондон, Англия, 2018); 5th Asia Pacific Gynecology and Obstetrics Congress (Токио, Япония, 2018); XXVIII Международной конференции Российской ассоциации репродукции человека (Уфа, 2018).

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении исследования, статистической обработке полученных результатов, анализе и

обобщении, формулировании выводов, подготовке публикаций и написании диссертационной работы.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе эмбриологов Отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ. Стандартные операционные процедуры работы с половыми клетками и эмбрионами человека в рамках программ лечения бесплодия с помощью экстракорпорального оплодотворения составлены с учетом результатов данного исследования.

Материалы, представленные к защите, также используются в учебном процессе на кафедре эмбриологии МГУ имени М.В. Ломоносова в цикле «Вспомогательные репродуктивные технологии: клиническая эмбриология» и на базе Научно-образовательного центра вспомогательных репродуктивных технологий имени Фредерика Паулсена ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ в модуле «Экстракорпоральное оплодотворение: эмбриологический этап».

Положения, выносимые на защиту

- 1. Экстрацитоплазматические нарушения морфологии постовуляторных ооцитов не влияют на результаты оплодотворения, дробления и бластуляции эмбрионов человека в условиях *in vitro*. Женские половые клетки человека с экстрацитоплазматическими изменениями следует рассматривать как морфологически нормальные ооциты.
- 2. Морфологические нарушения цитоплазмы женских половых клеток человека гранулярность, агрегаты ГЭР, вакуоли снижают частоту оплодотворения, увеличивают частоту фрагментации на стадии делений дробления, снижают возможность самостоятельного высвобождения бластоцисты из блестящей оболочки.

- 3. Нарушения цитоплазматических структур ооцитов человека повышают риск неравномерного расхождения хромосом на стадии дробления эмбриона, вызывая анеуплоидию. Это требует применения преимплантационного генетического методов скрининга ДЛЯ повышения бластоцисты частоты имплантации рождения генетически здорового ребенка.
- 4. Гранулярность цитоплазмы наиболее является тяжелым морфологическим повреждением ооцита человека. Она связана со снижением числа копий мтДНК и нарушениями в ультраструктурной организации ооцита, что приводит В снижению частоты оплодотворения появлению эмбрионов И cгенетическими нарушениями.
- 5. Процесс естественного хетчинга бластоцист человека в условиях *in vitro* зависит от уровня экспрессии мРНК генов *CTSL2*, *GATA3* и *CGB*, максимальная экспрессия которых выявлена в бластоцистах с качеством трофэктодермы класса А. Естественный хетчинг не зависит от качества клеток внутренней клеточной массы.
- 6. Применение цитологического метода полного удаления зоны пеллюцида у бластоцист с качеством трофэктодермы классов В и С приводит к увеличению частоты имплантации и не влияет на имплантацию эмбрионов с клетками трофэктодермы класса А.

Публикации

Результаты исследования изложены в 24 печатных работах, из которых 12 входят в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, 12 — тезисы российских и зарубежных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена в традиционной форме. Состоит из оглавления, списка принятых сокращений, введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Работа представлена на 227 страницах машинописного текста, иллюстрирована 71 рисунком, 23 таблицами. Библиографический указатель включает 393 научные работы, из них 43 — отечественные публикации и 350 зарубежных.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

a- Γ н $P\Gamma$ — аналоги (агонисты) гонадотропин-рилизинг гормона

АМГ – антимюлеров гормон

 $AT\Phi$ – аденозинтрифосфат

 $A\Phi K$ – активные формы кислорода

ВЗОМТ – воспалительные заболевания органов малого таза

ВКМ – внутренняя клеточная масса

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ГЭР – гладкий эндоплазматический ретикулум

 E_2 — эстрадиол

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит

ИМТ – индекс массы тела

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

 $K\Gamma$ – кортикальные гранулы

кДНК – комплементарная ДНК

 \mathcal{M} – лютеинизирующий гормон

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

MB – микровиллии

мтДНК – митохондриальная ДНК

ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс

ОШ - отношение шансов

ПГС – преимплантационный генетический скрининг

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭ – перенос эмбриона

РНК – рибонуклеиновая кислота

 T_4 — тироксин

ТВП – трансвагинальная пункция

mPHK – транспортная рибонуклеиновая кислота

ТТГ – тиреотропный гормон

 $T\Phi \Theta$ – трофэктодермальный слой

ТЭО – трофэктодермальные отростки

УЗИ – ультразвуковое исследование

 $\Phi C\Gamma$ – фолликулостимулирующий гормон

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЦМ – цитомембраны

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

Arp2/3 – комплекс актин-связывающих белков 2 и 3

dUTP – deoxyuridine 5 triphosphate (дезоксиуридин5 трифосфат)

ESHRE — European Society of Human Reproduction and Embryology (Европейское общество по вопросам репродукции человека и эмбриологии)

GV – germinal vesicle (зародышевые пузырьки)

Fmn2 - Formin2, специфический нуклеатор актиновых филаментов

PBS – Phosphate buffered saline (фосфатно-соляной буферный раствор)

SDS – sodium dodecylsulfate (додецилсульфат натрия)

SER – smooth endoplasmic reticulum (гладкий эндоплазматический ретикулум)

TEP – trophoectodermal projections (трофэктодермальные отростки)

TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferases dUTP end labeling (терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза трансфераз dUTP, в конце анализа маркированная)

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные данные о морфологическом созревании женских половых клеток человека

Созревание женских половых клеток — длительный процесс, который включает как ядерное, так и цитоплазматическое созревание. Ядерное созревание в основном связано с сегрегацией хромосом, которая в настоящее В время достаточно хорошо изучена. цитоплазме зрелого неоплодотворенного ооцита человека различают три основных уровня органелл: кортекс, субкортекс организации И центральный цитоплазматический регион, представляющий собой оставшуюся часть Цитоплазматическое созревание включает реорганизацию цитоплазмы. органелл, накопление мРНК, белков и транскрипционных факторов, необходимых для ядерного созревания ооцитов, оплодотворения и раннего эмбриогенеза. Цитоплазматическое созревание является сложным процессом, и многие его аспекты до сих пор остаются дискуссионными. Правильная пространственная и временная динамика органелл и цитоскелета гарантирует приобретение ооцитом высокой способности к развитию, необходимой для оплодотворения и последующего развития эмбриона [72]. Для того, чтобы приобрел способность необходима ооцит высокую К развитию, реорганизация органелл определенной строгой цитоплазматических морфологии.

Особенности ядерного созревания ооцитов человека. Контроль асимметричных делений.

Мейоз ооцитов у человека состоит из двух асимметричных делений, и каждое деление должно обеспечивать точную сегрегацию материнского генома и асимметричное разбиение цитоплазмы. Основной целью асимметричных делений является сохранение большей части материнских накоплений в ооците для эмбрионального развития. В ооцитах человека асимметрия основывается на миграции и прикреплении веретена деления к

кортексу в ооците М I и его прикрепления к кортексу в М II [78]. При входе в первое мейотическое деление (М I) микротрубочки образуют биполярные веретена. Во время М I веретена микротрубочек располагаются на периферии ооцита. Во время второго мейотического деления (М II) веретена микротрубочек располагаются на периферии ооцита, пока оплодотворение не вызывает отделение второго полярного тела [78].

Реорганизация веретена жестко контролируется сетью микрофиламентов [378]. Однако только недавно сеть микрофиламентов, участвующая в подвижности веретена, смогла быть визуализирована в живых зрелых ооцитах с использованием специфического для F-актина зонда Utr-GFP, что позволило лучше понять процессы, связанные с нею [329]. До миграции микрофиламенты образуют сетку, состоящую из множества тонких нитей. Эта сеть чрезвычайно динамична и постоянно реконструируется. Когда микрофиламенты инициируется миграция веретена, постепенно организуются вдоль веретена и мигрируют в направлении кортекса ооцитов [329]. Хотя роль микрофиламентов в миграции веретена четко установлена, молекулярный механизм участия сети актина в этом процессе еще только выясняется.

ForM In2 (Fmn2), специфический нуклеатор актиновых филаментов, является самым ранним идентифицированным геном, участвующим в формировании динамической актиновой сетки во время миграции веретена в М І. Ооциты у Fmn2-дефицитных мышей имеют хромосомы, которые остаются в центре; первое полярное тельце в подобных случаях также не выделяется. В результате оплодотворения таких ооцитов порождаются анеуплоидные нежизнеспособные эмбрионы [221]. Микроинъекция мРНК, которая кодирует гомолог ForM In1 (FH1) и FH2 домены Fmn2, в Fmn2 -/-ооциты вызывает частичное выделение полярного тельца. Кроме того, Fmn2 соединяется с веретеном деления во время М I [216].

Spire1 и Spire2, два типа нуклеаторов актиновых филаментов, являются вновь выявленными ключевыми факторами в миграции веретена М I в ооцитах [294]. Spire1 и Spire2 взаимодействуют с Fmn2 для опосредованного асимметричного позиционирования веретена путем сборки сети актина, которая служит в качестве «рельс» для движения веретена. После перехода от М I к М II, веретено М II быстро образует прямую связь с кортексом ооцита. Однако мало что известно о механизмах, ответственных за закрепление веретена в кортексе на стадии М II [294].

При изучении комплекса актин-связывающих белков 2 и 3 (Arp2/3) Yi et (2011) обнаружили Arp2/3-зависимый механизм для поддержания кортикальной локализации М II веретена в ооците, подавление активности Arp2/3, по-видимому, нарушало позиционирование подкоркового веретена деления во время остановки М II [390]. Результаты Yi et al. показывают, что хромосомы M II, через сигнализацию Ran, локализуют и активируют комплекс Arp2/3 в проксимальной части кортекса, и что комплекс Arp2/3, в свою очередь, помогает поддерживать веретено близко к кортексу. Роль комплекса Arp2/3 в поддержании положения веретена двойная. Во-первых, активный Arp2/3 создает ретроградный поток актиновых филаментов, что приводит к потоку цитоплазматических частиц, которые толкают веретено к кортексу. Во-вторых, активность комплекса Arp2/3, по-видимому, противодействует миозином-II-индуцированному сокращению, чтобы веретено деления могло отойти от своего кортикального положения [390]. Однако есть еще ряд вопросов, которые необходимо уточнить. Прежде всего, является ли комплекс Arp2/3 единственным актиновым нуклеатором, необходимым для поддержания прикрепления веретена деления во время М II. Еще более важно то, что происхождение потока актиновых филоментов остается неясным, в то время как модель, предложенная авторами, основана на существовании этого потока. И еще один вопрос заключается в том, как поток актиновых филаментов вызывает цитоплазматическую текучесть.

Силы, которые приводят к миграции веретен, также зависят от активности связанных с актином двигателей, называемых миозинами. Миозин 10 необходим для закрепления кортикального веретена в ооцитах Xenopus laevis, где он функционирует как связующий микротрубочки микрофиламент [387]. Транскрипт миозина 10 относительно велик в ооцитах мыши [137], и этот моторный белок может связывать микротрубочки веретена с сетью актина. Миозины активируются киназой легкой цепи миозина (MLCK). Ингибирование MLCK нарушает миграцию веретена [329].

Первое полярное тельце, которое выделяется в процессе мейоза, содержит интактные кортикальные гранулы, небольшие гранулы гладкого (агранулярного) эндоплазматического ретикулума (ГЭР) и микротрубочки. Первое полярное тельце также имеет конденсированную хроматиновую массу, не ограниченную ядерной оболочкой. Присутствие дегенеративного первого полярного тела в ооцитах М II может отражать асинхронность между мейотическим (ядерным) и цитоплазматическим созреванием [135].

Цитоплазматическое созревание ооцитов человека

• Митохондрии

Цитоплазматическое созревание включает в себя ряд сложных событий (в т.ч., синтез белка и транскрипцию цитоплазматической РНК), на осуществление которых требуется энергия. Основной функцией синтез АТФ, митохондрий является поэтому митохондрии играют чрезвычайно важную роль в обеспечении энергии, потребляемой во время процесса созревания ооцитов [244].

Движение митохондрий в районы с высоким энергопотреблением имеет решающее значение для созревания ооцитов. В незрелых ооцитах GV человека митохондрии преимущественно имеют форму от сферических до овальных с вязким матриксом и несколькими дугообразными или поперечными кристами [321]. На этой стадии митохондрии обычно

отсутствуют в кортикальной части цитоплазмы [139]. Митохондрии в ооцитах М I и М II становятся еще более многочисленными и рассеиваются в ооплазме [261, 323]. В отличие от других видов млекопитающих митохондрии ооцитов человека образуют объемные агрегаты с трубочками и пузырьками ГЭР в конце процесса созревания [139, 261, 323]. Эти агрегаты «митохондрии-ГЭР» митохондрио-везикулярные И комплексы ΜΟΓΥΤ участвовать в создании резервуара веществ или мембран для последующего оплодотворения и раннего эмбриогенеза [244]. В ооплазме зрелого ооцита человека на стадии М II имеется большое количество и свободных митохондрий, которые распределены равномерно по всему его объему, обеспечивая АТФ для активности микротрубочек, хромосомного движения и цитокинеза. Митохондриальная дисфункция может приводить, таким образом, к абберантной хромосомной сегрегации, к анеуплоидии в зрелых ооцитах. Дефекты цитокинеза могут также вызывать мозаицизм мультинуклеацию в дробящихся эмбрионах, что вызывает замедление и остановку их развития. Митохондрии в стареющих ооцитах (характерных для женщин в возрасте) обычно собираются вместе, увеличивают свою электронную плотность и бывают связаны с набухшими полупрозрачными ГЭР. везикулами Последние формируют вакуоли митохондрии И располагаются по их периферии. Во время дегенерации женских половых клеток митохондрии могут приобретать внутренние плотные гранулы, Они дезорганизованный матрикс. лизосомы ИЛИ иметь становятся истонченными и окружают везикулы ГЭР. Эти митохондрии тенденцию агрегировать вместе ооплазме, формируя В пятна В дегенерирующем ооците [323].

Рост и созревание ооцита подразумевает как митохондриальный биогенез, так и репликацию митохондриальной ДНК [305]. Каждая митохондрия содержит мультикопийный геном. Митохондриальная ДНК (мтДНК) кодирует 13 существенных субъединиц дыхательной цепи.

Показано, что мужская мтДНК эллиминируется после оплодотворения и до 4-клеточной стадии [204, 305].

Yu et al. (2010) впервые продемонстрировали динамику ATФ во время созревания В нативном ооците мыши, что дало дополнительные доказательства взаимосвязи между митохондриальной организацией и концентрацией АТФ. Скорость продуцирования митохондриального АТФ изменяется при спонтанном созревании ооцитов мыши. По сравнению с ооцитами, задержанными на стадии GV, в период созревания ооцитов наблюдаются три различных увеличения концентрации цитозольных и митохондриальных АТФ, включая три фазы более высокой продукции АТФ и две фазы более низкой продукции АТФ. Первая фаза увеличения производства АТФ происходит во время разрыва зародышевого пузырька. Вторая фаза происходит во время более длинной фазы миграции веретена деления, а третья фаза происходит во время перехода мейоза I (M I) в М II. Это исследование также продемонстрировало, что структура кластеризации коррелирует со временем пиков АТФ. В частности, оказалось, что образование крупных кластеров митохондрий связано с увеличением производства АТФ. Кроме того, разрушение митохондриальных кластеров с помощью введения цитохалазина В приводит к ингибированию всплесков продукции АТФ. Эти результаты показывают, что структура кластеризации коррелирует с всплесками производства АТФ [391].

Из-за критической роли энергетического метаболизма в созревании ооцитов содержание ATФ было предложено рассматривать как показатель потенциала развития ооцитов человека [370].

Количество митохондрий и мтДНК в ооцитах человека варьируется, однако Р. Reynier с коллегами показали, что у пациенток с идиопатическим отсутствием оплодотворения содержание мтДНК в три раза (81 400 против 287 200 копий) меньше контрольной группы [305]. Наследование митохондриального генома не подчиняется законам Менделя, а происходит

так называемое цитоплазматическое наследование, которое в отличие от ядерного происходит по материнской линии.

• Кортикальные гранулы

Кортекс ооцита человека содержит большие плотные кортикальные гранулы, которые являются уникальными органеллами ооцита. Кортикальные гранулы содержат мукополисахариды, протеазы, тканеспецифичный активатор плазминогена, кислую протеазы и пероксидазу и выстраиваются около оолеммы в два-три ряда.

Кортикальные гранулы образуются комплексом Гольджи во время роста ооцитов. Во время раннего фолликулярного роста аппарат Гольджи подвергается гипертрофии и пролиферации, и на этой стадии происходит образование кортикальных гранул из комплексов Гольджи [45]. Сначала маленькие везикулы формируются из гипертрофированных комплексов Гольджи, которые мигрируют под кортекс ооцитов. Эти везикулы затем сливаются с образованием зрелых кортикальных гранул, которые в конечном итоге отделяются от комплексов Гольджи. Кортикальные гранулы имеют диаметр от 0,2 до 0,6 мкм и кажутся морфологически похожими друг на друга на ультраструктурном уровне. Однако при более детальном изучении ооцитов человека было обнаружено, что существует два различных типа кортикальных гранул [181]. Первый: гранулы G1, имеют диаметр 350 нм, содержат гомогенную плотную субстанцию; эти гранулы, вероятно, выделяют свое содержимое до того, как зрелый ооцит выходит из фолликула. Второй – гранулы G2, размером 450 нм, которые имеют зернистое содержимое.

Кортикальные гранулы случайным образом распределяются по всей цитоплазме незрелых ооцитов и мигрируют в сторону кортикальной цитоплазмы во время мейотического созревания [185]. В конце созревания, MII, когда достигают стадии кортикальные гранулы ооциты Кортикальные останавливаются кортексе. гранулы подвергаются В

экзоцитозу, чтобы высвободить их содержимое в перивителлиновое пространство сразу после оплодотворения Этот секреторный процесс Ca²⁺-зависим и известен как кортикальная реакция. Исследование ооцитов человека показало, что кортикальные гранулы также присутствуют в области веретена деления.

Получен ряд доказательств, что миграция кортикальных гранул является процессом, зависящим от цитоскелета, микрофиламенты необходимы для кортикальной транслокации у человека [229]. Как только гранулы располагаются в области кортекса женской половой клетки, они отделяются от структур цитоскелета и остаются в самом кортексе.

При кортикальной реакции плотные кортикальные гранулы сначала раздуваются, а затем сливаются с оолеммой. Это слияние становится возможным благодаря слиянию между собой соседних кортикальных гранул. Затем содержимое гранул выделяется в перивителлиновое пространство через отверстия. В кортексе ооцита некоторые плотные кортикальные гранулы при этом могут оставаться интактными, что является нормальным. Хотя некоторые из этих гранул могут спонтанно выделять свое содержимое в перивителлиновое пространство ДО проникновения сперматозоида, массивный физиологический выброс кортикальных гранул происходит в процессе оплодотворения. Кортикальная реакция И последующее («зоны «затвердевание» 30НЫ пеллюцида реакции») препятствуют проникновению более одного сперматозоида в ооцит, чем блокируют полизооспермию. Также кортекс ооцита М II содержит небольшие светлые везикулы, которые могут располагаться либо близко к оолемме, либо быть распределены между кортикальными гранулами. В этих гранулах найден антимонат, который не присутствует в кортикальных гранулах [343]. В настоящее время предназначение этих гранул неизвестно.

• Созревание эндоплазматического ретикулума

Эндоплазматический ретикулум — замкнутая система мембранных трубочек пузырьков внутри клетки, образующих сложную Мембрана переплетающуюся сеть. эндоплазматического ретикулума морфологически идентична оболочке клеточного ядра и составляет с ней единое целое. Различают два типа эндоплазматического ретикулума: гладкий (ГЭР) и гранулярный. В клетке они выполняют различные функции. На поверхности элементов гранулярного эндоплазматического ретикулума находится большое количество рибосом, которые отсутствуют поверхности гладкого эндоплазматического ретикулума. Мембраны ГЭР морфологически и функционально тесно связаны с митохондриями в цитоплазме ооцита. В зрелых женских половых клетках гранулярный эндоплазматический ретикулум отсутствует. В незрелом ооците на стадии профазы I мейоза ГЭР равномерно распределен по цитоплазме в виде мелких скоплений. В зрелом ооците человека (в отличие от ооцитов мыши) на стадии метафазы II (М II) ГЭР в комплексе с митохондриями формирует крупные агрегаты, равномерно распределенные по кортикальной и центральной области цитоплазмы, без видимой полярности относительно веретена деления [147, 236]. Это связывают с тем, что поверхность ооцита человека покрыта микроворсинками равномерно, слияние со сперматозоидом равновероятно во всех областях оолеммы, а следовательно, распределение Γ ЭР должно обеспечивать возникновение волны Ca^{2+} в любом районе цитоплазмы [319]. Реорганизация ГЭР в ооцитах происходит при участии цитоскелета: микротрубочки активны во время формировании плотного кольца ГЭР, а микрофиламенты — при образовании гранул [147].

Основная функция ГЭР в ооците — хранение Ca^{2+} . Изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} (iCa^{2+}) создают предпосылки для активации ооцита при оплодотворении. Начальное увеличение (нарастание) концентрации iCa^{2+} обеспечивается в основном за счет высвобождения Ca2+ из ЭР в месте слияния ооцита со сперматозоидом, и затем сигнал

распространяется по цитоплазме. В ооцитах млекопитающих высвобождение Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму инициируется инозитол 1,4,5-трифосфатом (IP3). При связывании сперматозоида со специфическими рецепторами на оолемме, запускается каскад активации фосфолипазы С (PLC) и образуется IP3, который в свою очередь рецепторами мембране взаимодействует c на ЭР И инициирует высвобождение Ca2+. Кроме того, в головке сперматозоида имеются ооцитактивирующие факторы (PLCzeta, Tr-kit и др.). После слияния мембран сперматозоида и яйцеклетки эти факторы оказываются в ооплазме и так же, как PLCzeta, запускают процесс образования IP3. Повышение концентрации Ca2+ в цитоплазме приводит к активации других молекул PLC, образованию IP3 и дополнительному высвобождению Ca²⁺ из внутриклеточных мест хранений. Концентрация iCa²⁺ возрастает в сотни раз, а потом возвращается к исходному уровню: ионы кальция возвращаются в ЭР с помощью Ca²⁺-АТФазы или выделяются из клетки через плазматическую мембрану посредством Ca^{2+} -АТФазы и $Na+/Ca^{2+}$ -каналов. Таким образом, волна Ca^{2+} распространяется по цитоплазме ооцита [313] и продолжается волнообразно вплоть до момента формирования пронуклеусов [200]. Внутриклеточное высвобождение Ca²⁺ предотвращает полизооспермию, вызывает активацию ооцита и инициирует синтез белков после оплодотворения [119–120].

• Реорганизация цитоскелета

Ооциты человека содержат основных цитоскелетных три типа филаментов: микрофиламенты, промежуточные филаменты И микротрубочки. Цитоскелет собой представляет динамическую И адаптируемую структуру, которая может оставаться неизменной или подвергаться модификации в соответствии с потребностями клетки. Три типа образованы субъединицами. нитей цитоскелета определенными Микротрубочки состоят из глобулярных и уплотненных субъединиц тубулина, тогда как микрофиламенты состоят из аналогично глобулярных и уплотненных актиновых субъединиц. Промежуточные филаменты состоят из удлиненных и волокнистых полипептидных субъединиц, расположенных в тетрамере, аналогично субъединицам а- и β-тубулина в микротрубочке и актиновому мономеру. Эти три типа цитоскелетных «полимеров» поддерживаются слабыми нековалентными взаимодействиями и могут быстро связываться и диссоциировать без необходимости образования новых или разрушения старых ковалентных связей.

Микротрубочки демонстрируют относительно равномерное распределение в ооцитах мышей на стадии GV. Микрофиламенты также разбросаны по всей ооплазме [350]. После разрыва ядерной мембраны и перехода в стадию M I микротрубочки конденсируются вокруг хромосом и начинают мигрировать в кортекс, в то время как микрофиламенты плотно области накапливаются В подкорковой ооцитов, особенно вокруг мейотического веретена ооцита. В М II-стадии зрелые ооциты мыши, микротрубочки и микрофиламенты в основном накапливаются в области кортикальной цитоплазмы. Кроме того, микротрубочки выглядят как полностью организованные мейотические веретена, которые являются симметричными, биполярными, бочкообразными и ориентированными параллельно поверхности ооцита [171]. Аналогичные особенности цитоскелетного распределения наблюдаются в ооците человека на стадии GV, тогда как ооцит на стадии М II отличается в ориентации веретена. Веретено деления ооцита человека на стадии М II часто ориентировано перпендикулярно поверхности ооцита, оно имеет бочкообразную форму, анастрально и не имеет центриолей [324].

По сравнению с микрофиламентами и микротрубочками третий компонент цитоскелета, промежуточные филаменты, до сих пор плохо изучен. С.Е. Plancha впервые описал организацию и динамику цитоплазматических промежуточных филаментов во время созревания ооцитов у хомяка. В ооцитах хомяка, остановленных на профазе-I-

полностью выращенных цитокератинов, первый цитоплазматический белок 4-10 промежуточных филаментнов, ограничивается крупными кортикальными агрегатами, соответствующими обширным сетчатым линиям промежуточных филаментов. Эти крупные агрегаты распределяются на несколько мелких скоплений, начиная с М І, до конца периода созревания в М II. Здесь цитокератин представлен как пятнистая структура, которая равномерно распределена по всей цитоплазме, и большие пятна уже не могут быть идентифицированы [295]. Тем не менее, для реконфигурации цитокератина не требуется мейотическая прогрессия к М II, потому что ооциты M I также проявляют рассеянные цитоплазматические очаги в конце периода культивирования. Перераспределение цитокератинов цитохалазину D, нечувствительно К нокодазолу И ингибирующих соответственно микротрубочки и микрофиламенты, а следовательно, оно происходит независимо от микротрубочек и микрофиламентов [295]. Однако вопрос о роли промежуточных нитей во время созревания ооцитов человека остается открытым.

• Аппарат Гольджи

Аппарат Гольджи играет центральную роль во многих внутриклеточных событиях, связанных с модификацией и доставкой белка. В ооцитах мыши на стадии GV аппарат Гольджи распределен по всей ооплазме в виде непрерывной мембранной системы, но он немного более концентрирован во внутренней области, чем в кортексе [256]. При разрыве зародышевого оболочка распадается пузырька ядерная И исчезает, хромосомы конденсируются, а аппарат Гольджи подвергается фрагментации, что подтверждается накоплением точечных структур в центральной части ооцита. Далее аппарат Гольджи фрагментируется и распределяется по всему ооциту в M I, и это распределение сохраняется после выделения первого полярного тельца в ооцитах М II [256].

Исследования с использованием электронной микроскопии показывают в цитоплазме незрелых ооцитов типичные комплексы Гольджи, состоящие из цистерн с гладкими поверхностями. Везикулы обычно наблюдают на стадии GV у ооцитов человека, но они редко встречаются в ооцитах М II, и, как было показано, кортикальные гранулы появляются из мембран аппарата Гольджи в ооцитах человека [324]. Авторы сообщили о двух пиках активности аппарата Гольджи: во время образования кортикальных гранул и в ооцитах на стадии GV. Вопреки многочисленным сообщениям, динамика поведения мембран аппарата Гольджи, механизм реорганизации его мембраны в эндоплазматический ретикулум и значимость разборки аппарата Гольджи во время созревания ооцитов у человека остаются дискуссионными. Также недостаточно изучены функции аппарата Гольджи в ооцитах на стадии GV.

Известно, что аппарат Гольджи является платформой для множества цитоплазматических белков, роли которых в клетке разнообразны. Было доказано, что многим белкам свойственны неожиданные функции в контроле поляризации, миграции и деления клеток [98]. Однако в большинстве предыдущих исследований основное внимание уделялось митотическим клеткам, и роль таких белков в мейозе женских половых клеток человека до сегодняшнего дня осталась неизвестной. *GM130*, CIS-белок аппарата Гольджи, играет ключевую роль в различных митотических событиях, но его функция в мейозе ооцитов человека также остается неизвестной. Недавнее исследование показало, что GM130 локализуется на полюсах веретена как на этапе M I, так и на M II и связан с экваториальной пластинкой в телофазе I [392]. Zhang Ch.-H. et al. также предполагали, что GM130 регулирует организацию микротрубочек и играет роль в организации веретена деления, миграции и асимметричном делении во время созревания яйцеклеток.

Достоверно показано, что аппарат Гольджи активно функционирует в ооцитах человека на стадии GV. На данной стадии требуются цельные

функциональные мембраны аппарата Гольджи, а затем по мере созревания клетки аппарат Гольджи фрагментируется и для созревания больше не нужен [256].

• Плазматическая мембрана

Женские половые клетки человека имеют уникальную структуру поверхности. Зрелые ооциты окружены интактной, четко структурированной плазматической мембраной cмногочисленными ee выступами микровиллиями (микроворсинками), остов которых состоит ИЗ микрофиламентов. Их основным компонентом является актин. Основная функция микроворсинок — питание и способствование проникновению сперматозоида. Все микроворсинки обеспечивают питание клеток; при этом важнейшая специфическая функция микровиллий ооцитов заключается в что они способствуют проникновению сперматозоида. Именно TOM, мембрана плазматическая служит разграничительным барьером при оплодотворении препятствует полиспермии. При оплодотворении И окружают сперматозоида, способствуя микровиллии головку проникновению в ооцит. В большинстве случаев сперматозоид, пройдя через слой клеток кумулюса, взаимодействует с зоной пеллюцида, пенетрирует ее с помощью фермента акрозина (акросомная реакция), входит перивителлиновое пространство и контактирует с микроворсинками ооцита. Проникновение начинается с постакросомной пластинки на поверхности сперматозоида, а затем его ядро выпускается в цитоплазму ооцита. При различных повреждающих воздействиях на ооцит происходит деформация и плазматической мембраны, a количество микроворсинок существенно снижается [323]. Получены единичные наблюдения случаев, когда сперматозоид проникает в ооцит в области, лишенной микроворсинок [203].

1.2. Морфофункциональная характеристика женских половых клеток и их роль в развитии эмбрионов человека

На сегодняшний день экстракорпоральное оплодотворение позволяет оценить морфологию женских половых клеток, использовать их для оплодотворения и наблюдать за развитием эмбрионов человека *in vitro*.

В рамках программ лечения бесплодия методами экстракорпорального оплодотворения при стимуляции суперовуляции когорта получаемых ооцитов может быть разная. Одни ооциты обладают «идеальными» в точки морфологией: зрения клинического эмбриолога светлая, умеренно гранулярная цитоплазма, небольшое перивителлиновое пространство, интактное первое полярное тельце, круглая и бесцветная прозрачная Другие оболочка (или зона пеллюцида). ооциты, получаемые трансвагинальной пункции яичников, обладают выраженными морфологическими Все встречающиеся клинической нарушениями. практике аномалии ооцита можно условно разделить на две группы: К [307]. экстрацитоплазматические И цитоплазматические экстрацитоплазматическим аномалиям относят нарушение строения и формы зоны пеллюцида, дебрис в перивителлиновом пространстве и его резкое увеличение, аномалии первого полярного тельца (увеличение в размере, дегенерация, мультифрагментация), а также нарушение симметрии оолеммы ооцита. К цитоплазматическим аномалиям, определяемым на световом уровне при оценке ооцита, относят гранулярность цитоплазмы клетки, агрегаты ГЭР, рефрактерные тельца, вакуоли. Ниже описаны наиболее значимые морфологические изменения ооцитов человека, которые можно наблюдать в рутинной практике эмбриолога, и их влияние на процесс оплодотворения и дробления эмбрионов человека.

Экстрацитоплазматические аномалии ооцита человека

Аномалии первого полярного тела

Мейоз женских половых клетках человека включает два последовательных ассиметричных мейотических деления, которые приводят к экструзии первого и второго полярных тел. По наличию/отсутствию первого полярного тела в циклах ИКСИ можно судить о степени готовности ооцита к оплодотворению. Только ооциты на стадии профазы I второго мейотического деления (М II) пригодны для оплодотворения методом ИКСИ. Часто при стимуляции суперовуляции можно видеть женские половые клетки с аномалиями первого полярного тела: это фрагментация, увеличение размера, нарушение формы. Согласно нашим наблюдениям, наибольшее влияние на оплодотворение и дальнейшее развитие эмбриона оказывают только первые две из перечисленных аномалий. Наши наблюдения подтверждают работы Т. Ebner с коллегами [125], которые изучали влияние изменений первого полярного тела на оплодотворение, дробление и имплантацию эмбрионов в циклах ИКСИ. Авторы выделили следующие аномалии: группа 1 — круглое или овоидное первое полярное тельце с гладкой поверхностью, группа 2 — полярное тельце круглое/овоидное с гранулярной поверхностью, группа 3 — фрагментированное полярное тельце и группа 4 — резко увеличенное полярное тельце с соответствующим резким перивителлинового пространства. Было увеличением показано, что атипичная морфология первого полярного тела в группах 3 и 4 приводит к снижению частоты оплодотворения и большему числу эмбрионов плохого качества. Ооциты из группы 4 авторами признаны непригодными для оплодотворения и переноса по причине высокого риска анеуплоидии в клетке. Ассиметричное клеточное деление, которое наблюдается при выбросе первого второго полярных тел, является уникальной характеристикой мейоза человека [226]. Для данного события важна правильная архитектоника клетки (B частности, полимеризация стабилизация микрофиламентов ооцита), именно поэтому соответствующий размер первого полярного тела — необходимый признак правильной плоидности клетки.

Перивителлиновое пространство

Перивителлиновое пространство зрелых ооцитов человека может варьировать как по размеру (увеличено или нет), так и по содержанию гранулярности (присутствует или нет). По нашим наблюдениям, увеличенное перивителлиновое пространство чаще всего присутствует в ооцитах женщин старшего репродуктивного возраста. Данная аномалия всегда сочетается с резко увеличенным первым полярным тельцем, что служит прогностическим фактором низкого потенциала развития таких клеток. Это отражается на частоты появления В циклах ИКСИ. некотором снижении ЗИГОТ Гранулярность перивителлинового пространства можно наблюдать только в ооцитах на стадии М II, в клетках М I и GV дебрис не обнаруживается. Причина его появления в настоящий момент не выяснена.

Зона пеллюцида

Зона пеллюцида (прозрачная оболочка) — внешняя оболочка ооцита, конгломерат из гликопротеинов, синтезируемых и секретируемых растущим ооцитом и клетками гранулезы, который утолщается по мере роста ооцита. Зона пеллюцида защищает ооцит во время раннего развития до момента имплантации, когда эмбрион движется по фаллопиевым трубам в матку.

У человека зона пеллюцида состоит из четырех гликопротеинов, названных ZP 1, ZP 2, ZP 3 и ZP 4 [101, 223]. Эти гликопротеины синтезируются как длинные гликозилированные полипептидные цепи, требуют дальнейшего процессинга которые И протеолитического секреции аппаратом Гольджи расщепления ДО ИХ И последующей полимеризации [207]. Функции каждого гликопротеина, входящего в состав зоны пеллюцида ооцита человека, суммированы в таблице 1. Зона пеллюцида зрелого ооцита представляет собой сеть многочисленных пор и выемок, которые создаются благодаря трехмерной организации филаментов. В зоне пеллюцида можно различить внутреннюю и внешнюю зоны, имеющие

небольшие отличия. Внутренняя зона более плотная, чем область, контактирующая с клетками лучистого венца (или corona radiata, внешняя зона). Пористая структура зоны пеллюцида может изменяться по мере роста и развития ооцита. Благодаря сканирующему электронному микроскопу выяснилось, что поверхность зоны пеллюцида ооцитов хорошего качества имеет четко обозначенную пористо-ячеистую структуру, в то время как зона пеллюцида ооцитов, имеющих низкий потенциал к оплодотворению (за счет того, что связывание сперматозоидов с зоной пеллюцида снижается), представляет собой губкоподобное компактное строение [233]. Зона пеллюцида играет существенную роль при естественном оплодотворении гамет, во время которого сперматозоиды связываются с ооцитом после акросомальной реакции посредством рецепторов, находящихся поверхности зоны пеллюцида. Показано, что гликопротеины зоны вызывают гиперактивацию сперматозоидов [79].

Таблица 1. Функции гликопротеинов, входящих в структуру зоны пеллюцида ооцита человека

Глико-	Функция
протеин	
ZP 1	Поддержка трехмерной структуры зоны пеллюцида
ZP 2	Вторичный рецептор сперматозоида, который вызывает
	связывание сперматозоида с прореагировавшей
	акросомой с зоной пеллюцида
ZP 3	Индукция акросомальной реакции
	Способствование гиперактивации сперматозоида
ZP 4	Поддержка трехмерной архитектуры зоны пеллюцида,
	создание зоны матрикса

Аномальная продукция или секреция гликопротеинов ZP 1—4 может приводить к изменению структуры зоны и неспособности связывания с ней сперматозоидов, что приводит к нарушению оплодотворения. В циклах ВРТ часто можно наблюдать появление ооцитов с нарушенной зоной пеллюцида — уплотнением, деформацией, изменением строения, которые успешно преодолеваются с помощью техники ИКСИ. При этом необходимо отметить, что неправильный рост и созревание ооцита с вовлечением нарушений

продукции или секреции гликопротеинов зоны пеллюцида может приводить к нарушению оплодотворения, т.е. морфологически аномальная зона — прогностический признак патологии ооцита.

Нарушения морфологии цитоплазмы ооцитов человека

Цитоплазматическая зрелость определяется совокупностью процессов, которые подготавливают ооцит для активации и оплодотворения выбросом кальция, продукцией глютатиона, компетентным экзоцитозом. Возможно анализировать цитоплазматическое созревание ЛИШЬ ПО некоторым отдельным аспектам, чаще всего по видимым дефектам цитоплазмы (среди них агрегаты гладкого эндоплазматического ретикулума, гранулярность, цитоплазматические включения, вакуоли). Нарушения цитоплазматической организации могут быть связаны с нарушением оплодотворения и дальнейшего развития эмбриона. Цитоплазматическая незрелость женской половой клетки не преодолевается методом ИКСИ.

Рефрактерные тела

Рефрактерные тела — наиболее часто встречаемая патология ооцитов, полученных в результате стимуляции овуляции в циклах экстракорпорального оплодотворения [281]. Впервые на данную патологию в цитоплазме ооцитов обратила пристальное внимание Veeck L. [375]. Она пришла к выводу, что рефрактерные тела — структуры диаметром приблизительно 10 мкм, которые хорошо преломляют свет и содержат липидный материал и плотные гранулы.

В настоящее время публикаций, посвященных данной патологии ооцита, очень мало. Основным научным исследованием по этой теме считают работу доктора J. Otsuki et al. [281]. В ней было показано, что рефрактерные тела в цитоплазме ооцитов (как зрелых, так и незрелых – GV, М I, М II) содержат липофусцин. Была прослежена тенденция накопления липофусцина и появления рефрактерных тел у одной и той же пациентки при

повторном лечении бесплодия. Отметим, что рефрактерные тела, содержащие липофусцин, также можно наблюдать и в 4-х, 8-ми клеточных эмбрионах, а также в морулах и бластоцистах.

Липофусцин — пигмент, который пассивно накапливается цитоплазме постмитотических и слабопролиферирующих клеток (в основном лизосом), внутри И содержит сложные ядра, липиды Содержание дегенеративный материал. липофусцина цитоплазме увеличивается по мере старения организма и при некоторых патологических процессах. Липофусциновые тела часто называют метаболическими часами, появление которых зависит как от генетических причин, так и от условий, окружающих клетку [74]. Липофусцин также часто называют «коричневым пигментом изнашивания». J. Otsuki показал, что появление в ооцитах человека липофусциновых тел при стимуляции овуляции никак не связано с возрастом пациентки [281]. Накопление липофусцина в показатель патологического процесса, протекающего в клетке, и он никак не связан с общим старением организма. Нельзя исключать, что накопление липофусцина в клетке служит маркером начавшегося апоптоза. При оплодотворении ооцитов с рефрактерными тельцами методом классического ЭКО частота оплодотворения остается низкой и не превышает 2%, по данным все того же J. Otsuki et al. При этом при использовании методики ИКСИ частота оплодотворения не снижается ПО сравнению непораженными ооцитами. J. Otsuki et al. связывает данный факт с возможным повреждением механизма взаимодействия гамет, в частности, с нарушением связывания 30НЫ пеллюцида co сперматозоидами преждевременной кортикальной реакцией, повреждением плазматической мембраны ооцита И последующей невозможностью проникновения сперматозоида в ооцит.

В исследовании, проведенном J. Otsuki et al., при сравнении протоколов стимуляции суперовуляции никаких статистически значимых различий не

обнаружено, равно как и зависимости от возраста пациентки. В любом липофусцина случае, накопление В цитоплазме ооцитов ОНЖОМ рассматривать как результат адаптации клетки К неблагоприятным окружающим условиям, таким как уменьшение поступления кислорода в ткань яичника или воздействие экзогенных репротоксикантов.

Гранулярность

Грубозернистая деструкция цитоплазмы ооцита — достаточно редко встречающаяся аномалия женских половых клеток. В настоящий момент опубликовано несколько работ, посвященных изучению ооцитов центрально расположенной гранулярностью [66, 202, 370]. Kahraman S. c коллегами (2008) не выявил зависимости между центрально расположенной гранулярностью ооцитов и дальнейшим развитием эмбрионов, однако беременностей количество развивающихся группе гранулярностью оказалось значительно ниже. Авторы предполагают, что гранулярность служит признаком цитоплазматической незрелости. Данная аномалия может поражать как все ооциты пациентки, так и некоторые из полученной когорты, при этом у некоторых женщин во всех попытках экстракорпорального оплодотворения ооциты были с данной патологией, независимо от протокола стимуляции суперовуляции.

Ваlaban В. с коллегами, напротив, отмечал снижение выживаемости после криоконсервации и нарушение развития эмбрионов, полученных из ооцитов с центральной гранулярностью [66]. Van Blerkom (1995) показал, что ооциты М II с грубозернистой деструкцией цитоплазмы имеют более низкий внутриклеточный рН, содержание АТФ и часто анеуплоидный набор хромосом с их рассеиванием [370]. Авторы связывают появление гранулярности внутри ооцита с гипоксией фолликулов в процессе фолликулярного роста.

Вакуолизация

Под вакуолизацией понимают цитоплазматические включения, окруженные мембраной и заполненные жидкостью. Иногда внутри вакуолей онжом наблюдать дегенерирующие органеллы клетки (лизосомы, митохондрии и пр.). Вакуоли могут появляться в ооците или бластомерах на любом этапе развития, быть единичными или многочисленными. Жидкость, своему составу близка заполняющая вакуоли, ПО содержимому перивителлинового пространства [128]. Вакуоли часто можно обнаружить в дегенерирующих и незрелых ооцитах. Потенциал дальнейшего развития эмбрионов с вакуолями ооцитов и значительно снижен. Согласно зарубежным данным, только 12,5% вакуолизированных ооцитов достигают стадии бластоцисты по сравнению с 48,6% в контроле, также существенно снижена частота оплодотворения таких ооцитов (с 65,3% до 48,9%) [128]. Оплодотворение ооцита отсутствует при вакуолях, размер которых превышает 14 мкм. Авторы, исследовавшие эту проблему, объясняют это так: большая вакуоль смещает веретено деления с позиции близ первого полярного тела, а также вызывает нарушение архитектоники цитоплазмы (смещение микротрубочек), что препятствует нормальному движению [128]. Поэтому целесообразно пронуклеусов непосредственно процедурой ИКСИ идентифицировать положение веретена деления и проводить оплодотворение ооцита, избегая его повреждения. Также было отмечено увеличение частоты наступления биохимических беременностей после переноса эмбрионов, полученных из ооцитов с вакуолями [282]. В любом случае, как при множестве мелких, так и при одной крупной вакуоли ооцит имеет сниженный потенциал оплодотворения и дальнейшего развития.

Агрегаты гладкого эндоплазматического ретикулума

Круглые гладкие прозрачные диски, находящиеся, как правило, в центре ооцита, принято идентифицировать как агрегаты гладкого эндоплазматического ретикулума [336]. Световая микроскопия показала, что в норме ГЭР не визуализируется. Однако аномально большие агрегаты,

получившие в англоязычной литературе название SER, обнаруживаются после денудации перед проведением процедуры интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцитах, но только на стадии М II и никогда не выявляются на стадиях метафазы I (М I) и GV. Они располагаются в центральной части клетки, и представляют собой круглые полупрозрачные образования, которые легко отличить от цитоплазматических вакуолей при использовании инвертированного микроскопа. Различают три группы агрегатов (по диаметру): большие (более 18 мкм), средние (10-17 мкм) и малые (2-9 мкм), которые не видны в световой микроскоп.

В одной когорте ооцитов могут присутствовать как ГЭР-позитивные, так и ГЭР-негативные клетки. При культивировании неоплодотворенных ооцитов в течение 2-5 суток, в ГЭР-позитивных клетках агрегаты средних размеров увеличиваются в диаметре до 25 мкм в течение 18 часов, а в ГЭР-негативных ГЭР-позитивных большинстве клеток В шиклах экстракорпорального оплодотворения формируются большие агрегаты в центральной или кортикальной области цитоплазмы. При проведении ИКСИ видимые диски ГЭР исчезают через 16-20 часов после оплодотворения непосредственно перед моментом формирования пронуклеусов [282]. Кроме того, ГЭР часто обнаруживают в случае неудачи процедуры классического экстракорпорального оплодотворения, когда через 18 часов после добавления взвеси сперматозоидов к ооцитам оплодотворение не происходит [247, 385].

Описанное ранее отсутствие беременностей у пациенток, ооциты которых имели цитоплазматические включения в виде дисков ГЭР, дало основание полагать, что такие ооциты непригодны для процедуры ИКСИ [336]. Однако в настоящее время у специалистов нет единого мнения о клиническом значении дисков ГЭР в ооцитах человека; имеющиеся данные противоречивы.

- J. Otsuki et al. проводили сравнение 170 ГЭР-негативных и 18 ГЭРпозитивных циклов экстракорпорального оплодотворения. Помимо оплодотворения ГЭР-негативных ооцитов из ГЭР-позитивных циклов, исследователи осуществили процедуру ИКСИ на 11 ГЭР-позитивных ооцитах. Развитие 9 из 11 эмбрионов остановилось на различных стадиях (от стадии четырех бластомеров до морулы), и только 2 из 11 сформировали экспандированные бластоцисты. Частота оплодотворения частота дробления были одинаковы у эмбрионов в обеих группах, однако количество эмбрионов отличного качества было выше в ГЭР-позитивных циклах, а количество эмбрионов хорошего качества – в ГЭР-негативных. Частота наступления биохимических беременностей была выше в ГЭР-позитивных циклах, а частота наступления клинических беременностей — в ГЭРнегативных. В одном ГЭР-позитивном цикле ВРТ был рожден один ребенок с синдромом Беквита-Видемана (эпигенетическое заболевание) [282]. При сравнении 60 ГЭР-позитивных циклов ВРТ и 52 ГЭР-негативных [314] было показано значимое снижения частоты оплодотворения и дробления, а также частоты формирования бластоцист в ГЭР-позитивных циклах. Однако частота наступления беременностей была сопоставима в обеих группах. Кроме того, авторы сравнивали исходы ГЭР-позитивных циклов, разбив их на три подгруппы: 1 – эмбрионы на перенос были получены из ГЭРпозитивных ооцитов, 2 – эмбрионы на перенос были получены из ГЭРнегативных ооцитов, 3 – смешанная группа. При сравнении подгрупп количество развивающихся беременностей, частота имплантации, количество родов и новорожденных были существенно ниже в 1 и 3 группах. В группе 1 было выше количество эктопических беременностей и ниже среднее время гестации, а также был рожден один ребенок с небольшим дефектом межжелудочковой перегородки.
- S. Wallbutton и J. Kasraie описали 3 цикла экстракорпорального оплодотворения, проведенные у одной семейной пары, в которых

обнаруживали ооциты с дисками ГЭР в цитоплазме. В первом цикле было получено 15 ооцитов, была добавлена взвесь сперматозоидов к ооцит-кумулюсным комплексам, но оплодотворение не наблюдали ни в одной клетке. При этом 24-х часовая выживаемость сперматозоидов была в норме, связывание их с зоной пеллюцида было минимальным, все ооциты были зрелыми (М II), а в цитоплазме большинства из них были обнаружены диски ГЭР. Во втором цикле из 20 полученных ооцитов 90% содержали видимые кольцевые агрегаты ГЭР, и в 8 наблюдали оплодотворение после ИКСИ. В третьем цикле из 13 зрелых ооцитов оплодотворились 7. Ни в одном из проведенных циклов ИКСИ не было достигнуто беременности [385].

Все эти работы в той или иной степени показывают, что наличие ГЭР дисков ооцитах на негативно влияет на исходы циклов экстракорпорального оплодотворения. Однако самые последние исследования противоречат уже имеющимся данным. I. Mateizel et al. провели ретроспективное исследование и описали 7239 цикла ИКСИ, включая 6845 ГЭР-негативных и 394 ГЭР-позитивных цикла. При сравнении эмбриологических и клинических исходов циклов из этих групп не было выявлено различий В частоте оплодотворения, среднем количестве эмбрионов, частоты наступления беременности, гестации, массе новорожденных и количестве врожденных пороков развития. Кроме того, отдельно сравнивали исходы ГЭР-позитивных циклов, в которых переносили эмбрионы, полученные из ГЭР-позитивных ооцитов, ГЭРнегативных ооцитов и смешанные. И в этих группах перечисленные выше параметры достоверно не различались. В исходе ГЭР-позитивных циклов было зарегистрировано рождение 14 здоровых детей, в том числе 3 – после селективных переносов эмбрионов, подвергавшихся криоконсервации [243].

В проспективном когортном исследовании, которое провела в нашем Центре А.Г. Сыркашева с коллегами, были изучены 162 женщины, проходившие лечение бесплодия методом экстракорпорального

оплодотворения/интрацитоплазматической инъекции сперматозоида. Пациентки были разделены на 2 группы: группа 1 — женщины с наличием ооцитов с ГЭР и группа 2 — женщины с наличием 100% 100% морфологически нормальных ооцитов. Ооциты оценивались методом световой микроскопии во время проведения оплодотворения методом ИКСИ. Авторами было показано, что рецидивирующий генитальный герпес и хламидийная инфекция в анамнезе увеличивали риск появления агрегатов ГЭР в цитоплазме ооцитов у пациенток программ экстракорпорального оплодотворения в 3,7 раза. При получении у пациентки более 10 зрелых ооцитов шансы получения ооцитов с агрегатами ГЭР были в 3,3 раза выше. клинико-анамнестические параметры, Другие a также особенности стимуляции суперовуляции не влияли на появление данной аномалии. Частота оплодотворения ооцитов и качество полученных эмбрионов были ниже в группе с агрегатами ГЭР. У женщин с агрегатами ГЭР в 4,1 раза реже наступала клиническая беременность, а частота ранних репродуктивных потерь была в 3,86 раза выше по сравнению с пациентками с морфологически нормальными ооцитами [36, 38–40].

Однако исследование Mateizel с коллегами показало, что эмбрионы, полученные из ооцита М II с видимыми дисками ГЭР обладают способностью нормально развиваться И ИЗ них ΜΟΓΥΤ получиться новорожденные без серьезных пороков развития [243]. При этом авторы также подчеркнули, что к переносу эмбрионов с агрегатами ГЭР следует подходить с осторожностью из-за более низкой эффективности таких циклов экстракорпорального оплодотворения и тщательно обследовать детей, родившихся после переноса эмбрионов, полученных из ооцитов с дисками ГЭР. Несомненно, проблема изменения морфологии цитоплазмы ооцитов в виде появления дисков ГЭР требует дальнейшего изучения, поиска причин и механизмов возникновения данного вида патологии ооцитов.

1.3. Роль морфологических характеристик клеток эмбриона и блестящей оболочки в процессе спонтанного хетчинга

Перед имплантацией эмбриону человека необходимо освободиться от блестящей оболочки, чтобы осуществить непосредственный клеточный контакт с эпителием эндометрия. Процесс выхода эмбриона из блестящей оболочки называют хетчингом (от англ. hatching – вылупление). Хетчинг сопровождается частичным разрывом блестящей оболочки и последующим динамическим перемещением эмбриона в наружную среду. Процесс хетчинга у человека происходит на стадии бластоцисты приблизительно на 5-6 день после оплодотворения и занимает несколько часов [337]. Только после блестящей оболочки бластоциста способна ИЗ осуществить выхода имплантацию в эндометрий матки и продолжить свое развитие. Далеко не всем бластоцистам удается осуществить хетчинг. По некоторым данным, полученным in vitro, до 75% всех морфологически нормальных бластоцист человека оказываются неспособны к самостоятельному выходу из блестящей оболочки [363]. Неспособность к хетчингу может являться одной из важных причин привычной неудачи имплантации у человека [337]. Несмотря на большое количество исследований, проведенных на животных моделях и эмбрионах человека *in vitro*, биомеханические и молекулярные механизмы хетчинга до сих пор в полной мере не изучены. Большую сложность в познании механизмов выхода бластоцисты из оболочки, а также в строении и функционировании зоны пеллюцида вообще, представляет разнообразие этих процессов у разных видов животных. В этой связи достаточно трудно данными по хетчингу проводить параллель между y лабораторных животных. Разрыв прозрачной оболочки происходит в области муральной трофэктодермы (часть трофэктодермы, окружающий полость бластоцисты). Остается открытым вопрос: специфично ли место, где происходит разрыв зоны, или разрыв происходит в случайном месте из-за прочности блестящей оболочки. Процесс общего снижения бластоцисты человека из зоны пеллюцида был детально проанализирован

методами световой и электронной микроскопии в работе, опубликованной несколько лет назад международной исследовательской группой [322]. Этими исследователями были обнаружены морфологические особенности клеток трофэктодермы, располагающихся в области разрыва блестящей оболочки, и они назвали их «клетками, разрывающими оболочку» (англ. «zona-breaker cells»). В период хетчинга приобретают ЭТИ клетки шаровидную форму формируют выросты И пальцевидные (трофэктодермальные отростки). Также в этой статье было показано, что «разрывающие оболочку» клетки, располагаются в зоне предстоящего хетчинга и характеризуются наличием большого числа микроворсинок, лизосом и, по-видимому, активно секретируют везикулы. Это соответствует представлениям о том, что процесс хетчинга зависит как от механических, так и от химических факторов. Кроме того, в этих клетках были визуализированы крупные пучки сократительных тонофиламентов, проходящих вдоль разрыва блестящей оболочки наподобие сфинктера или воронки. Однако, как ЭТО уже обсуждалось выше, такие располагаются в области уже сформированного разрыва зоны, и не очень понятно, появляются ли морфологически различимые «zona-breaker cells» в составе трофэктодермы или форма их клеток меняется во время продвижения трофэктодермы через разрыв в блестящей оболочке. Трофэктодерма поздних бластоцист выраженно реагирует на механические воздействия: например, единичное прикосновение тонкой стеклянной иглой приводит к резкому коллапсу полости бластоцисты, хотя целостность трофэктодермы при этом не нарушается [210]. Такая реакция на механические воздействия связана с активностью десмосом, объединяющих трофобласт общую механозависимую При локальном воздействии систему. на клетки трофэктодермы поздней бластоцисты происходит резкая перестройка тонофиламентов десмосомы, обеспечивающие И сжатие клеток, механическую связь между клетками, инициируют процесс такой же перестройки цитоскелета в соседних клетках пласта. Так что появление

«сжатых» клеток трофэктодермы в месте разрыва оболочки может быть связано именно с локальным воздействием краев разрыва зоны на механочувствительную систему клеток, а не со специфической функцией «разрыва зоны» определенных клеток трофэктодермы.

Большой интерес исследователей в области изучения процесса хетчинга представляет формирование так называемых трофэктодермальных отростков (англ. TEP – trophoectodermal projections), которые имеются у многих видов млекопитающих – грызунов, овец, коров и приматов. Процесс формирования трофэктодермальных отростков (ТЭО) у бластоцисты человека был описан с использованием метода покадровой съемки в режиме реального времени [167]. В этой статье ТЭО были описаны как единичные пальцевидные цитоплазматические выросты трофэктодермы длиной до 29 мкм, прободающие блестящую оболочку, но их детальная морфология не была рассмотрена. При коллапсировании бластоцисты сформированные ТЭО отрываются от трофэктодермы, остаются вне зоны пеллюцида и быстро дегенерируют. Такие ТЭО поначалу не были обнаружены у ранних бластоцист или у дегенерирующих бластоцист, но недавно было показано, что длинные пальцевидные филоподии формируются и на более ранних стадиях преимплантационного развития. Так, было продемонстрировано, что эмбрионов происходит компактизация мыши c участием длинных пальцеобразных филоподий [145].

В самом начале компактизации некоторые из клеток эмбриона формируют несколько длинных филоподий, содержащих большое количество Е-кадгерина, которые распластываются по поверхности соседних клеток, инициируя процесс адгезии клеток морулы. Также авторы статьи считают, что эти филоподии контролируют процесс изменения формы клеток, в результате чего эти клетки растягиваются по поверхности соседних клеток и формируют трофэктодерму. Высокое содержание актина в ТЭО показано в экспериментах с использованием иммунофлуоресцентной окраски

и конфокальной микроскопии [337]. Данные исследований ТЭО у человека совпадают с данными, полученными на других видах млекопитающих, и свидетельствуют об участии ТЭО в процессе хетчинга бластоцисты за счет прохождения через блестящую оболочку и инициации ее разрыва. Также можно предположить, что после хетчинга такие ламеллоподобные ТЭО участвуют в передвижении бластоцисты по поверхности эндометриального эпителия и в инициации процесса имплантации [337].

Развитие эмбриона *in vitro*, предположительно, происходит медленнее, чем in vivo, поэтому и хетчинг при проведении экстракорпорального оплодотворения потенциально может происходить медленнее. Мы также предполагаем, что эмбрион при культивированни *in vitro* находится в субоптимальных условиях, поскольку состав культуральных сред не идентичен содержимому полости маточных труб и матки. Вследствие этого блестяшей происходить изменение конфигурации может оболочки. Некоторые дополнительные экстракорпоральные процедуры также могут приводить к структурным изменениям блестящей оболочки. Так, по некоторым данным, криоконсервация ооцитов может являться причиной уплотнения блестящей оболочки И ee большей устойчивости К протеолитическим ферментам [213].

Группа ученых из Дании провела исследование, посвященное влиянию метода оплодотворения in vitro на протекание хетчинга и клинический результат ЭКО [211]. В этой работе сравнивался хетчинг у эмбрионов, полученных методом «инсеминации in *vitro*» И методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку – ИКСИ. Исследователи выделили два типа хетчинга: с предшествующей пенетрацией блестящей оболочки трофэктодермальными выростами и без таковой. В первом выход бластоцисты происходил случае через постепенно расширяющееся отверстие блестящей оболочки, во втором – наблюдали быстрый и обширный разрыв зоны пеллюцида со стремительной экструзией бластоцисты. Было показано, что использование метода ИКСИ ведет к развитию хетчинга по первому типу (97,7% всех наблюдений против 55,8% в группе без ИКСИ, р<0,001). Также авторы показали, что при оплодотворении методом ИКСИ хетчинг начинается раньше, чем без ИКСИ (95,9 против 99,7 часов после оплодотворения, р<0,001). Таким образом, локальное повреждение зоны при ИКСИ оказывает существенное влияние на динамику процесса хетчинга. В то же время важно отметить, что влияния метода оплодотворения и типа спонтанного хетчинга на уровень возникновения беременности в этом исследовании выявлено не было.

Кроме всего прочего, при анализе процесса хетчинга у человека надо блестящей оболочки учитывать, структуру на ΜΟΓΥΤ влиять индивидуальные особенности пациентки, как генетические, так и связанные с патологическим протеканием предшествующих процессов, например, оогенеза. В то же время при исследовании патологий зоны, не было выявлено зависимости от таких факторов, как возраст пациентки или курение [296]. Вероятнее всего, изменение структуры блестящей оболочки, а именно, ее утолщение, может приводить не только к отсутствию оплодотворения, но и к неудачам хетчинга. При этом единичные исследования, посвященные неудачам хетчинга у человека, не содержат информации об оценке морфологии зоны пеллюцида ооцитов и эмбрионов, вследствие чего данная гипотеза пока не находит экспериментального подтверждения. Причинами утолщения блестящей оболочки ооцита может быть как само по себе изменение зоны, так и замедленное дробление эмбриона, во время которого должно происходить ее физиологическое истончение. Аномальная секреция протеиназ на сегодняшний день является наиболее распространенной версией неудачи хетчинга, подтвержденной экспериментальными данными [284]. На сегодняшний день уже известны гены, отвечающие за хетчинг у млекопитающих, а самый большой интерес представляют исследования, посвященные патогенетическим механизмам аномальной секреции протеаз у человека [283]. Также одной из причин неудач хетчинга может быть отсутствие дифференцировки трофобласта и появления «zona-breaker» cells. Тем не менее, даже при тщательном анализе данных литературы не удалось найти публикации, посвященные данному феномену. В исследовании с использованием морфокинетического наблюдения было продемонстрировано нарушение хетчинга вследствие наличия между трофэктодермой и блестящей оболочкой экстраклеток, не участвующих в формировании бластоцисты [322].

В настоящее время клеточная биология вплотную подошла к выяснению практически всех аспектов, связанных с зарождением эмбрионов человека. Не последняя роль в этом принадлежит вспомогательным репродуктивным технологиям, благодаря которым стало возможным изучение морфологии женских половых клеток и наблюдение за развитием эмбрионов *in vitro*.

Тем не менее, в научной среде продолжаются дискуссии по целому ряду вопросов. Их спектр достаточно широк — от анатомических особенностей женских половых клеток до генетических проблем, обуславливающих зарождение и развитие эмбрионов. Так, в области изучения мейоза еще только выясняется роль актиновых сетей в миграции веретена. До сих пор мало что известно о механизмах, ответственных за закрепление веретена в кортексе на стадии М ІІ. Не до конца понятна роль комплекса актинсвязывающих белков Aгр2/3 как актинового нуклеатора, необходимого для поддержания прикрепления веретена деления во время М ІІ. В области цитоскелета ооцита остается открытым вопрос о промежуточных нитях во время созревания ооцитов. Изменения в мембранах аппарата Гольджи и его функции в ооцитах на стадии GV на сегодня изучены недостаточно. Весьма сложную проблему представляют диски ГЭР, поскольку многие ученые считают, что они снижают шансы пациенток на успешную беременность. Однако в настоящее время у специалистов нет единого мнения о

клиническом значении дисков ГЭР в ооцитах человека, а уже накопленные данные противоречивы.

Что касается анализа стадии хетчинга, то здесь трудноразрешимые проблемы связаны со сложностью исследования бластоцист человека. Если у животных процесс хетчинга взят учеными под контроль, то специфика человеческого организма еще не изучена в достаточной степени. В частности, остается открытым вопрос о причинах неудач хетчинга. Публикаций на эту тему чрезвычайно мало.

Таким образом, только исчерпывающее представление о морфологических и функциональных особенностях гамет человека позволит оптимизировать и индивидуализировать программы экстракорпорального оплодотворения, как и культивирования эмбрионов человека in vitro, а также позволит выработать критерии оценки качества женских гамет, протоколов стимуляции суперовуляции и рождения здоровых детей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Сбор образцов и культивирование эмбрионов

В Отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН Сухих Г.Т.) в рамках изучения различных патологии женских половых клеток были проведены экстракорпорального оплодотворения. Клиническая часть работы была выполнена в рамках диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук Сыркашевой А.Г. (руководители д.м.н. Долгушина Н.В., к.б.н. Макарова Н.П.). Клиническая часть работы по анализу исходов беременностей при переносе эмбрионов на стадии бластоцисты различными видами хетчинга была проведена в рамках диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук Ибрагимова Э.О. (руководители д.м.н. Долгушина Н.В., к.б.н. Макарова Н.П.).

Использование в рамках научных исследований половых клеток и эмбрионов человека было разрешено Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН Сухих Г.Т.).

Трансвагинальную пункцию яичников выполняли через 36 ч. после назначения триггера овуляции. Ооцит-кумулюсные комплексы идентифицировали под контролем стереомикроскопа (Nikon, Япония) в фолликулярной жидкости и забирали стерильной микропипеткой. Ооциткумулюсные комплексы отмывали от фолликулярной жидкости и крови в буферном растворе **HEPES** (Gamete Buffer, COOK, Ирландия). Подсчитывали число ооцитов и помещали в 4-х луночные планшеты с бикарбонатной культуральной средой (Fertilization ДЛЯ периода предварительной инкубации в течение 2-3 часов в условиях 6%СО2, 5% О2 и 37.0° C. температуры После окончания предварительной инкубации

производили денудирование ооцитов (механическое и энзимное удаление клеток кумулюса). Сначала ооцит-кумулюсные комплексы помещали на 20 секунд в раствор гиалуронидазы (СООК, Ирландия), затем отмывали от фермента в буферной среде механическим путем. После энзимной и механической обработки ооцитов оценивали степень мейотической зрелости клеток согласно следующей классификации:

- если в цитоплазме клетки визуализируется ядро и отсутствует полярное тельце ооцит находится на стадии зародышевого пузырька (GV-germinal vesicle), что соответствует профазе первого мейотического деления;
- если в цитоплазме клетки отсутствует ядро и отсутствует полярное тельце
 ооцит находится на стадии метафазы первого мейотического деления
 (М І); фактически, в данную группу попадают женское половые клетки на стадиях от диакинеза до ранней телофазы-1;
- наличие полярного тельца в перивителлиновом пространстве свидетельствует о завершении процессов созревания ооцита и достижения метафазы второго мейотического деления (М II).

Морфологическую оценку ооцитов на данном этапе проводили, выявляя цитоплазматические и экстрацитоплазматические формы аномалий. На основании литературных данных и собственных наблюдений все известные в настоящее время формы патологии женских половых клеток в программах стимуляции суперовуляции были суммированы и сформирована схема различных форм аномалий ооцитов (рисунок 1).

Данная схема в настоящее время используется в работе клинических эмбриологов Отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН Сухих Г.Т.).

Параллельно с очисткой ооцитов производили центрифугирование, флотирование и обработку спермы супруга/партнера в градиенте плотностей (силикатные шарики концентраций 40% и 80% в HEPES-буферном растворе) по стандартной методике производителей культуральных сред (СООК, Ирландия).

Морфологическую оценку дробящихся эмбрионов проводили через 72 ч. после оплодотворения ооцитов. Оценивали количество имеющихся бластомеров, симметричность дробления, а также наличие фрагментации.

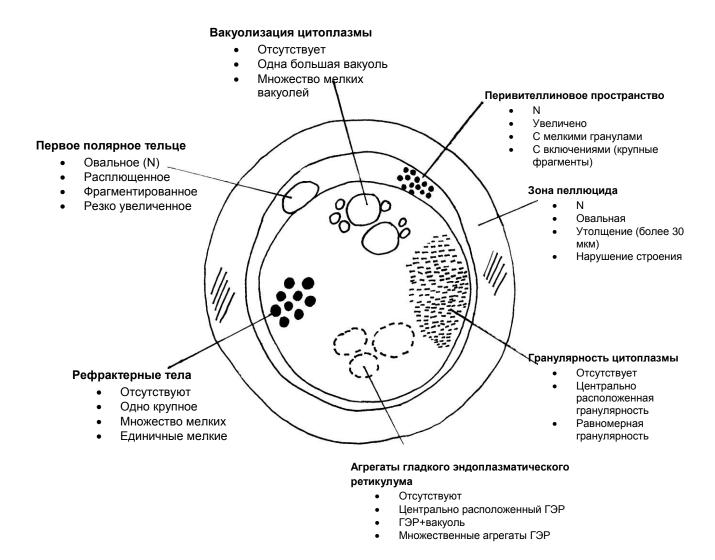


Рисунок 1. Морфологические особенности постовуляторных ооцитов человека (систематизация литературных и собственных данных).

На основании морфологических характеристик дробящиеся эмбрионы человека классифицировали на 4 группы (согласно классификации ESHRE Стамбульский консенсус, 2011). Первая цифра — число бластомеров в эмбрионе на стадии дробления. По качеству и присутствию фрагментации внутри блестящей оболочки эмбрионы дифференцировали согласно следующим типам:

- тип А эмбрион отличного качества без ануклеарных (безъядерных)
 фрагментов;
- тип В эмбрион хорошего качества с содержанием ануклеарных фрагментов до 20%.
- тип С эмбрион удовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов от 21% до 50%;
- тип D эмбрион неудовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов более 50%, остановка дробления.

Бластоцисты 5-6 суток культивирования оценивали по международной классификации [157]. Проводили оценку степени экспандирования полости бластоцисты, стадию развития внутренней клеточной массы и выраженность клеток трофэктодермы согласно следующим градациям.

Степень экспансии бластоцисты

- (1) Ранняя бластоциста, полость бластоцисты занимает менее половины объема эмбриона.
- (2) Бластоциста, у которой полость бластоцисты занимает половину или более объема эмбриона.
- (3) Полная бластоциста, полость бластоцисты полностью заполняет эмбрион, но блестящая оболочка не истончена.
- (4) Расширенная бластоциста, объем полости больше, чем размер ранних эмбрионов, а блестящая оболочка истончена.

- (5) Бластоциста, трофэктодерма начала выходить через блестящую оболочку.
- (6) Бластоциста, полностью вышедшая из блестящей оболочки.

Оценка ВКМ (внутриклеточной массы)

- А. Плотно упакованная, много клеток
- В. Неплотно сгруппированная, немного клеток
- С. Очень мало клеток

Оценка трофэктодермы

- А. Много клеток формируют компактное скопление эпителия;
- В. Немногочисленные клетки образуют неплотный эпителий;
- С. Очень мало больших клеток.

2.2 Изучение числа копий митохондриальной ДНК в ооцитах человека в различными морфологическими аномалиями

Подсчет количества мтДНК в ооцитах проводили в лаборатории цитологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН Сухих Г.Т., руководитель лаборатории к.б.н. А.М. Красный). Ооциты, не оплодотворившиеся после проведения ИКСИ, в дробления 40 ч. которых не наблюдали признаки через после оплодотворения, отбирали для исследования числа копий мтДНК. В использованием стереомикроскопа асептических условиях c отмывали в стерильном фосфатно-солевом буфере (phosphatebufferedsaline, PBS), а затем помещали в индивидуальные пробирки, содержащие PBS. Определение абсолютного числа копий мтДНК осуществляли с помощью метода ПЦР в реальном времени. Для этого из каждого отдельного ооцита выделяли ДНК. Клетки лизировали буфером с додецилсульфатом натрия

(sodium dodecylsulfate, SDS) (10MM EDTA, 1% SDS, 50MM Tris-HCl, pH 7,5) B течение 5 минут. После этого осуществляли осаждение ДНК изопропанолом в присутствии дрожжевой тРНК (YeasttRNA, Ambion) в качестве соосадителя при -20°C в течение 30 минут. Далее осадок промывали 70° этанолом, высушивали, и ресуспендировали в воде. Весь объем (10 мкл) полученного раствора ДНК сразу использовали для проведения ПЦР. Для подсчета копий мтДНК проводили ПЦР В реальном времени с использованием праймеров и зонда к митохондриальному гену субъединицы 1 NADHдегидрогеназы (NADHdehydrogenase, subunit 1) (прямой праймер: CCACATCTACCATCACCCTC; обратный праймер: TAGAATAAATAGGAGGCCTAGGTT; зонд: R6G ATC ACC GCC CCG ACC TTA GCT CTC A BHQ1). Для получения результата ПЦР в виде абсолютного числа копий гена субъединицы 1 NADHдегидрогеназы во время каждого запуска использовали калибровочные растворы плазмид (107 копий/10 мкл, 105 копий/10 мкл, 103 копии/10 мкл) с заклонированным соответствующим ампликоном. Реакцию проводили В амплификаторе Real-TimePCRDetectionSystemCFX96 (BioRad, USA) с набором для ПЦР (M-428, Синтол, Россия) по следующей программе: 95°C – 3 мин, (60°C-30 сек/95°C-10 сек) 45 циклов. Детекцию флуоресценции осуществляли в канале, Полученные соответствующем флуорохрому зонда (R6G). данные флуоресценции были пересчитаны в абсолютное количество копий при помощи программного обеспечения амплификатора CFX96 BioRad.

2.3 Проведение преимплантационного генетического скрининга эмбрионов, полученных из ооцитов с различной морфологией

Генетический анализ эмбрионов проводили в лаборатории репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН Сухих Г.Т., руководитель лаборатории профессор В.А. Бахарев). Процедура выполнения преимплантационного генетического скрининга состояла из трех этапов:

биопсия бластомера, фиксация исследуемых клеток на предметном стекле, а молекулярно-цитогенетическая диагностика единичных Биопсию бластомеров клинический эмбриолог проводил на третий день культивирования эмбрионов *in vitro* (через 72 часа после аспирации фолликулов), если в эмбрионе визуализировалось как минимум шесть бластомеров. В нашем исследовании биопсии подвергали исключительно один бластомер. Биопсию осуществляли с помощью микроманипулятора Narishige (Япония), а для рассечения блестящей оболочки использовали лазерную пушку Zilos (Германия). Для аспирации бластомера использовали микропипетку СООК (Ирландия). Подготовку ядра для гибридизации *in situ* выполняли согласно протоколу, рекомендуемому фирмой-производителем. Выделение ядра из бластомера проходило с использованием 10 мкл гипотонического раствора, помещенного предметное стекло. на Гипотонический раствор, состоящий из 1% Твина 20 (1мл), 0,01 % раствора HCl (0,1 мл), дистиллированной воды (8,9 мл). Фиксацию ядер бластомеров проводили метанол-уксусным раствором (3:1) при комнатной температуре. Далее процесс гибридизации *in situ* состоял из следующих этапов:

- Дегидратация препаратов с ядрами в серии восходящих спиртов 70°, 80°, 96° по 2 минуты в каждом.
- Экспозиция препарата в раствор пепсина при 37°C в течение 3 минут.
- Помещение препарата в раствор 2xSSC при 37°C на 4 минуты.
- Повторная фиксация ядер бластомеров в метанол-уксусном растворе (3:1) в течение 10 минут.
- Помещение стекла с ядрами в раствор 2xSSC при 37°C на 4 минуты.
- Дегидратация в серии восходящих спиртов 70°, 80°, 96° по 2 минуты в каждом.
- Высушивание препаратов на воздухе.
- Добавление ДНК зондов для 5 хромосом к высушенным образцам (использовались ДНК-зонды фирмы Abbot к 13 (SpectrumRed), 18

- (SpectrumAqua), 21 (SpectrumGreen), X (SpectrumBlue), Y (SpectrumGold) хромосомам).
- Помещение препарата на термоплату при 75°C на 10 мин.
- Помещение предметного стекла с препаратом во влажную камеру на ночь и инкубирование при температуре 42°C.
- Постгибридизационная отмывка препарата в 0,4X SSC (рН 7,0-7,5) при 73°C в течение 1 минуты и последующая отмывка в растворе 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре в течение 30 секунд.
- Нанесение на препарат противовыцветающего реагента Antifade.
- Анализ препаратов после процедуры FISH проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axioplan 2 фирмы Zeiss при увеличении 100X10, оборудованным соответствующим набором фильтров (Orange, Green, Aqua, Blue, Gold).

2.4 Электронно-микроскопическое исследование ооцитов

Электронно-микроскопический анализ ооцитов выполняли на базе Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии PACXH (руководитель лаборатории Поляков В.Ю.). Отобранные ооциты фиксировали при температуре +4°C в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,2) с добавлением 1,5% сахарозы. После ОТМЫВКИ ОТ фиксирующей смеси дофиксировали 1,0% раствором четырёхокиси осмия (OsO₄) (Sigma, США), обезвоживали в этаноле повышающейся концентрации (30, 50, 70, 96 и 100%), затем — в окиси пропилена. Образцы заключали в смесь эпоксидных смол эпона-812 и аралдита по стандартной методике. Ультратонкие срезы толщиной 30–40 нм получали на ультрамикротоме LKB–V, монтировали на покрытые формваровой подложкой бленды, после чего контрастировали Рейнольдсу уранилацетатом цитратом свинца ПО (использована классическая методика, разработанная еще на заре внедрения электронной микроскопии). Полученные препараты просматривали на электронном микроскопе H-500 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ.

2.5 Изучение экспрессии мРНК генов *CTSL2, GATA3, CGB*

Анализ экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (РТ-ПЦР). Выделение РНК проводили с использованием реактивов ДНК-Технология (Россия) по стандартной методике производителя. Для осаждения РНК добавляли изопропанол, образцы интенсивно перемешивали, центрифугировали. Осадки промывали 70% этанолом, после центрифугирования супернатант отбирали, осадок высушивали и растворяли в очищенной от нуклеаз воде. Концентрацию и чистоту РНК измеряли на спектрофотометре. Чистоту РНК оценивали по соотношению оптического поглощения растворов на длинах волн 260 нм и 280 нм (остатки ароматических аминокислот в составе белков поглощают излучение с длиной волны 280 нм).

Для удаления примесей ДНК, образцы инкубировали с ДНКазой в термостате в течение 30 минут при температуре 37°С. Инактивацию ДНКазы проводили добавлением ЭДТА до 5 мМ и нагреванием образца до 65°С.

Синтез кДНК осуществляли обратной транскриптазой по методике производителя. В качестве матрицы использовали выделенную РНК. Пробы инкубировали 30 мин при температуре 40°C с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C. В процессе реакции по матрице РНК синтезируется комплементарная кДНК. Пробы хранили в морозильник при температуре -20°C.

В работе использовали ПЦР-буфер; реакцию проводили на детектирующем амплификаторе ДТ-96 НК. Были использованы праймеры, разработанные ДНК-Технологией (Россия).

Для расчета уровня экспрессии использовали значения пороговых циклов (Cp/Ct). Обработку результатов РТ-ПЦР проводили по формуле: $E=e^{-\Delta\Delta Ct}$ (где E- изменение содержания исследуемой мРНК, Ct- пороговый цикл, e=

RT-PCR эффективность реакции RT-PCR). Эффективность реакции праймеров. отдельно пары рассчитывали ДЛЯ каждой Экспрессию соответствующих генов выражали В единицах, нормированных экспрессию В2М (микроглобулин бета-2, компонент лёгкой цепи главного комплекса гистосовместимости класса І (МНС І), представленный на всех организма человека, ядросодержащих клетках кроме эритроцитов). Специфичность реакции оценивали при помощи построения плавления.

2.6 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных выполняли на компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета статистических программ «Statistica V10» (США), SPSS Statistics 22 (США) и «SAS V8» (США). Для качественных данных определяли доли и частоту (%). Для сравнения качественных данных в двух и более группах, а также для установления значимых различий между ними использовали тест $\chi 2$, для вычисления которого прибегали к построению таблиц сопряженности, а критерий Фишера небольших также точный ДЛЯ выборок. проведением сравнительного анализа количественных данных в исследуемых группах определяли вид распределения данных (тест Колмогорова-Смирнова, графический анализ данных). При нормальном виде распределения данных определяли среднее значение со стандартным отклонением, ДЛЯ оценки различий группах применяли параметрической статистики (*t*-тест для сравнения данных в 2-х группах или ANOVA для сравнения данных в нескольких группах). При ненормальном распределении данных определяли медиану с интерквартильным размахом, для оценки различий в группах применяли методы непараметрической статистики (тест Манна-Уитни для сравнения данных в двух группах или тест Крускала-Уоллиса для сравнения данных в нескольких группах).

Зависимые данные оценивали с помощью коэффициента корреляции. Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического корреляционного критерия Спирмена. Различия между статистическими величинами считали статистически значимыми при уровне достоверности p<0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Изучение параметров оплодотворения и раннего эмбриогенеза ооцитов с морфологическими нарушениями

анализа частоты встречаемости различных форм патологии ооцитов, параметров эмбрионального развития, раннего частоты беременностей биохимических клинических было проведено И проспективное когортное исследование. Критерием отнесения пациенток в исследование было наличие 100% ооцитов с патологией цитоплазмы или экстрацитоплазматическими нарушениями, в группу без аномалий наличие 100% нормальных ооцитов. Частоту оплодотворения ооцитов рассчитывали как число зигот к числу зрелых ооцитов, которые подвергали оплодотворению. Долю эмбрионов различных классов и долю эмбрионов, остановившихся в развитии на ранних этапах, рассчитывали на число зигот с нормальным оплодотворением.

В результате проведения 894 циклов экстракорпорального оплодотворения было получено и проанализировано 6134 ооцит-кумулюсных комплекса (ОКК).

Морфологическую оценку ооцитов осуществляли во время проведения процедуры интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TE300 (общее увеличение 400х) согласно описанной классификации. После энзимного удаления клеток кумулюса было установлено, что 5137 находились на стадии М II, были пригодны для оплодотворения и дальнейшего культивирования. Из всех полученных зрелых женских половых клеток морфологически нормальными были признаны 1472 ооцита. Нарушения строения цитоплазмы были выявлены в 1324 ооцитах, экстрацитоплазматические аномалии — 2111 клетка. Сочетанная патология цитоплазмы и экстрацитоплазматических структур наблюдалась в 230 ооцитах.

Частота появления различных аномалий женских половых клеток показана в таблице 2 и рисунке 2. Экстрацитоплазматические и цитоплазматические морфологические нарушения женских половых клеток представлены на микрофотографиях (рисунок 3-27).

Таблица 2. Частота выявления различных форм патологии

морфологии женских половых клеток

Выявленные формы патологии женских половых клеток	n	%
Нормальная морфология	1472	28,7%
Цитоплазматические аномалии	1324	25,8%
Экстрацитоплазматические аномалии	2111	41,1%
Сочетанная патология	230	4,5%
Всего	5137	100%

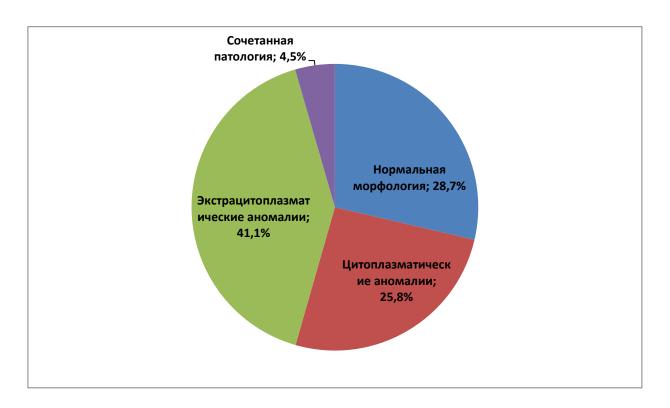


Рисунок 2. Частота выявления различных форм аномалий зрелых женских половых клеток человека



Рисунок 3. Нарушение структуры зоны пеллюцида зрелого ооцита. Стрелкой показана блестящая оболочка, имеющая слоистую структуру, не характерную для нормального пористого строения зоны пеллюцида. Относительный размер (толщина) оболочки увеличен. Цитоплазма ооцита мелкозернистая, перивителлиновое пространство нормального размера, форма ооцита не изменена, шарообразна. Ув.400



Рисунок 4. Изменение морфологии зоны пеллюцида зрелого ооцита человека. Стрелкой показана гипертрофированная часть зоны пеллюцида. Ув.460

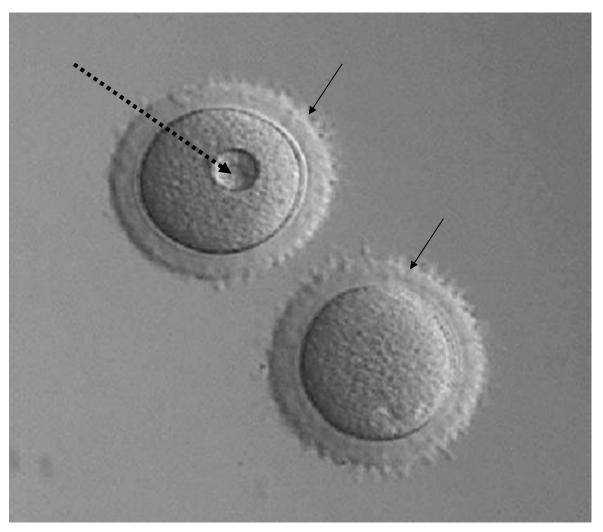


Рисунок 5. Нарушение структуры зоны пеллюцида ооцитов (стрелка), блестящая оболочка представляет собой неоднородные выросты. В центральной части цитоплазмы одного из ооцитов видна вакуоль больших размеров, составляющая по диаметру четверть диаметра ооцита (пунктирная стрелка), что согласно полученным в настоящей работе данным, может привести к аномальному оплодотворению методом ИКСИ и/или дегенерации женской половой клетки, ув. 400

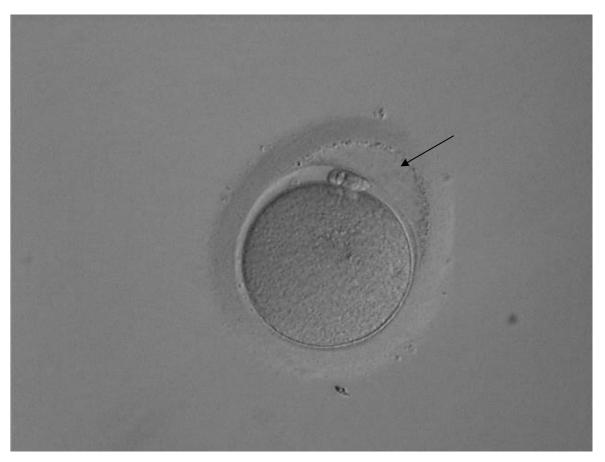


Рисунок 6. Нарушение структуры зоны пеллюцида ооцита человека. Стрелкой показано расслоение внутренней и внешней части (слоев) блестящей оболочки, в результате чего формируется «карман», заполненный чаще всего жидкостью, идентичной жидкости в перивителлиновом пространстве. Ув.400

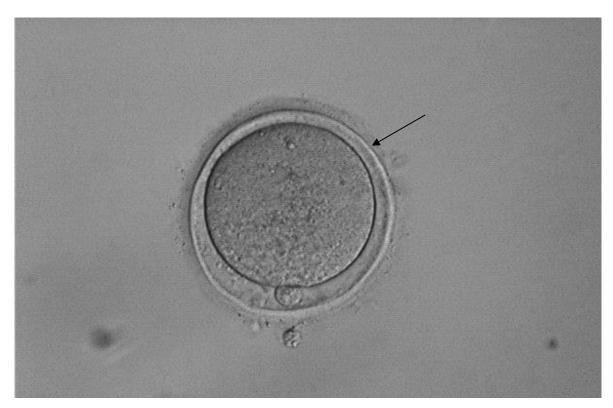


Рисунок 7. Грубое истончение блестящей оболочки ооцита человека на стадии М II. Внутренний слой зоны пеллюцида (показан стрелкой) гипертрофирован, наблюдается его уплощенное строение. Патология внутреннего слоя зоны пеллюцида, ув.400.

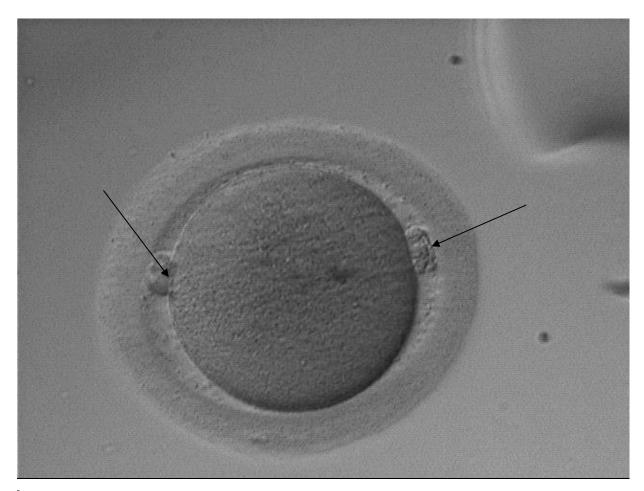


Рисунок 8. Ооцит человека на стадии МІІ с двумя полярными тельцами (стрелки) до момента оплодотворения. При нормальном развитии ооцитов в процессе мейоза у женской половой клетки должно быть одно тельце, второе должно дегенерировать. На представленной микрофотографии одно тельце (справа) имеет гранулярную оболочку, что может говорить о проходящих внутри процессах дегенерации. Второе тельце (слева) имеет более гладкую оболочку, что может указывать на его более позднее выделение относительно тельца справа. Ув.400.

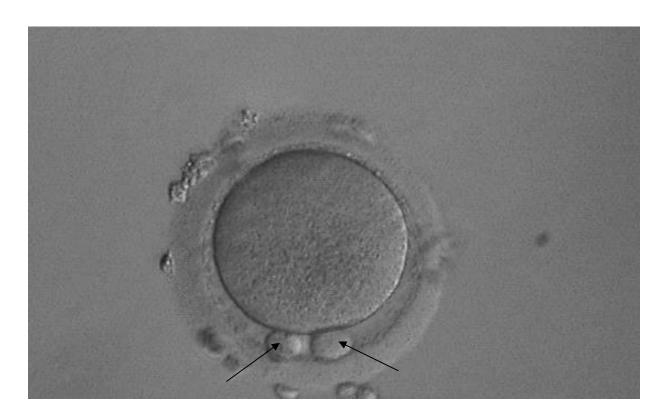


Рисунок 9. Ооцит человека на стадии МІІ с двумя одинаковыми по структуре полярными тельцами (стрелки) до момента оплодотворения, ув.400

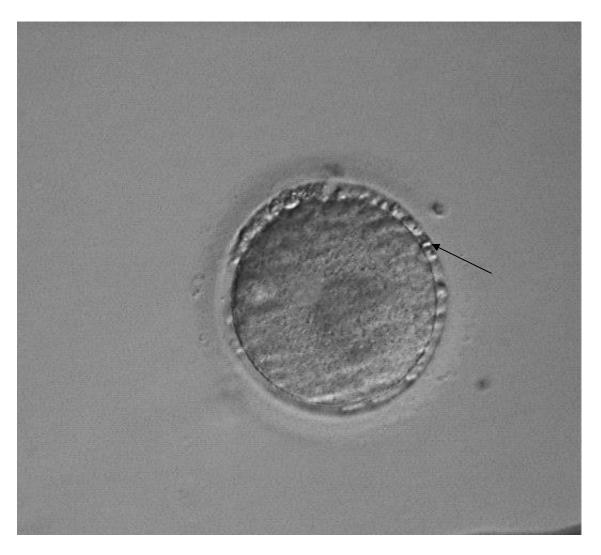


Рисунок 10. Зрелый ооцит человека с полной дегенерацией полярных телец до момента оплодотворения (стрелка), в перивителлиновом пространстве обнаруживаются множественные фрагменты дебриса, ув.400

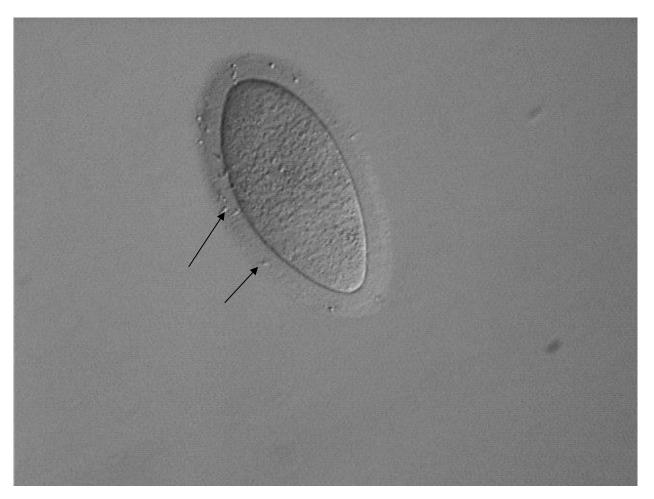


Рисунок 11. Незрелый ооцит человека овоидной формы на стадии MI, в блестящей оболочке видны сперматозоиды (стрелки), ооцит после оплодотворения классическим ЭКО (добавление суспензии подготовленных сперматозоидов в чашку Петри), ув.400

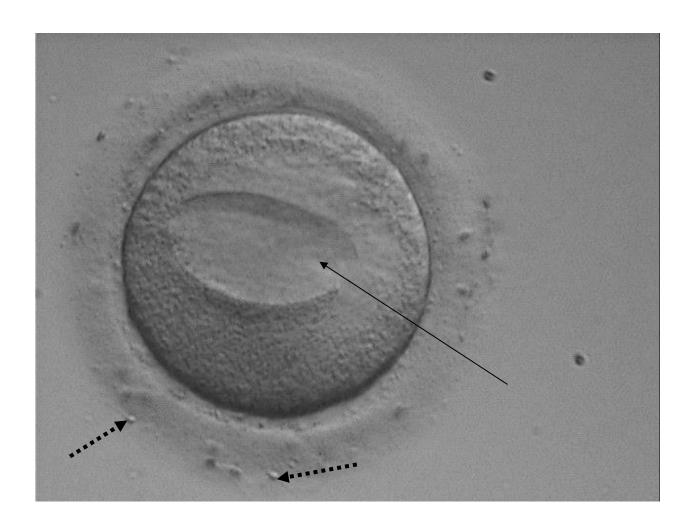


Рисунок 12. Ооцит на стадии М I с вакуолью с цитоплазме (стрелка), в блестящей оболочке видны сперматозоиды (пунктирные стрелки), ооцит после оплодотворения классическим ЭКО (добавление суспензии подготовленных сперматозоидов в чашку Петри), ув.600



Рисунок 13. Деформация блестящей оболочки незрелого ооцита (стрелка), расслоение внутреннего и внешнего слоя зоны пеллюцида. Цитоплазма демонстрирует умеренную гранулярность, полярное тельце отсутствует. В блестящей оболочке видны мужские половые клетки после оплодотворения добавлением подготовленной суспензии сперматозоидов к ооцит-кумулюсным комплексам. Ув.300.



Рисунок 14. Деформация блестящей оболочки, два ооцита под одной зоной пеллюцида. Было проведено оплодотворение добавлением суспензии жумких половых клеток, стрелками показаны сперматозоиды, правый ооцит имеет аномальное оплодотворение (4 пронуклеуса, пунктирная стрелка), левый ооцит остался незрелым на стадии GV с видимым ядром в виде зародышевого пузырька. В аномально оплодотворившемся ооците присутствуют вакуоли, располагающиеся над пронуклеусами, ув. 400.

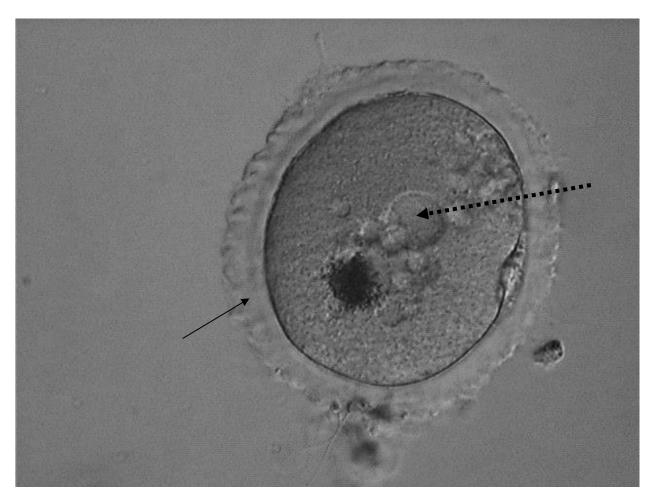


Рисунок 15. Деформация блестящей оболочки ооцита человека (стрелка), неровные края внешнего слоя зоны пеллюцида. Внутри цитоплазмы присутствуют множественные вакуоли (пунктирная стрелка), а также зона некроза, ооцит на стадии МІ, полярное тельце четко не визуализируется, ув.600.



Рисунок 16. Резко увеличенная толщина блестящей оболочки (стрелка) ооцита человека, ув.300.

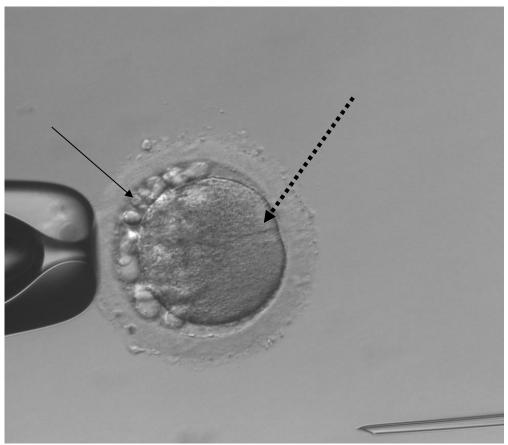


Рисунок 17. В зрелой женской половой клетке присутствует мультифрагментация первого полярного тельца (стрелка), ооцит после инъекции ИКСИ, виден след инъекционной иглы в цитоплазме ооцита (пунктирная стрелка), ув.350

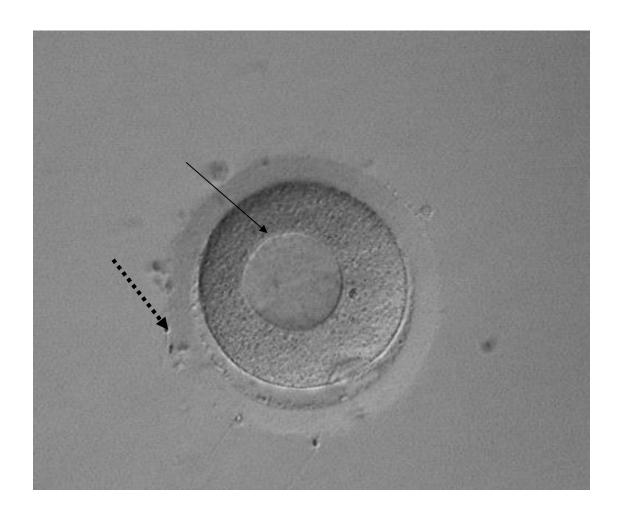


Рисунок 18. В цитоплазме зрелого ооцита визуализируется вакуоль, занимающая больше половины объема клетки (стрелка), ооцит после оплодотворения ЭКО, в блестящей оболочке визуализируются головки связавшихся с зоной сперматозоидов (пунктирная стрелка), ув.400

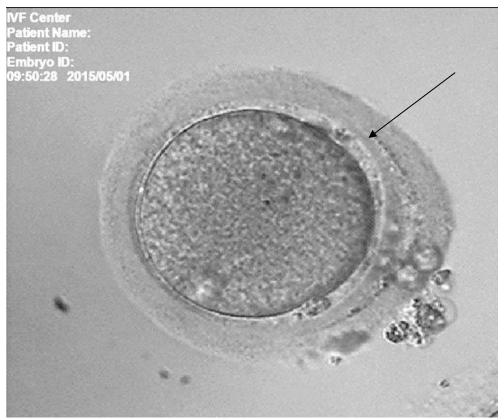


Рисунок 19. Нарушение строения зоны пеллюцида (деформация, стрелка), ув.400



Рисунок 20. Резко увеличенное полярное тельце ооцита, после оплодотворения пронуклеусы в цитоплазме ооцита отсутствуют, ув.450.

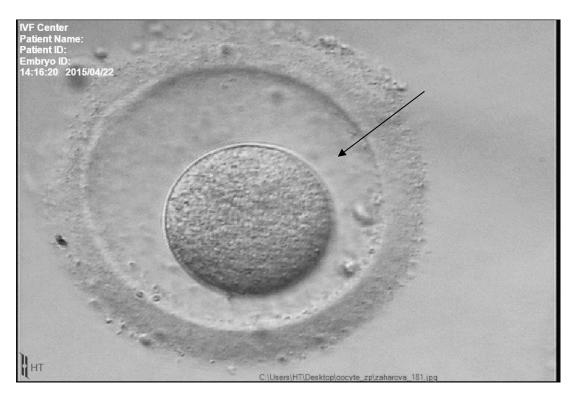


Рисунок 21. Наблюдается резко увеличенное перивителлиновое пространство ооцита человека (стрелка). Возможно, наблюдаемое явление вызвано осмотическим сжатием ооцита внутри блестящей оболочки (осмотический шок), ув.400.

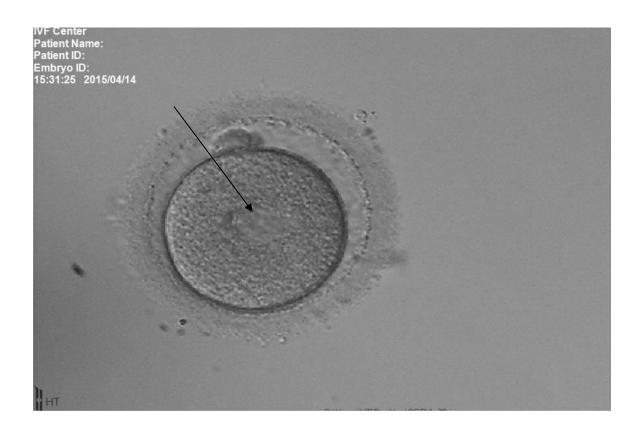


Рисунок 22. Агрегаты гладкого эндоплазматического ретикулума (ГЭР) в цитоплазме зрелого ооцита (стрелка). ГЭР выглядит как уплощенный диск, который при контрастировании по Хофману не имеет объема, ув.300.



Рисунок 23. Появление рефрактерного тела в цитоплазме зрелого ооцита (стрелка), ув.450.

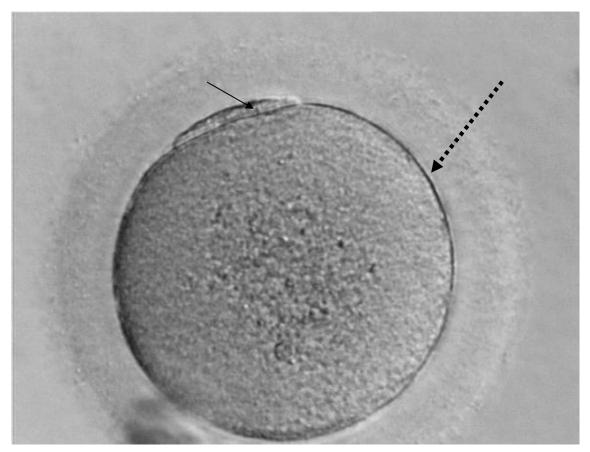


Рисунок 24. «Расплющенное» первое полярное тельце (незрелое) ооцит человека, отсутствие перивителлинового пространства (пунктирная стрелка), ув.450.

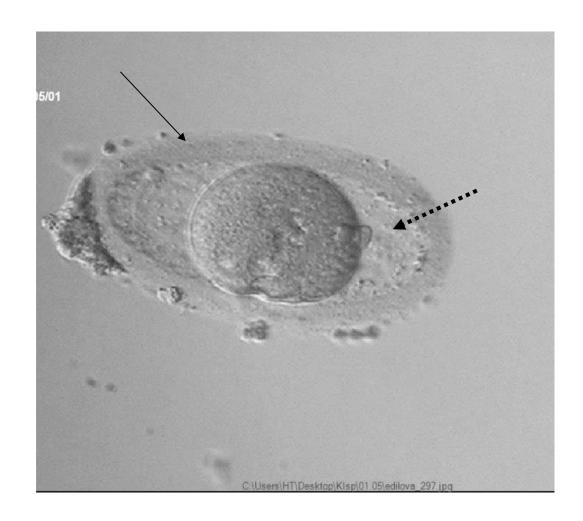


Рисунок 25. Изменение морфологии блестящей оболочки ооцита (стрелка), дебрис в перивителлиновом пространстве (пунктирная стрелка), ув.400.

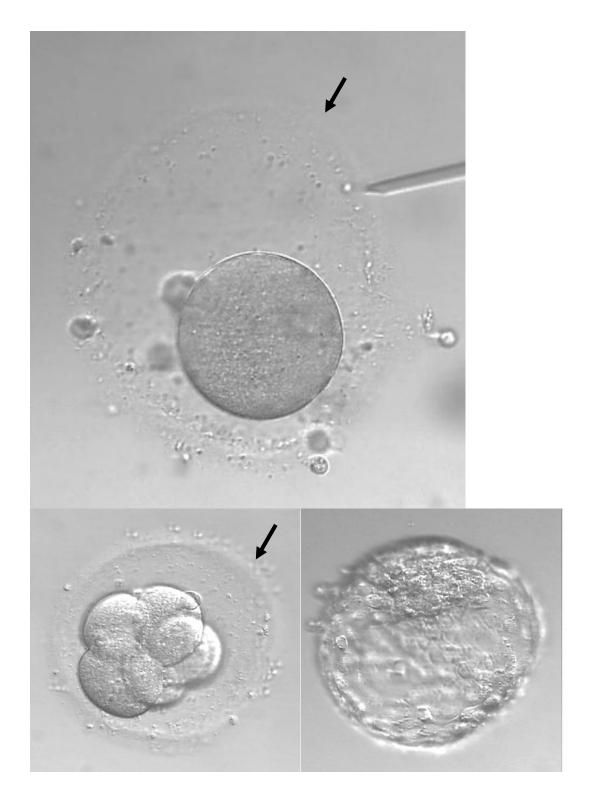


Рисунок 26. Стадии развития эмбриона человека, полученного при оплодотворении ооцита с выраженной деструкцией структуры зоны пеллюцида (стрелка). Показан ооцит, стадия 3-х суток развития (дробление) и 5-е сутки развития - бластоциста, ув. 400.

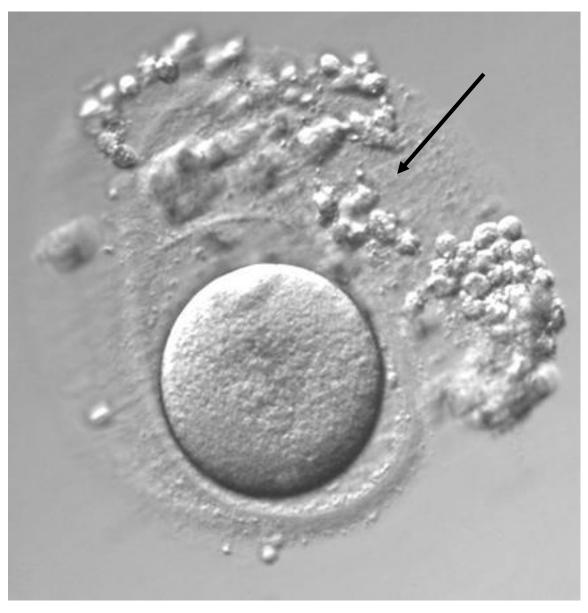


Рисунок 27. Изменение морфологии блестящей оболочки (стрелка ооцита человека на стадии М II), ув.600.

Из 2111 проанализированных ооцитов с экстрацитоплазматическими аномалиями в 1220 (57,8%) был выявлен дебрис в перивителлиновом пространстве, в 321 (15,2%) — увеличенное перивителлиновое пространство, 67 (3,2%) — деформация блестящей оболочки, 455 (21,6%) ооцитов с аномалиями первого полярного тельца, в 23 (1,1%) была утолщена блестящая оболочка, в 25 (1,2%) — истончение зоны пеллюцида. Структура патологий экстрацитоплазматических структур указана в таблице 3. Необходимо отметить, что в данной работе все виды нарушений первого полярного тельца были изучены в рамках одной группы по причине их малочисленности. Как мультифрагментация, так и увеличение первого полярного тельца считали одной патологией — аномалия первого полярного тельца.

Таблица 3. Частота выявления различных форм патологии экстрацитоплазматических структур ооцита

Выявленная морфология ооцита	n	%
Дебрис в перивителлиновом пространстве	1220	57,8%
деорие в перивителянновом пространетве	1220	37,070
Увеличенное перивителлиновое пространство	321	15,2%
Деформация блестящей оболочки	67	3,2%
Аномалии первого полярного тельца	455	21,6%
Утолщение зоны пеллюцида	23	1,1%
Истончение зоны пеллюцида	25	1,2%

Как видно из приведенного анализа, экстрацитоплазматические аномалии зрелых женских половых клеток распределены достаточно неравномерно: чаще всего в ооцитах человека встречается дебрис в перивителлиновом пространстве, самой редкой патологией в данном исследовании были изменения морфологии блестящей оболочки (как формы, так и толщины).

Что касается цитоплазматических форм патологии, то из 1324 ооцитов рефрактерные тельца в цитоплазме были обнаружены в 626 (47,3%) клетках, центрально выраженная гранулярность — 341 (25,8%), агрегаты гладкого эндоплазматического ретикулума в 199 ооцитах (15%), вакуоли различных размеров в 158 (11,9%) ооцитах (таблица 4).

Таблица 4. Частота выявления различных форм патологии цитоплазмы ооцита

De can rousea wondo rousea consum		%
Выявленная морфология ооцита	n	70
Вакуолизация цитоплазмы	158	11,9%
		-
Центрально выраженная гранулярность	341	25,8%
Агрегаты гладкого эндоплазматического		
ретикулума	199	15,0%
D. 1	(2)	47.20/
Рефрактерные тельца	626	47,3%

В данном исследовании не рассматривались ооциты с нарушением вязкости по причине субъективности данного критерия. Нарушение симметрии женских половых клеток также были исключены по причине их немногочисленности.

Все проанализированные ооциты были оплодотворены методом ИКСИ. Сочетанная патология была исключена из анализа раннего эмбриогенеза для того, чтобы выяснить влияние отдельного вида нарушений ооцитов на раннее предимплантационное развитие эмбрионов человека.

Частота оплодотворения ооцитов существенно различалась между группами (таблица 5). В группе морфологически нормальных ооцитов частота формирования зигот 2PN2PB составила 94%, из 1472 ооцитов нормально оплодотворились 1383. Частота аномального оплодотворения (более 3 пронуклеусов) составила менее 1% (0,8%), частота дегенерации

ооцитов после инъекции сперматозоида в цитоплазму составила 3,3%, не оплодотворились в данной группе 2% клеток.

По сравнению с морфологически нормальными ооцитами частота оплодотворения в экспериментальных группах была достоверно ниже. В группе с нарушениями экстрацитоплазматических структур доля зигот была 85,7%, аномальное оплодотворение наблюдали в 1,3% случаев, дегенерация ооцитов произошла в 6,3%, не оплодотворились 6,6% клеток.

Таблица 5. Показатели нормального оплодотворения(2PN2PB) ооцитов

с различной морфологией

Группа	n	2PN2PB	<i>p</i> *
Морфологически нормальные ооциты	1472	1383 (94%)	
Цитоплазматические аномалии ооцитов	1324	1045 (78,9%)	0,002
Экстрацитоплазматические аномалии ооцитов	2111	1810 (85,7%)	0,06

^{*} р-уровень для сравнения двух групп согласно критерию Хи-квадрат с поправкой Йейтса

В группе с цитоплазматическими нарушениями были зафиксированы самые низкие показатели оплодотворения — 78,9%, и большая доля клеток с аномальным числом пронуклеусов — 6,5%, дегенерация после инъекции сперматозоида встречалась в 9,9% случаев, не оплодотворились 4,7% ооцитов (таблица 6).

Микрофотографии зигот после оплодотворения ооцитов с различными морфологическим нарушениями, а также различные виды аномалий оплодотворения, представлены на рисунках 29-33.

Проведенный анализ параметров оплодотворения показал, что ооциты с нарушениями цитоплазмы имеют самую низкую частоту нормального

оплодотворения. Был проведен анализ параметров оплодотворения внутри данной группы.

Таблица 6. Показатели различных видов нарушения оплодотворения

ооиитов в сравниваемых группах

,		<i>p</i> *		<i>p</i> *		<i>p</i> *
Группа	1PN, 3PN и более		Дегенер ация		OPN	
Морфологически нормальные ооциты	12 (0,8%)		48 (3,3%)		29 (2%)	
Цитоплазматические аномалии ооцитов	86 (6,5%)	p<0,01	131 (9,9%)	0,001	62 (4,7%)	p<0,01
Экстрацитоплазмати ческие аномалии ооцитов	28 (1,3%)	нд	13 (6,3%)	0,001	140 (6,6%)	p<0,01

^{*} р-уровень для сравнения двух групп согласно критерию Хи-квадрат с поправкой Йейтса

Среди ооцитов с цитоплазматическими аномалиями наименьшую частоту оплодотворения имели ооциты с агрегатами гладкого эндоплазматического ретикулума — 44,7%, что является крайне низкой величиной. Самый высокий показатель оплодотворения имели ооциты с рефрактерными тельцами в цитоплазме — 92,2%, что было сравнимо с частотой оплодотворения ооцитов с нормальной морфологией (таблица 7 рисунок 28). Для поиска причин крайне низкой частоты оплодотворения ооцитов с агрегатами ГЭР в цитоплазме был проведен анализ техники интрацитоплазматической инъекции сперматозоида. На рисунке 34 показана дегенерация ооцита с агрегатами ГЭР в цитоплазме. Видно, что происходит лизис цитоплазмы, оолемма не смыкается, и происходит дегенерация клетки.

Таблица 7. Показатели частоты нормального оплодотворения ооцитов с различными видами цитоплазматических нарушений

Цитоплазматическая аномалия				
ооцитов	n	2PN	%	
Вакуолизация цитоплазмы	158	123	77,8%	
Центрально выраженная	341	256	75,1%	
гранулярность	341	230	75,170	
Агрегаты ГЭР	199	89	44,7%	
Рефрактерные тельца	626	577	92,2%	

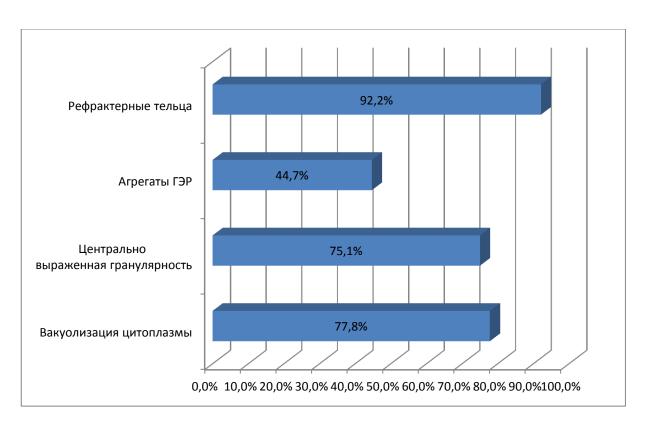


Рисунок 28. Частота нормального оплодотворения внутри группы ооцитов с различными видами нарушений морфологии цитоплазмы.

Согласно классической процедуре выполнения интрацитоплазматической инъекции, описанной в литературе, сперматозоид следует «оставлять» в центральной части цитоплазмы. Однако в ооцитах с ГЭР оплодотворение именно в центральной части часто агрегатами приводило К дегенерации женской клетки, показанной на микрофотографии 29. Нами была выдвинута гипотеза о возможности модификации техники ИКСИ и «оставлении» сперматозоида в неповрежденной части цитоплазмы. Для этого было набрано 77 ооцитов с агрегатами ГЭР, которые поделили на две группы: группа 1 — классическая техника ИКСИ, группа 2 — оплодотворение в неповрежденной части цитоплазмы. Показатели оплодотворения представлены в таблице 8. Как показала практика и анализ данных, применение модифицированной тактики позволило достоверно снизить частоту дегенерации женских половых клеток при оплодотворении ИКСИ. Остальные показатели были лучше, однако достоверной разницы показано не было в силу маленькой выборки.

Таблица 8. Показатели частоты оплодотворения ооцитов с агрегатами гладкого эндоплазматического ретикулума классической и модифицированной методикой ИКСИ

Ооциты с						Деге-		0	
агрегатами		2PN		1,3РNи		нера-		P	
ГЭР	n	2PB	%	более	%	ция	%	N	%
Классическая	40	16	40.00/	5	12.50/	16	40,0	3	7.50/
тактика ИКСИ	40	16	40,0%	5	12,5%	16	%	3	7,5%
Оплодотворе-									
ние в							10.5		10.0
неповрежден-	37	25	67,6%	3	8,1%	5	13,5	4	10,8
ной части							70		70
цитоплазмы									
P*			0,1		0,2		0,04		0,6

^{*} p-уровень для сравнения двух групп согласно критерию Xu-квадрат с поправкой Йейтса

Среди ооцитов с экстрацитоплазматическими аномалиями наименьшую частоту 80% имели ооциты с истончением блестящей оболочки, наибольшую 95,5% — с деформацией зоны пеллюцида. Результаты нормального оплодотворения представлены в таблице 9. Появление аномального числа пронуклеусов, а также частота дегенерации ооцитов с различными формами экстрацитоплазматических нарушений была сопоставима с таковыми показателями в группе с морфологически нормальными ооцитами.

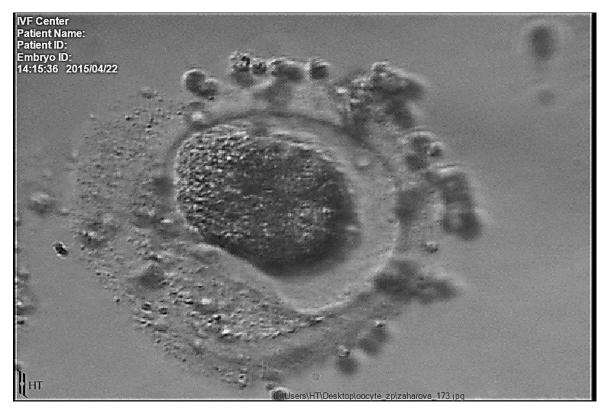


Рисунок 29. Дегенерация ооцита с аномалией блестящей оболочки после инъекции сперматозоида, ув. 600.

Таблица 9. Показатели частоты нормального оплодотворения ооцитов с экстрацитоплазматическими аномалиями

Ооциты с экстрацитоплазматическими			
аномалиями	n	2PN2PB	%
Дебрис в перивителлиновом пространстве	1220	1020	83,6%
Увеличенное перивителлиновое пространство	321	302	94,1%
Деформация блестящей оболочки	67	64	95,5%
Аномалии первого полярного тельца	455	384	84,4%
Утолщение зоны пеллюцида	23	20	87,0%
Истончение зоны пеллюцида	25	20	80,0%

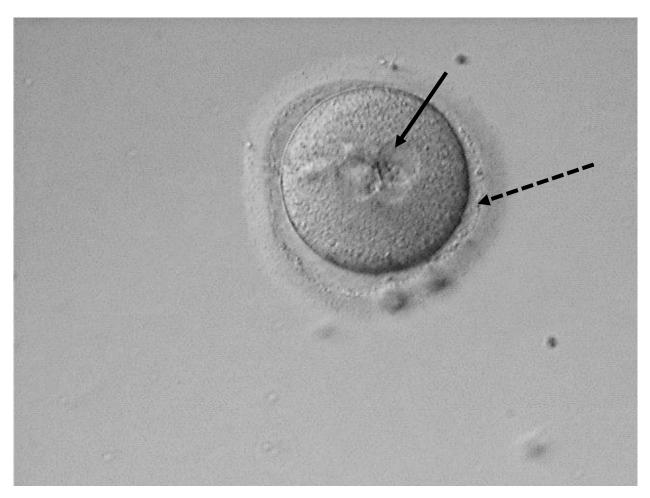


Рисунок 30. Аномальное оплодотворение ооцита с дебрисом в перивителлиновом пространстве (пунктирная стрелка). В цитоплазме визуализируется три пронуклеуса (стрелка), в перивителлиновом пространстве полярные тельца не видны, ув. 400

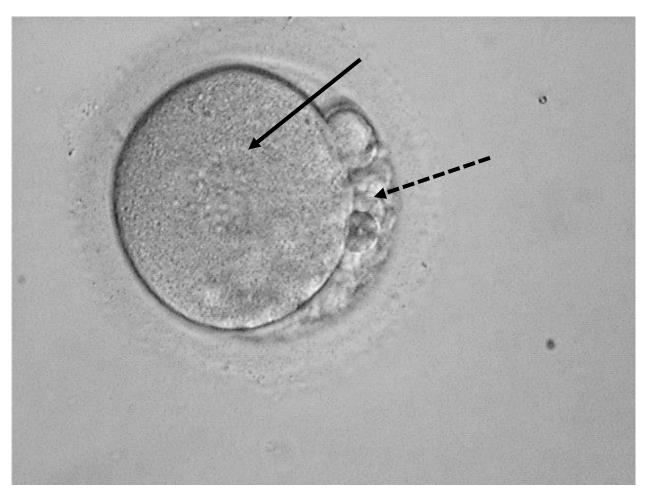


Рисунок 31. Аномальное оплодотворение ооцита с мультифрагментацией полярного тельца в перивителлиновом пространстве (пунктирная стрелка). В цитоплазме визуализируется четыре пронуклеуса (стрелка), ув.400

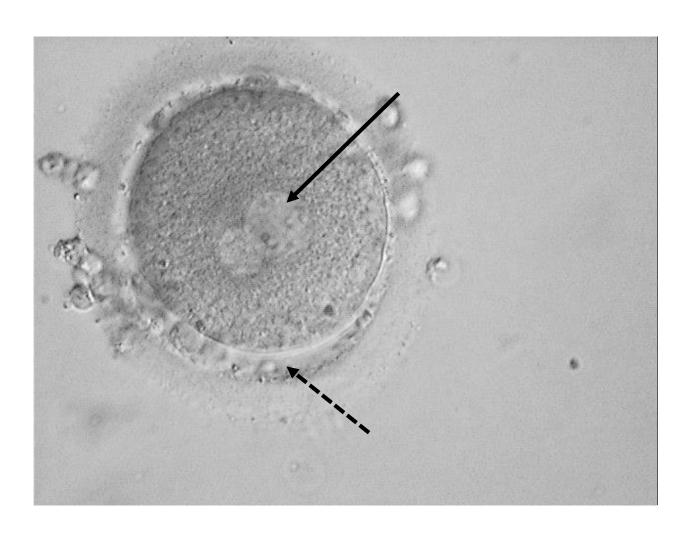


Рисунок 32. Нормальное оплодотворение ооцита человека (зигота). В цитоплазме можно наблюдать два пронуклеуса (стрелка). В перивителлиновом пространстве визуализируется дебрис (пунктирная стрелка), ув.400

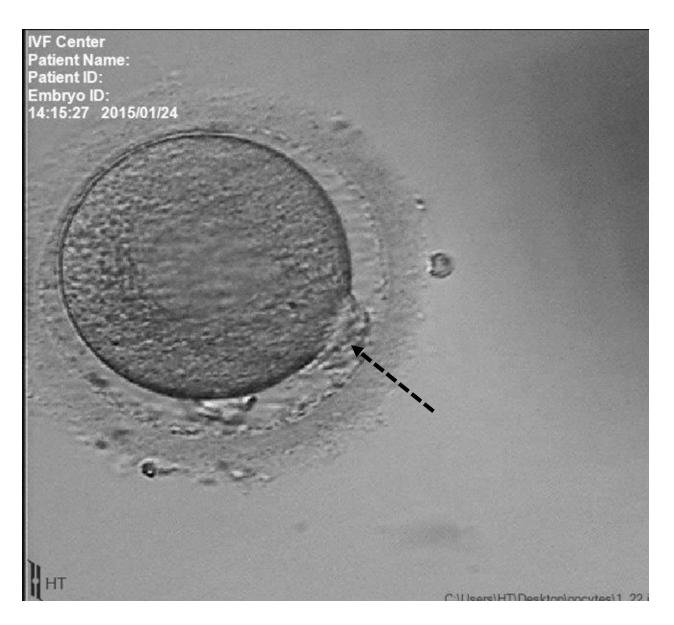


Рисунок 33. Дегенерация ооцита с агрегатами гладкого эндоплазматического ретикулума в цитоплазме (стрелка) после инъекции сперматозоида. «Вытекание» цитоплазмы в месте прокола инъекционной иглы (пунктирная стрелка), смыкание оолеммы отсутствует. Ув.450

Для оценки раннего эмбриогенеза и влияния нарушений морфологии женских половых клеток на развитие эмбриона человека было отобрано 1547 эмбрионов. В группе цитоплазматических аномалий 575, 416 в группе экстрацитоплазматических аномалий и 556 в группе морфологически нормальных ооцитов. При оценке морфологических характеристик эмбрионов, полученных из ооцитов с различными морфотипами, были выявлены существенные различия между группами. Для каждой группы производили оценку доли эмбрионов разных классов (A, B и C) на 3-и сутки культивирования, а также доли эмбрионов, остановившихся в развитии на раннем этапе культивирования. Результаты показаны в таблице 10.

Эмбрионов было получено 268 (46,6%) B класса Α группе (52,6%)цитоплазматическими аномалиями, 219 группе экстрацитоплазматических и 365 (65,7%) в группе морфологически нормальных ооцитов (p<0,0001). Соответственно по группам было получено 214 (37,2%), 150 (36,1%) и 152 (27,3%) эмбрионов класса В (р=0,0008); 66 (11,5%), 43 (10,3%) и 29 (5,2%) эмбрионов класса С (p=0,0005).

Таблица 10. Характеристика ранних дробящихся эмбрионов при

различных морфологических особенностях ооцитов

	n	A	%	В	%	C	%	D	%
Морфологически нормальные ооциты	556	365	65,6%	152	27,3%	29	5,2%	10	1,8%
Цитоплазматические аномалии ооцитов	575	268	46,6%	214	37,2%	66	11,5%	27	4,7%
Экстрацитоплазматически е аномалии ооцитов	416	219	52,6%	150	36,1%	43	10,3%	4	1,0%
p*		p<0,001							

^{*} p-уровень для сравнения трех групп согласно критерию Xu-квадрат с поправкой Йейтса

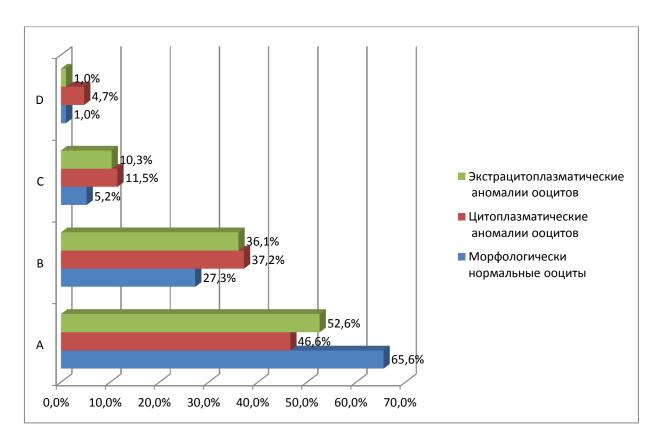


Рисунок 34. Характеристика ранних преимплантационных эмбрионов в группах сравнения. Эмбрионы классов A,B,C, и D (классификация эмбрионов по качеству описана в разделе «Материалы и методы»)

Остановка дробления в первые 72 часа (эмбрионы класса после оплодотворения произошла у 27 (4,7%), 4 (1%) и 10 (1,8%) по группам соответственно (p=0,0004). Таким образом, наибольшее число качественных эмбрионов было получено в группе с нормальными ооцитами, а максимальное число эмбрионов класса С и остановившихся в развитии — в группе с цитоплазматическими нарушениями (Рисунок 34).

В группе с морфологически нормальными ооцитами не было ни одного протокола культивирования с отсутствием эмбрионов, пригодных для переноса в полость матки. При этом 8 циклов культивирования в группе ооцитов с цитоплазматическими аномалиями (5,8%) и 7 циклов в группе с экстрацитоплазматическими аномалиями (7,2%) завершились отменой переноса эмбрионов в полость матки (p=0,0246), эмбрионы были неудовлетворительного качества. Дробление ранних эмбрионов человека различного качества показаны на микрофотографиях 36–41.

Анализ эмбриологического этапа при различных видах патологии женских половых клеток выявил важную особенность — ооциты с экстрацитоплазматическими аномалиями могут рассматриваться как ооциты с нормальной морфологией (по эмбриологическим критериям), а нарушения цитоплазмы влияют на качество эмбрионов, что приводит к ухудшению частоты наступления беременности и частоты имплантации.

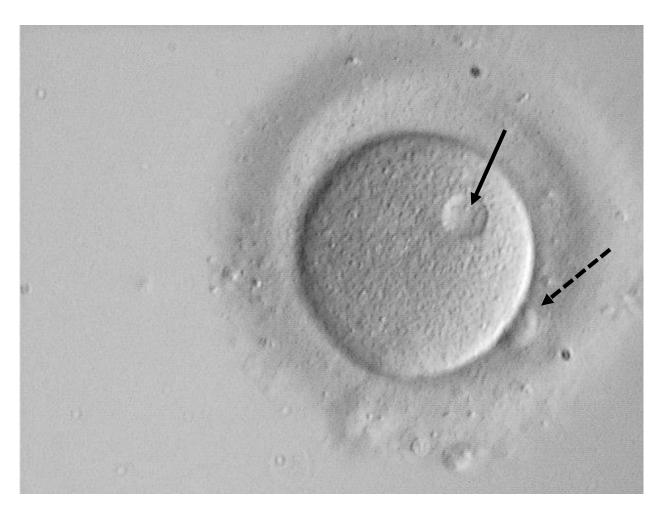


Рисунок 35. Аномальное оплодотворение ооцита. В цитоплазме визуализируется один пронуклеус (стрелка), в перивителлиновом пространстве одно полярное тельце (пунктирная стрелка), ув. 450



Рисунок 36. Эмбрион вторых суток культивирования класса A с 3 бластомерами (стрелка) без фрагментации, ув. 450

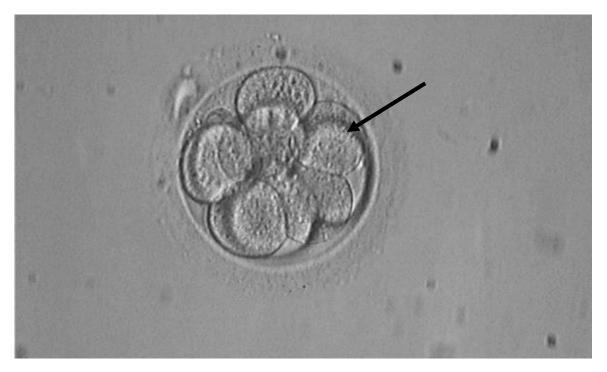


Рисунок 37. Эмбрион третьих суток культивирования класса A с 8 бластомерами (стрелка) без фрагментации, ув.400

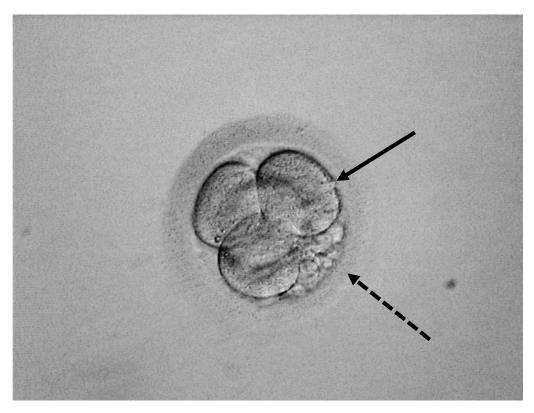


Рисунок 38. Эмбрион вторых суток культивирования класса B c 3 бластомерами (стрелка) с 10% фрагментации (пунктирная стрелка), ув. 400

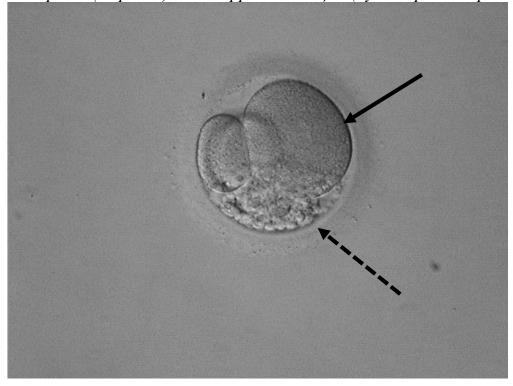


Рисунок 39. Эмбрион вторых суток культивирования класса C с 3 неравномерными бластомерами (стрелка) с 50% фрагментации (пунктирная стрелка), ув.400

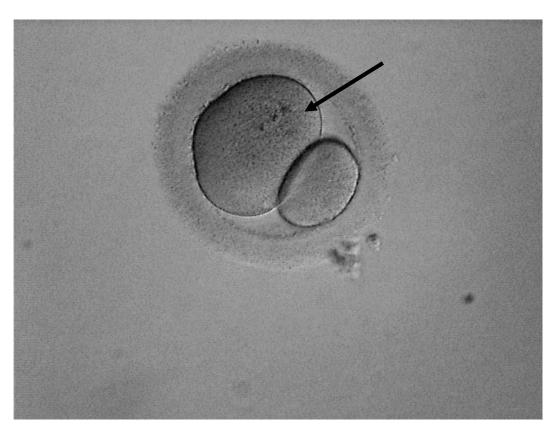


Рисунок 40. Эмбрион вторых суток культивирования класса A с 2 неравномерными бластомерами (стрелка) без фрагментации, ув.400



Рисунок 41. Эмбрион третьих суток культивирования класса D, дегенерация эмбриона, ув. 400

3.2. Определение числа копий митохондриальной ДНК в ооцитах с различными морфологическими аномалиями

Данные, полученные на первом этапе настоящего исследования выявили закономерности раннего эмбриогенеза при оплодотворении ооцитов с различными видами морфологических аномалий. Для выяснения причин низкой частоты оплодотворения и низкого качества эмбрионов при видимых изменениях структур женских половых клеток был выполнен второй этап. Была выдвинута гипотеза о нарушении митохондрий в ооцитах с видимыми морфологическим аномалиями как причины неполного созревания клетки. Цитоплазматическое созревание включает в себя ряд сложных событий, включая синтез белка и транскрипцию цитоплазматической РНК, на функцией требуется энергия. Важнейшей осуществление которых митохондрий является продукция универсального переносчика энергии – АТФ путем окислительного фосфорилирования жирных кислот и глюкозы. Кроме того, биологическими функциями митохондрий являются регуляция цитозольной концентрации апоптоза, кальция, a также синтеза железносерных кластеров – белковых кофакторов, играющих важную роль в процессе окислительно-восстановительных реакций в клетке. Митохондрии являются первичным источников эндогенных активных форм кислорода и местом протекания важнейших биохимических процессов в клетке – цикла трикарбоновых кислот (цикл Кребса) и фрагмента орнитинового цикла. Поэтому митохондрии играют чрезвычайно важную роль в обеспечении энергии, потребляемой во время процесса созревания ооцитов и во время дальнейшего развития эмбриона.

Хотя число копий мтДНК в ооцитах широко варьируется в различных исследованиях, ооциты с более низким числом копий мтДНК, по-видимому, имеют более низкие шансы на нормальное оплодотворение. Для проверки гипотезы у 198 женщин с нормальным кариотипом с их информированного согласия было отобрано 343 ооцита, не оплодотворившихся в программах экстракорпорального оплодотворения. Ооциты с цитоплазматическими

аномалиями составили группу 1 (n=126), с экстрацитоплазматическими — группу 2 (n=108), ооциты с нормальной морфологией — группу 3 (n=109).

Структура цитоплазматических и экстрацитоплазматических форм патологии изученных ооцитов представлена в таблице 11.

Таблица 11. Частота встречаемости различных видов аномалий

ооцитов в изучаемых группах

Морфологические особ ооцитов		n	%	
Морфологически нормальные ооциты				109
	Вакуолизация цитоплазмы	18	14,3%	
Цитоплазматические аномалии ооцитов	Центрально выраженная гранулярность	54	42,9%	126
	Агрегаты ГЭР	34	27,0%	
	Рефрактерные тельца	20	15,9%	
	Дебрис в перивителлиновом пространстве	58	53,7%	
Экстрацитоплазматические аномалии ооцитов	Увеличенное перивителлиновое пространство	18	16,7%	100
	Деформация блестящей оболочки	11	10,2%	108
	Аномалии первого полярного тельца	5	4,6%	
	Утолщение зоны пеллюцида	16	14,8%	

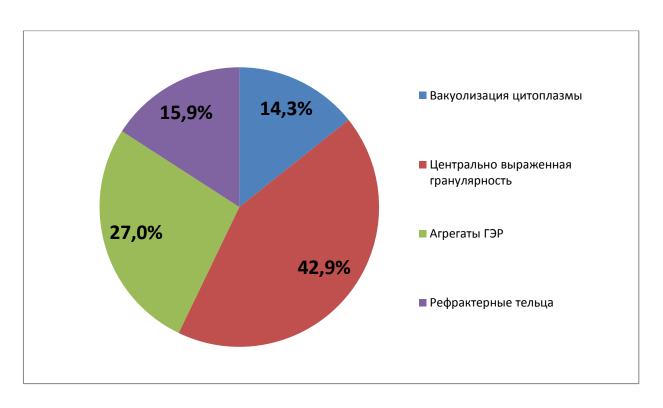


Рисунок 42. Структура цитоплазматических аномалий изученных ооцитов



Рисунок 43. Структура экстрацитоплазматических аномалий изученных ооцитов

Распределение числа копий мтДНК ооцитов находилось в диапазоне от 5'440 до 9'800'000 копий. Медиана распределения составила 2'000'000 с интерквартильным размахом от 813'000 до 3'300'000 копий.

В группе 1 медиана мтДНК с интерквартильным размахом составила 1'300'000 (263'500 – 2'325'000) копий, в группе 2 – 2'000'000 (1'350'000 – 4'150'000) копий, в группе 3 – 2'500'000 (1'400'000 – 4'000'000) копий (р<0,0001) (рисунок 44). Мы также провели сравнение каждой группы ооцитов с аномалиями с группой морфологически нормальных ооцитов, а также группы с различными видами аномалий между собой. Распределение числа копий мтДНК ооцитов в группе 1 статистически значимо различалось от группы 2 и группы 3 (р<0,0001), при этом значимых различий между группами 2 и 3 не было.

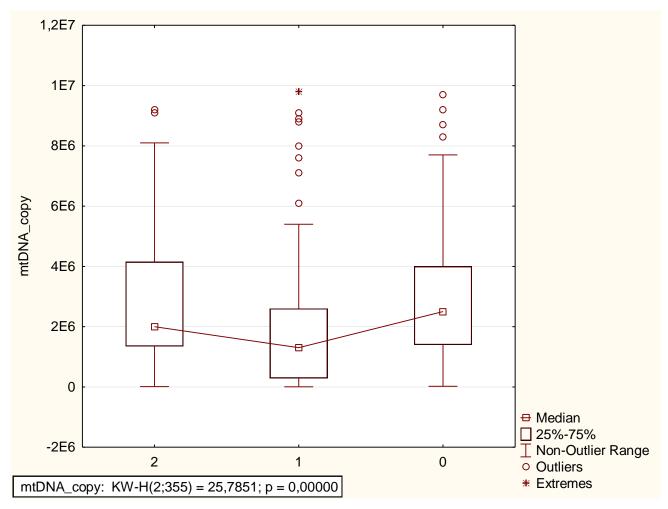


Рисунок 44. Число копий мтДНК в ооцитах с цитоплазматическими аномалиями (1), экстрацитоплазматическими аномалиями (2) и с отсутствием таковых (0)

Среди ооцитов с цитоплазматическими аномалиями минимальное число копий было выявлено у ооцитов с агрегатами ГЭР (Me=505'000, range=105'000 – 1'600'000 копий), максимальное – у ооцитов с рефрактерными тельцами (Me=2'350'000, range=1'600'000-3'300'000 копий) (Таблица 12). Среди ооцитов с экстрацитоплазматическими аномалиями значимой разницы в числе копий мтДНК у ооцитов разной морфологии выявлено не было (p=0,1211).

Таблица 12. Число копий мтДНК в ооцитах с различными цитоплазматическими аномалиями

Группа	n	Среднее значение	Стандартное отклонение	Медиана	Интерквар- тильный размах	Минимум- максимум
		1'737'341	1'795'534	1'200'000	229'000-	7'970-
Вакуолизация цитоплазмы	59				2'300'000	7'600'000
		1'778'790	2'188'078	1'400'000	284'000-	10'400-
Центрально выраженная гранулярность	20				2'150'000	9'100'000
		1'235'126	1'775'019	505'000	105'000-	5'440-
Агрегаты ГЭР	29				1'600'000	8'000'000
Рефрактерные тельца	18	2'704'500	2'219'409	2'350'000	1'600'000- 3'300'000	212'000- 9'800'000

Был проведен анализ факторов, способных оказать влияние на число копий мтДНК в ооцитах. Качество спермы не оказывало влияние на мтДНК. Среднее число копий в ооцитах, оплодотворенных фертильной спермой, составило 2'702'237±2'165'088, а в ооцитах, оплодотворенных спермой с низкой подвижностью и нарушенной морфологией, 2'387'334±2'130'754 (p=0,26).

3.3. Оценка анеуплоидии эмбрионов, полученных из ооцитов с выявленными морфологическими нарушениями

Для изучения риска развития анеуплоидии 13, 18, 21, X, Y хромосом в ядрах бластомеров эмбрионов, полученных из ооцитов с различными морфологическими характеристиками было проведено проспективное когортное исследование. Критерием отнесения пациенток в группу с аномалиями морфологии женских половых клеток было наличие 100% ооцитов с патологией цитоплазмы или экстрацитоплазматическими нарушениями, в группу без аномалий – наличие 100% нормальных ооцитов.

Экспериментальную группу составили пациентки с аномалиями ооцитов: группу ЦП — с цитоплазматическими нарушениями ооцитов, группу эЦП — с экстрацитоплазматическими, группу N — пациентки с морфологически нормальными ооцитами.

Для оценки влияния уровня анеуплоидии хромосом в сперматозоидах на риск получения анеуплоидных эмбрионов было проведено сравнение групп эмбрионов, прошедших преимплантационный генетический скрининг. В результате 84 циклов ЭКО+ИКСИ+ПГС было 643 ооцитполучено кумулюсных комплекса (ОКК). В группе эЦП было получено 220 ОКК (7,9±4,4 на 1 пациентку), в группе N было получено 242 ОКК (8,6±5,0 на 1 пациентку) (р=0,1833). Из них зрелых ооцитов было получено 578 (161 в группе ЦП (89,0%), 189 в группе эЦП (85,9%), 228 в группе N (94,2%)), незрелых -65 (20 в группе ЦП (11,0%), 31 в группе эЦП (14,1%), 14 в группе N (5,8%)). При проведении сравнительного анализа было выявлено, что среднее количество незрелых ооцитов было погранично выше у пациенток с аномалиями ооцитов $(0.7\pm1.2 \text{ в группе ЦП}, 1.1\pm1.4 \text{ в группе эЦП}, 0.5\pm0.9 \text{ в}$ группе N, p=0,0870). Хотя среднее число ОКК и зрелых ооцитов было выше у пациенток группы N, статистически значимых различий между группами выявлено не было. Все зрелые ооциты М II подвергали оплодотворению методом ИКСИ. Всего в изученных группах было получено 529 эмбрионов: 140 в группе ЦП, 173 в группе эЦП и 216 в группе N. Среднее число

эмбрионов было погранично выше у пациенток с морфологически нормальными ооцитами и составило 5,0±3,1, 6,2±3,2 и 7,7±4,7 в группах ЦП, эЦП и N, соответственно (р=0,0530). Среднее число эмбрионов хорошего качества (эмбрионы классов A и B, суммарно) было выше у пациенток с морфологически нормальными ооцитами и составило 4,4±2,8, 5,3±2,8 и 6,8±4,1 в группах ЦП, эЦП и N, соответственно (р=0,0282). Среднее число эмбрионов плохого качества, к которым относились эмбрионы класса C, а также эмбрионы, прекратившие дробление, не различалось в группах сравнения, что может быть связано с небольшим объемом выборки (таблица 13). После проведения морфологической оценки всем эмбрионам, имеющим более 5 бластомеров и менее 50% фрагментации, была проведена биопсия. В общей сложности биопсия была выполнена для 368 эмбрионов (98 эмбрионов в группе с цитоплазматическими аномалиями ооцитов, 126 эмбрионов в группе эЦП и 144 в группе N).

Таблица 13. Характеристика раннего эмбриогенеза в группах сравнения

Параметры эмбриогенеза	Группа ЦП	Группа эЦП	Группа N	р***-уровень
Число полученных эмбрионов	140	173	216	
Число эмбрионов	124	148 (85,6%)	190	
хорошего качества	(88,6%)		(88,0%)	
Среднее число эмбрионов хорошего качества на 1 пациентку*	4,4±2,8	5,3±2,8	6,8±4,1	0,0282
Число эмбрионов плохого	16	25 (14,4%)	26	
качества	(11,4%)		(12,0%)	
Среднее число эмбрионов плохого качества*	0,6±0,9	0,9±1,6	0,9±1,7	0,9583

^{*}Данные представлены как средние ± стандартное отклонение; **Данные представлены как абсолютные значения и %; ***ANOVA

На микрофотографиях 44–48 показана *in situ* гибридизация хромосом в бластомерах эмбриона человека.

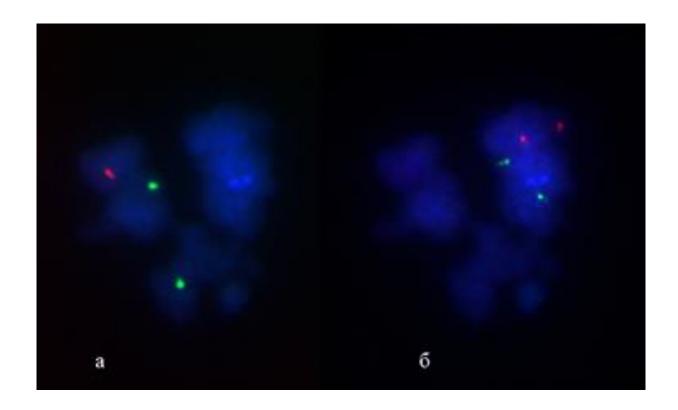


Рисунок 45. FISH-анализ ядра бластомера эмбриона (XXY) с использованием зонда PGT на пять хромосом: а: хромосома X-зеленый, хромосома Y-красный, хромосома 18 -синий; б: хромосома 21-зеленый, хромосома 13-красный, хромосома 18 -синий

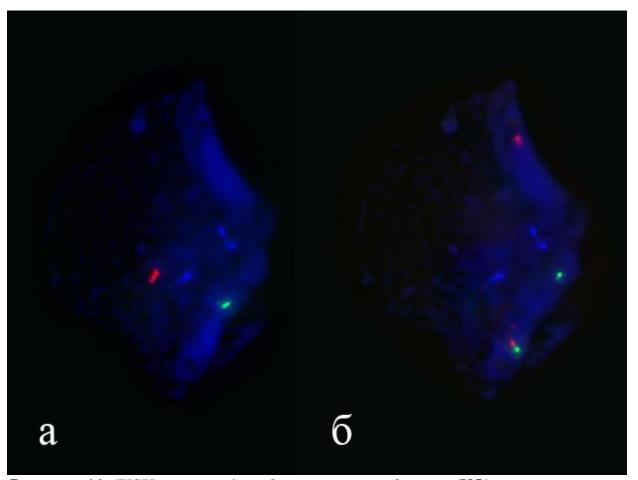


Рисунок 46. FISH-анализ ядра бластомера эмбриона (XO)с использованием зонда PGT на пять хромосом: а: хромосома X-зеленый, хромосома Y-красный, хромосома 18 -синий; б: хромосома 21-зеленый, хромосома 13-красный, хромосома 18 -синий

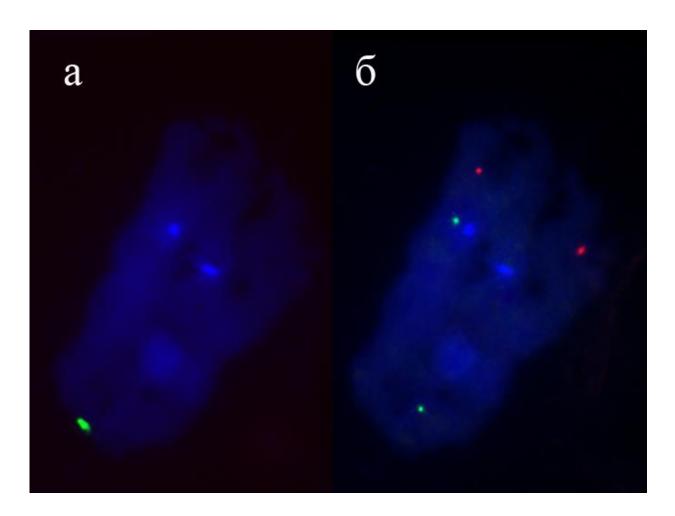


Рисунок 47. FISH-анализ ядра бластомера эмбриона (трисомия по 18 хромосоме) с использованием зонда PGT на пять хромосом: а: хромосома X-зеленый, хромосома Y-красный, хромосома 18 -синий; б: хромосома 21-зеленый, хромосома 13-красный, хромосома 18 -синий

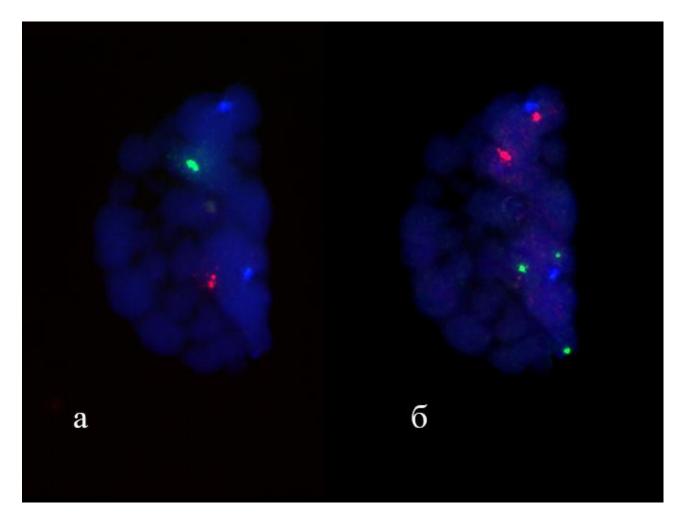


Рисунок 48. FISH-анализ ядра бластомера эмбриона (норма XX) с использованием зонда PGT на пять хромосом: а: хромосома X-зеленый, хромосома Y-красный, хромосома 18 -синий; б: хромосома 21-зеленый, хромосома 13-красный, хромосома 18 -синий

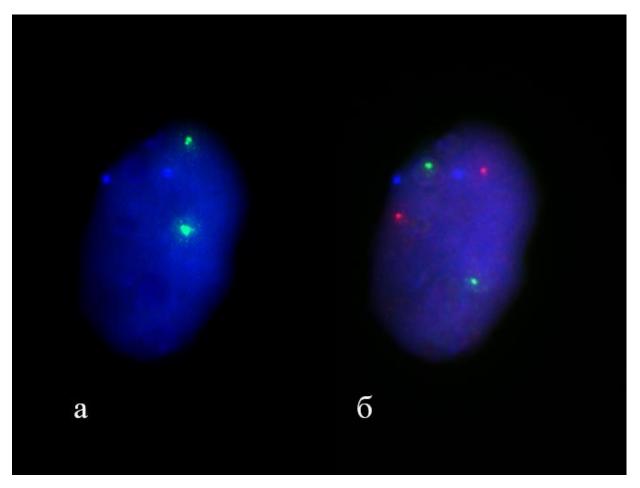


Рисунок 49. FISH-анализ ядра бластомера эмбриона (трисомия по 21 хромосоме) с использованием зонда PGT на пять хромосом: а: хромосома X-зеленый, хромосома Y-красный, хромосома 18 -синий; б: хромосома 21-зеленый, хромосома 13-красный, хромосома 18 -синий

В результате проведенного анализа хромосомного состава бластомеров было показано, что максимальное число анеуплоидных эмбрионов было получено в группе ЦП — 67 (68,4%), затем в группе эЦП — 49 (38,9%) и в группе N — 45 (31,3%) (p<0,0001). Распределение анэуплоидных эмбрионов по группах ооцитов показано в таблице 14 и рисунках 50, 51.

Таблица 14. Характеристика генетического статуса эмбрионов в группах сравнения

Морфологические особенности	•	ілоидные рионы	•	оидные рионы	Проанализи -ровано
изучаемых ооцитов	n	%	n	%	эмбрионов
Цитоплазматические аномалии ооцитов	67	68,4%	31	31,6%	98
Экстрацитоплазматические аномалии ооцитов	39	31,0%	87	69,0%	126
Морфологически нормальные ооциты	45	31,3%*	99	68,8%*	144

^{*} p-уровень для сравнения групп согласно критерию Xи-квадрат с поправкой Йейтса, p<0.001

 $OШ_{rp}$ получения эмбриона с анеуплоидией при наличии цитоплазматических аномалий составило 4,7 (95% ДИ=2,7; 8,3), при наличии экстрацитоплазматических нарушений 1,3 (95% ДИ=0,8; 2,3), при наличии морфологических нарушений в целом 2,4 (95% ДИ=1,5; 3,7).

Было также проанализировано число эмбрионов, в которых не наблюдали дальнейшего дробления после проведения биопсии. Число эмбрионов, остановившихся в развитии, составило в группе ЦП — 25 (25,5%), в группе эЦП — 19 (15,1%), в группе N — 7 (4,9%) (p<0,0001).

 $OШ_{кор}$ получения анеуплоидных эмбрионов при наличии каких-либо морфологических нарушений ооцитов составило 1,7 (95% ДИ=1,05; 2,7).

 $OШ_{кор}$ получения анеуплоидных эмбрионов при наличии цитоплазматических аномалий по сравнению с нормальными ооцитами составило 3,6 (95% ДИ=1,8; 7,2). $OШ_{кор}$ получения анеуплоидных эмбрионов при наличии экстрацитоплазматических нарушений по сравнению с нормальными ооцитами составило 1,3 (95% ДИ=0,7; 2,1).

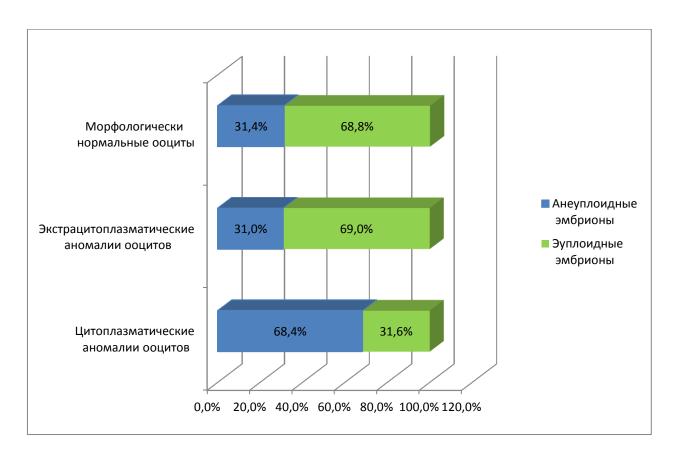


Рисунок 50. Структура генетических аномалий эмбрионов, полученных из ооцитов с морфологическим нарушениями

Среди ооцитов с цитоплазматическими аномалиями было 62 ооцитов с центральной гранулярностью, 4 ооцита с вакуолями, 23 ооцита с агрегатами 9 ооцитов ГЭР. рефрактерными тельцами. Среди ооцитов c экстрацитоплазматическими аномалиями было 59 ооцитов с дебрисом в перивителлиновом пространстве, 48 ооцитов имели расширенное 29 ооцитов перивителлиновое пространство и утолщением пеллюцида. Число анеэуплоидных эмбрионов, полученных из ооцитов с

различными видами морфологических нарушений, представлено в таблице 14 и на рисунках 50,51.

Таблица 15. Доля анеуплоидных эмбрионов, полученных из ооцитов с различными видами морфологически нарушений по сравнению с

морфологически нормальными ооцитами

Морфологические особенности		ооцита.	Анеуп.	поидные Эионы	•	оидные рионы	p*-
	аемых ооцитов	Всего	n	%	n	%	уровень
Цитоплазма	Центрально выраженная гранулярность	62	43	69,4%	19	30,6%	<0,001
тические аномалии	Вакуолизация цитоплазмы	4	4	100,0%	0	0,0%	<0,05
ооцитов	Агрегаты ГЭР	23	15	65,2%	8	34,8%	<0,001
	Рефрактерные тельца	9	5	55,6%	4	44,4%	НД
	Дебрис в перивителлиновом пространстве	59	27	45,8%	32	54,2%	<0,05
Экстрацито-	Увеличенное перивителли-новое пространство	48	5	31,3%	33	68,8%	нд
плазматичес кие аномалии ооцитов	Утолщение зоны пеллюцида	29	7	24,1%	22	75,9%	нд
Морфологически нормальные ооциты		144	45	31,3%	99	68,8%	референ с

^{*} p-уровень для сравнения групп согласно критерию Xи-квадрат с поправкой Йейтса, p < 0.001

Максимальная доля анеуплоидных эмбрионов наблюдалась у эмбрионов, полученных из ооцитов с вакуолями (100%), с центрально выраженной гранулярностью (69,4%) и агрегатами ГЭР (65,2%). Учитывая малое количество наблюдений ооцитов с вакуолями, данные нельзя считать достоверными. Таким образом, максимальное число анеуплоидных

эмбрионов было получено из ооцитов с агрегатами ГЭР и центральной гранулярностью.

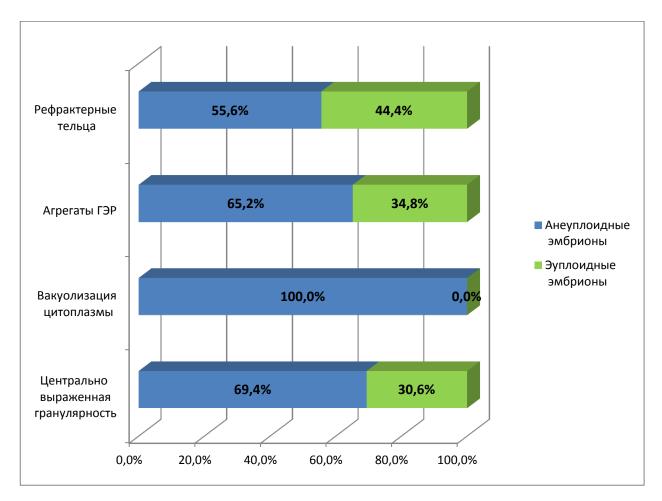


Рисунок 51. Структура генетических аномалий эмбрионов, полученных из ооцитов с цитоплазматическими аномалиями

Структура хромосомных аномалий представлена в таблице 16. Наиболее частыми типами анеуплоидий оказались полисомии хромосом. Следует отметить, что распространенность всех видом полисомий была значительно выше в эмбрионах, полученных из ооцитов с цитоплазматическими аномалиями. Интересно отметить, что в группе морфологически нормальных ооцитов во всех циклах ЭКО/ПГС был произведен перенос эмбрионов в полость матки, то есть из всей полученной когорты ооцитов были эуплоидные эмбрионы (хотя бы один). При этом в группе эмбрионов, полученных из ооцитов с нарушениями цитоплазмы, у 14 пациенток (50%), а

в группе эЦП у 2 пациенток (7,1%) перенос бластоцист не был произведен вследствие отсутствия эмбрионов без хромосомных аномалий (p<0,0001).

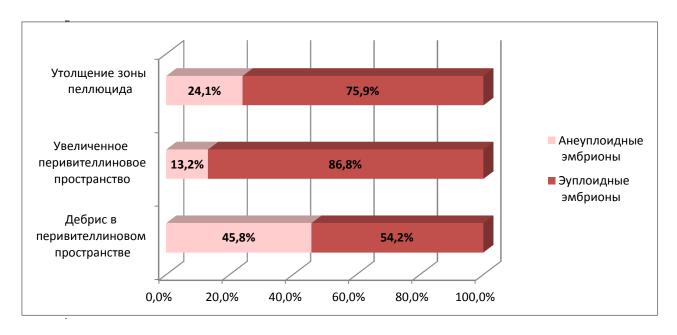


Рисунок 52. Структура генетических аномалий эмбрионов, полученных из ооцитов с экстрацитоплазматическими аномалиями

Таблица 16. Структура хромосомных нарушений у эмбрионов, полученных при оплодотворении ооцитов изучаемых групп

Группы	Моносомия (%)							
		13		18		21		X/Y
		0.4	N 7	0/		0/	`	норма)
	n	%	N	%	n	%	n	%
1a n=98	4	4,1%	7	7,1%	5	5,1%	64	65,3%
1б n=126	9	7,1%	7	5,6%	7	5,6%	106	84,1%
2 n=144	8	5,6%	6	4,2%	4	2,8%	125	86,8%
				Нулли	сомия(%)		
		13		18	21		X/Y	
	n	%	N	%	n	%	n	%
1a n=98	0	0%	1	1,0%	0	0%	8	8,2%
1б n=126	0	0%	4	3,2%	1	0,8%	7	5,6%
2 n=144	0	0%	0	0%	0	0%	8	5,6%

	Полисомия (%)							
	13		18		21		X/Y	
	n	%	N	%	n	%	n	%
1a n=98	22	22,4%	23	23,4%	22	22,4%	26	26,5%
1б n=126	9	7,1%	9	7,1%	15	11,9%	13	10,3%
2 n=144	7	4,9%	7	4,9%	15	10,4%	11	7,6%
χ ² -тест, р- уровень		p<0,01	p.	<0,01	-	нд		p<0,01

3.4. Электронно-микроскопическое изучение ооцитов с нарушением морфологии цитоплазмы

На основании вышеизложенных результатов генетического статуса эмбрионов в качестве анализируемой патологии была выбрана центральная гранулярность ооцитов как самая тяжелая степень поражения клеток. Была выдвинута гипотеза о гранулярности как о внутриклеточном поражении, которое приводит к нарушению расхождения хромосом при делении клеток эмбриона.

Было проанализировано 7 ооцитов, которые были донированы женщиной для научных целей с подписанием информированного согласия. При трансвагинальной пункции фолликулов получено 19 ооцитов, из которых 10 находились на стадии М II, 7 — М I, 2 — GV. Все полученные ооциты при их оценке на световом уровне (х100) после очищения от клеток кумулюса с помощью энзимной денудации (гиалуронидаза, Cook Medical, Дания) имели выраженную центральную гранулярность (рисунок 53, 54). Зрелые ооциты были криоконсервированы методом витрификации. Незрелые ооциты М I были зафиксированы в день аспирации и отправлены на ультраструктурное исследование.

Проведенное электронно-микроскопическое изучение ооцитов выявило цитоплазматических области деструктивные изменения компонент набухание ГЭР, гранулярности: кластеризация органелл, цистерн исчезновение митохондрий и их вакуолизацию. На рисунке 48 показана кортикальная область ооцита, в которой можно увидеть диффузно расположенные кортикальные гранулы (КГ). Так как клетка находилась на стадии профазы I первого мейотического деления, такое распределение допустимо. Зона пеллюцида нормальную гранул имеет плотную фибриллярную структуру и содержит немногочисленные цитомембраны (ЦМ), происходящие из окончаний фолликулярных клеток. Перивителиновое обычного строения, без присутствия дебрисных пространство Поверхность ооцита имеет небольшие микровиллии (МВ), их число снижено.

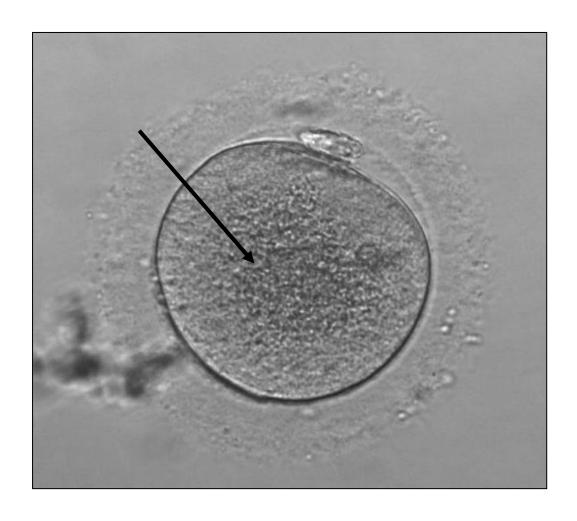


Рисунок 53. Микрофотография зрелого ооцита на стадии MII с центрально расположенной гранулярностью цитоплазмы (стрелки, ув.600)

В зрелом ооците оолемма ооцита за счет многочисленных микровиллий должна иметь большую площадь поверхности для обеспечения контакта с зоной пеллюцида, представленной микрофотографии на наблюдается. Несмотря на то, что анализируемые ооциты находились на стадии M I, на микрофотографии 55 видно четкое разделение цитоплазмы на две зоны: кортикальная область и зона просветленных ГЭР, которая на световом уровне представляет собой область гранулярности. В области, прилежащей к оолемме, не пораженной гранулярностью, видны комплексы ГЭР ГЭР+митохондрии, представляет собой выраженные лакуны. Распределенные по всей площади цитоплазмы большие и маленькие ГЭР везикулы окружены митохондриями. В области гранулярности

комплексы ГЭР+митохондрии имею набухший вид и окружены меньшим числом митохондрий.



Рисунок 54. Микрофотография зрелых ооцитов на стадии МІІ с центрально расположенной гранулярностью цитоплазмы (стрелки, ув.600)

Как известно, ГЭР – это единственная органелла с областью, которая имеет специализированные функции и проявления. С этой целью все элементы ГЭР связаны друг с другом, хотя на ультратонких срезах они кажутся отдельными органеллами. В области гранулярности видим их гипертрофию, набухание цистерн ГЭР. На микрофотографиях 56а и 566 показана внутренняя цитоплазма патологичного ооцита. Видна структура «непораженной» части цитоплазмы, сформированная большими гранулами гладкого эндоплазматического ретикулума (ГЭР, стрелка), связанными с митохондриями (М), и многочисленными небольшими гранулами ГЭР либо

связанными, либо нет с митохондриями (ув. х10600). На рисунке 49а высокое разрешение комплекса ГЭР+митохондрии с гранулярным содержимым внутри везикула гладкого эндоплазматического ретикулума. Так как ооцит MI, находился на стадии видно, что происходит постепенное цитоплазматическое созревание женской половой клетки. Именно в момент активации зрелого ооцита из комплексов ГЭР+митохондрии произойдет выброс ДЛЯ блока полиспермии. Именно поэтому кальция важно морфологически нормальное строение комплексов ГЭР+митохондрии. функционирующие митохондрии обеспечивают Непораженные, ЭТОТ энергозатратный процесс. Если митохондрии имеют просветленный матрикс, темные кристы, апоптозные тельца — при проникновении сперматозоида оплодотворение не произойдет. На микрофотографиях 57д-57н показаны на сверхвысоком разрешении (ув.30000) митохондрии из области выраженной гранулярности. Большинство митохондрий овальные, присутствуют митохондрии средней плотности с несколькими кристами. Однако в основном, органеллы представляют собой расплющенные структуры с матриксом. Мы предполагаем, затемненным что митохондрии функциональны. Однако данных В подтверждение такой гипотезы недостаточно. Также на ультраструктурном уровне на рисунке 50а-н были выявлены элементы экзоцитоза, причины и назначение которых выявлено нами не было. Наблюдаемые ультраструктурные деформации цитоплазмы ооцита в области гранулярности могут отражать деструктивные процессы, связанные с начавшимся апоптозом клетки.

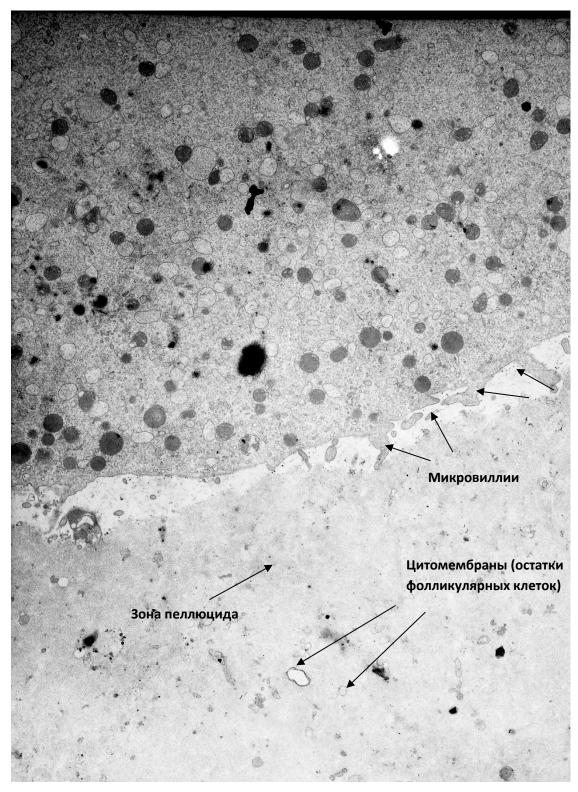


Рисунок 55. Электронно-микроскопическая микрофотография ооцита с центральной гранулярностью (объяснение в тексте)

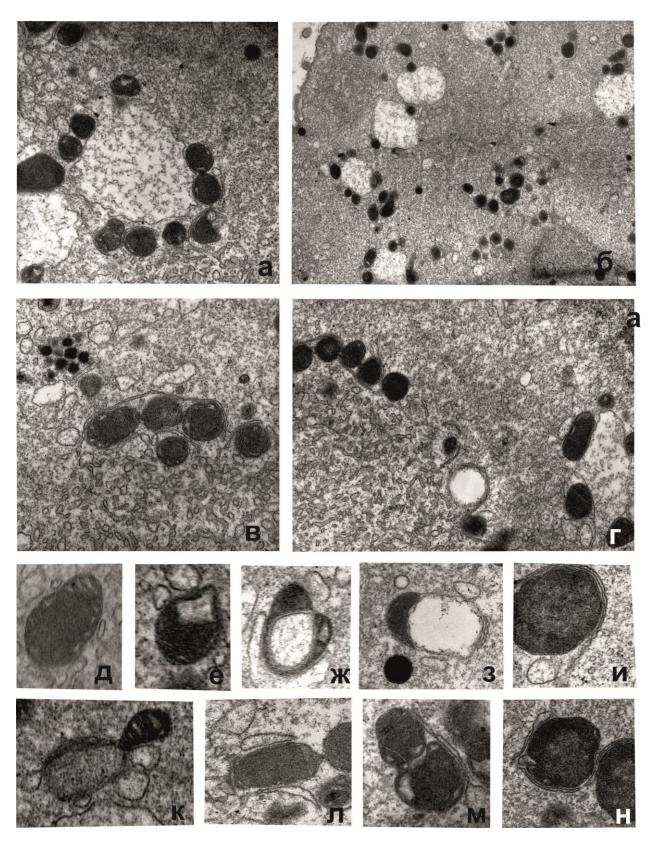


Рисунок 56. Электронно-микроскопическое исследование ооцитов с выявленной грубозернистой деструкцией цитоплазмы (объяснение в тексте)

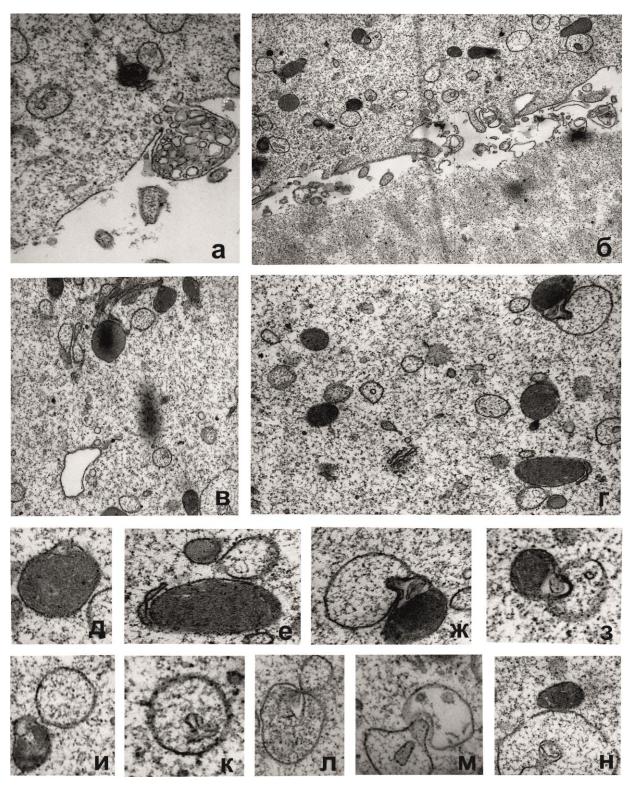


Рисунок 57. Электронно-микроскопическое исследование ооцитов в выявленной грубозернистой деструкцией цитоплазмы. Экзоцитоз (объяснение в тексте)

3.5. Изучение влияния морфологических особенностей ооцитов на процесс выхода эмбрионов из блестящей оболочки

Перед имплантацией внутри полости матки эмбриону человека необходимо освободиться от блестящей оболочки, чтобы осуществить непосредственный клеточный контакт с эпителием эндометрия. Хетчинг сопровождается частичным разрывом блестящей оболочки и последующим динамическим перемещением эмбриона в наружную среду. Процесс хетчинга у человека происходит на стадии бластоцисты приблизительно на 5-6 день после оплодотворения и занимает несколько часов. Только после выхода из зоны пеллюцида бластоциста способна осуществить имплантацию в эндометрий матки и продолжить свое развитие.

Для проведения исследования изучение влияния морфологических особенностей ооцитов и процессом выхода эмбрионов человека из блестящей оболочки было изучено 225 эмбрионов на стадии бластоцисты, донированных их родителями для научных исследований с подписанием информированного согласия. Эмбрионы были культивированы до 6 суток и проведена оценка наступления спонтанного хетчинга.

94 бластоцисты (41,7%) совершили спонтанный хетчинг и составили группу наблюдения, 131 бластоциста (59,3%), не совершившая спонтанный хетчинг, составили группу сравнения. Частота выхода эмбриона на стадии бластоцисты из блестящей оболочки, независимо от качества бластоцисты и качества ооцита, составила 41,7%.

Для оценки роли морфологических особенностей ооцитов в эффективности спонтанного хетчинга эмбрионов, была рассчитана доля ооцитов с цитоплазматическими и экстрацитоплазматическими аномалиями, из которых были получены включенные в исследование эмбрионы на стадии бластоцисты. Результаты показаны в таблице 17 и рисунке 13.

Таблица 17. Частота выхода эмбриона на стадии бластоцисты из блестящей оболочки в зависимости от морфологических особенностей ооцита

Морфологические особенности ооцитов	Хетчинг +	Хетчинг	Частота естественного хетчинга	p-
Морфологически нормальные ооциты	45	69	39,5%	
Цитоплазматические аномалии ооцитов	11	30	26,8%	НД
Экстрацитоплазматические аномалии ооцитов	24	16	60,0%	p<0,05
Сочетанные аномалии ооцитов	14	16	46,7%	НД

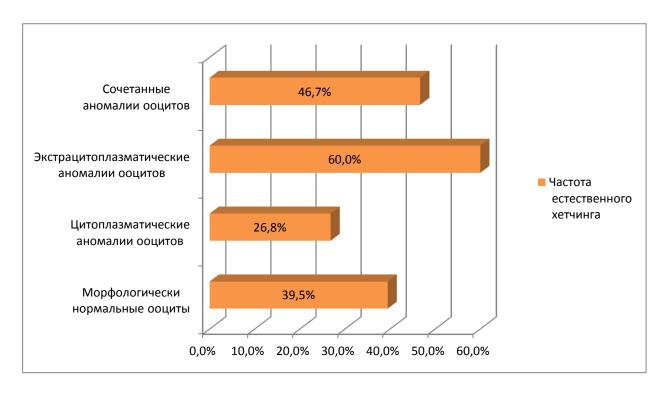


Рисунок 58. Частота спонтанного хетчинга эмбрионов, полученных из ооцитов с различными типами морфологических нарушений



Рисунок 59. Эмбрион человека на стадии бластоцисты, качество согласно классификации Гарднера 4AA, трофобласт (стрелка), эмбриобласт (пунктирная стрелка), ув.450

Большая часть ооцитов, из которых были получены эмбрионы, были Их составляло морфологически нормальные. количество 114. Доля 18,2% аномалий (n=41),цитоплазматических составила экстрацитоплазматических нарушений — 17,7% (n=40), сочетанных — 13,3% (n=30). Цитоплазматические нарушения и сочетанная патология ооцитов достоверно не оказывали влияния на процесс спонтанного хетчинга. Частота спонтанного хетчинга в этих группах была сравнима с морфологически нормальными клетками. При этом наличие экстрацитоплазматических нарушений увеличивало эффективность спонтанного хетчинга в 5,6 раз (ОШ=5,62; 95% ДИ=1,234; 0,256). Согласно полученным данным, нарушения экстрацитоплазматических структур способствует спонтанному хетчингу, однако это не соответствует показаниям для проведения вспомогательного хетчинга в клинической практике (надсечение оболочки эмбриона лазером или механическим способом или иногда полное ферментативное удаление блестящей оболочки), описанным в Приказе Минздрава России №107н от 30 августа 2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Одна из возможных причин неудач хетчинга, согласно данному документу, — патология блестящей оболочки.

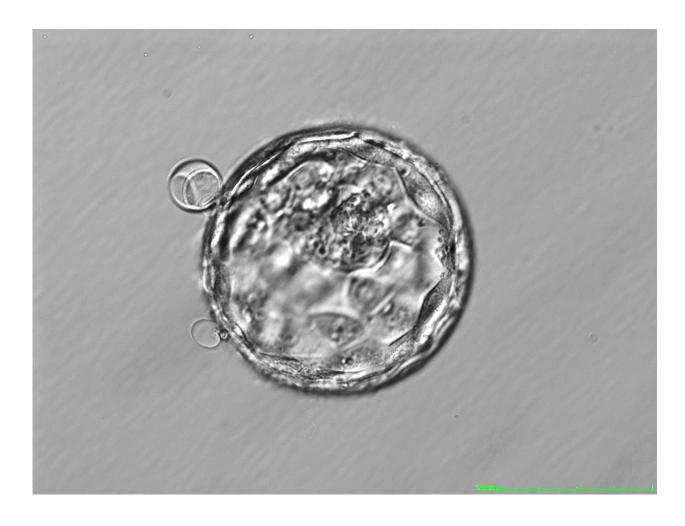


Рисунок 60. Эмбрион человека на стадии бластоцисты, качество согласно классификации Гарднера 4AA внутри блестящей оболочки, трофобласт (стрелка), трофэктодермальные отростки (пунктирная стрелка), ув.300

В настоящей работе из проанализированных эмбрионов была выделена группа эмбрионов на стадии бластоцисты с утолщением блестящей оболочки, дебрисом в перивителлиновом пространстве и увеличенным перивителлиновым пространством. Результаты по оценке спонтанного хетчинга показаны в таблице 18.



Рисунок 61. Эмбрион человека на стадии бластоцисты, качество согласно классификации Гарднера 4AA внутри блестящей оболочки, трофобласт (стрелка), трофэктодермальные отростки (пунктирная стрелка), ув.300

Доля бластоцист с утолщением блестящей оболочки составила 27,5% (n=16). Таким образом, состояние зоны пеллюцида не влияло на успех хетчинга, частота спонтанного хетчинга в эмбрионах с увеличенной

блестящей оболочкой составила 68,8%, что превысило таковой показатель у остальных групп.

Другая описанная в литературе возможная причина неудачи хетчинга – неспособность бластоцисты образовывать трофэктодермальные отростки.

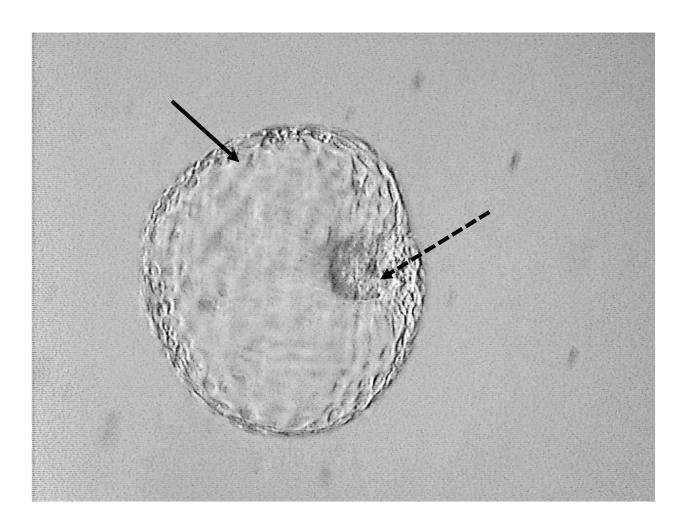


Рисунок 62. Эмбрион человека на стадии бластоцисты, качество согласно классификации Гарднера 6AA, совершившая спонтанный хетчинг из блестящей оболочки, трофобласт (стрелка), эмбриобласт (пунктирная стрелка), ув.250

Трофэктодермальные отростки бластоцисты человека были описаны [166] с использованием морфокинетического наблюдения как пальцеобразные цитоплазматические выросты трофэктодермы в 1996 году. Высказываются предположения об участии трофэктодермальных отростков в

передвижении и имплантации бластоцисты. Однако истинное значение данных образований остается невыясненным.

Оценить частоту образования трофэктодермальных отростков бластоцистами, совершившими хетчинг, в настоящем исследовании не представлялось возможным вследствие отсутствия методики time lapse. В группе морфокинетического анализа бластоцист, не совершивших хетчинг, частота образования трофэктодермальных отростков составила 31,2% (41 из 131 бластоцист), т.е. лишь треть таких бластоцист смогла образовать ТЭО.

Таблица 18. Частота спонтанного хетчинга эмбриона на стадии бластоцисты из блестящей оболочки в группе ооцитов с

экстрацитоплазматическими аномалиями.

Морфологические особенности ооцитов сравниваемых групп		Хет- чинг +	Хет- чинг -	Частота естественно го хетчинга	p *
	Дебрис в перивителлиновом пространстве	10	6	62,5%	нд
Экстрацитоплаз- матические аномалии ооцитов	Увеличенное перивителлиновое пространство	3	5	37,5%	НД
	Утолщение зоны пеллюцида	11	5	68,8%	p<0,05
Морфологически нормальные ооциты		45	69	39,5%	

^{*}Данные представлены как числа и %, χ^2 -тест;

Для оценки влияния качества клеток трофобласта и эмбриобласта было отобрано 83 бластоцисты разных классов. При оценке спонтанного хетчинга на 5-е сутки культивирования было выявлено, что качество бластоцист влияет на их способность к хетчингу: чем лучшего качества были бластоцисты, тем они чаще совершали спонтанный хетчинг (таблица 19).

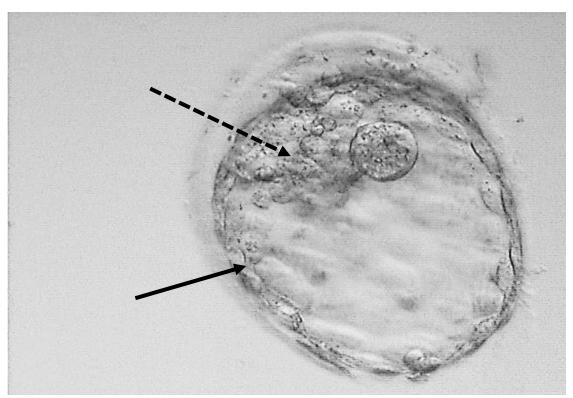


Рисунок 63. Эмбрион человека на стадии бластоцисты, качество согласно классификации Гарднера 5ВВ, совершающая выход из блестящей оболочки, трофобласт (стрелка), эмбриобласт (пунктирная стрелка), ув.300

Внутренняя клеточная масса эмбрионов человека на стадии бластоцисты категории А в равном числе случаев была выявлена в обеих группах. В то же время эмбриобласт категории В был обнаружен чаще в группе с отсутствием хетчинга по сравнению с группой Хетчинг+ (48,9% и 16,7% соответственно), а ВКМ категории С - больше в группе Хетчинг+ по сравнению с группой без хетчинга (55,5% и 21,3% соответственно) (p=0,0017).



Рисунок 64. Эмбрион человека на стадии бластоцисты, качество согласно классификации Гарднера ЗВС, ув.300

Таблица 19. Характеристики бластоцист с наличием и отсутствием спонтанного хетчинга

Показатели	Хетчинг+	Хетчинг-	p*
	(n=36)	(n=47)	
Качество	клеток внутренней кле	еточной массы*	
• A	10 (27,8%)	14 (29,8%)	
• B	6 (16,7%)	23 (48,9%)	p<0,001
• C	20 (55,5%)	10 (21,3%)	
ŀ	Сачество клеток трофоб	бласта*	
• A	17 (47,2%)	11 (23,4%)	
• B	15 (41,7%)	15 (31,9%)	p<0,01
• C	4 (11,1%)	21 (44,7%)	

^{*}Данные представлены как числа и %, χ^2 -тест; **Данные представлены как средние \pm стандартное отклонение, t-тест

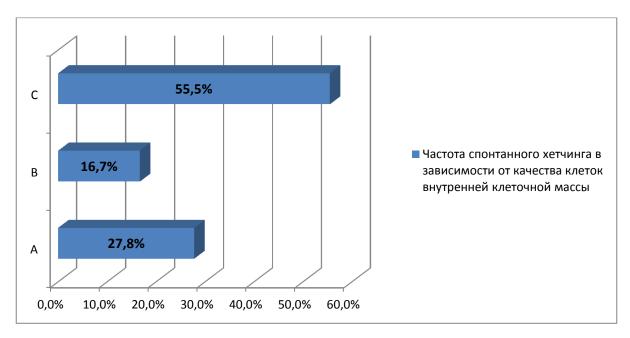


Рисунок 65. Частота спонтанного хетчинга эмбрионов с различным качеством клеток внутренней клеточной массы

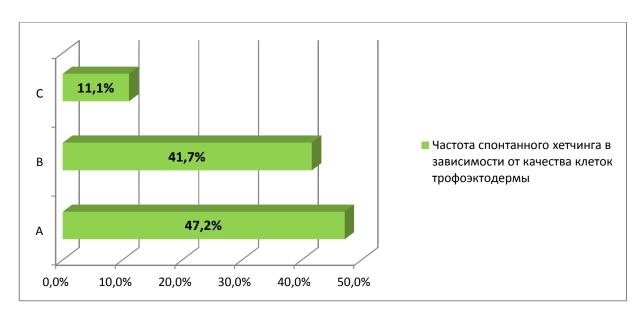


Рисунок 66. Частота спонтанного хетчинга эмбрионов с различным качеством клеток трофобласта

Трофэктодермальный слой (ТФЭ) в равном числе случаев был оценен на категории А, В или С. При этом ТФЭ категории А был выявлен у 47,2% бластоцист группы эмбрионов, совершивших спонтанный хетчинг, и лишь у 23,4% бластоцист без хетчинга, тогда как ТФЭ категории С был выявлен у

44,7% бластоцист этой группы и у 11,1% бластоцист в группе Хетчинг+ (p=0,0030).

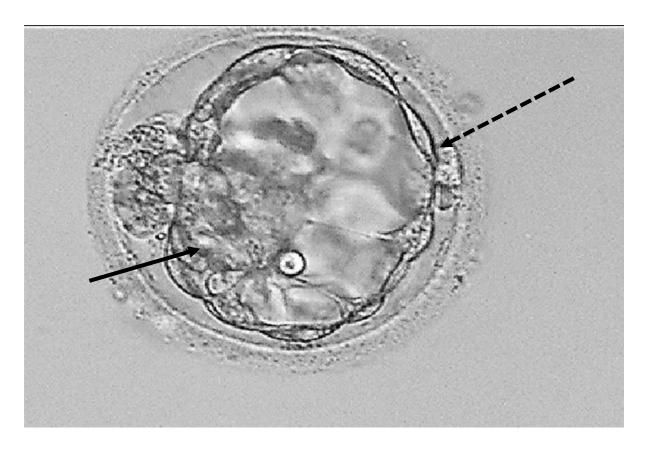


Рисунок 67. Эмбрион человека на стадии бластоцисты, качество согласно классификации Гарднера 3ВС, трофобласт (пунктирная стрелка), эмбриобласт (стрелка), ув.400

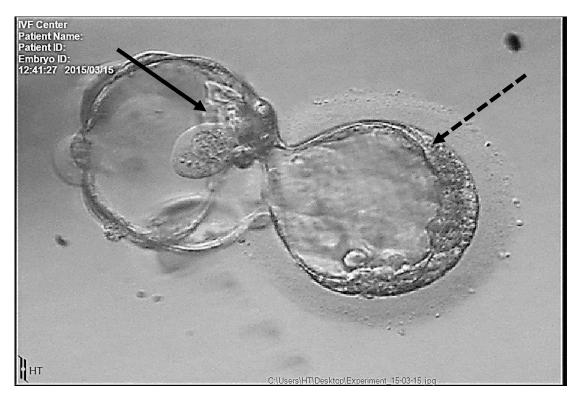


Рисунок 68. Эмбрион человека на стадии бластоцисты, совершающий хетчинг из блестящей оболочки, качество согласно классификации Гарднера 3BC, трофобласт (пунктирная стрелка), эмбриобласт (стрелка), ув.400

3.6. Изучение молекулярно-генетических маркеров разрыва блестящей оболочки и качества эмбрионов

Изучение молекулярно-генетических маркеров хетчинга эмбрионов человека на стадии бластоцисты было проведено на 83 образцах, донированных пациентами для научных целей. Эмбрионы были поделены на группу Хетчинг+ (хетчинг произошел) и группу Хетчинг - (эмбрион остался в блестящей оболочке). При анализе экспрессии мРНК генов, ответственных за эффективность спонтанного хетчинга, в сравниваемых группах было выявлено, что в группе бластоцист с эффективным хетчингом отмечалась более высокая экспрессия мРНК генов *CTSL2*, *GATA3* и *CGB* (Таблица 20, рисунок 69).

Таблица 20. Зависимость экспрессии эмбриональных генетических факторов и способности бластоцисты к выходу из блестящей оболочки

Гены	Группа	Группа	p*
	Хетчинг+ (n=36)	Хетчинг- (n=47)	
CTSL2	4,37 (4,02-4,88)	3,94 (3,64-4,23)	p<0,05
GATA3	4,65 (4,48-4,83)	4,50 (4,13-4,60)	p<0,05
CGB	2,12 (1,53-3,49)	1,27 (0,00-2,23)	p<0,05

^{*}Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

Степень зрелости эмбрионов, качество клеток эмбриобласта и качество трофобласта были связаны с экспрессией мРНК генов *CTSL2* и *GATA3*, которая была выше у эмбрионов 5 степени экспансии эмбрионов класса A (Таблица 21).

Таким образом, у бластоцист, совершивших спонтанный хетчинг, а также у бластоцист отличного качества отмечалась более высокая экспрессия мРНК генов *CTSL2* и *GATA3*. Экспрессия *CGB* была выше лишь у бластоцист, совершивших спонтанный хетчинг.

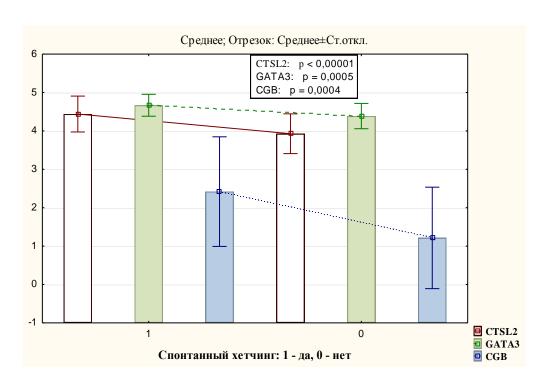


Рисунок 69. Уровень экспрессии CTSL2, GATA3 и CGB в бластоцистах человека в зависимости от эффективности спонтанного хетчинга

Таблица 21. Зависимость экспрессии эмбриональных генетических факторов от качества бластоцисты

Ta	<u>, </u>	G A FILA	CCD						
Качество	CTSL2	GATA3	CGB						
Степень экспансии бластоцисты									
5 степень (n=28)	4,36 (4,14-4,88)	4,65 (4,48-4,81)	2,01 (1,43-3,38)						
		, , , , , , , ,	, , , , , ,						
4 степень (n=45)	4,02 (3,75-4,32)	4,55 (4,36-4,63)	1,55 (0,00-2,86)						
			, , , , , ,						
2-3 степень (n=10)	3,65 (3,44-3,84)	4,24 (3,95-4,29)	0,00 (0,00-1,92)						
		1,-1 (0,20 1,-2)	0,00 (0,00 -,5 -)						
р-уровень*		<0,05							
F 7F		,							
Качест	во клеток внутрен	ней клеточной ма	ССР						
220 200 2	20 10101011 211J 1 P 011								
Класс A (n=24)	4,25 (4,02-4,48)	4,61 (4,55-4,77)	1,48 (0,00-2,94)						
	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	-, : = (=, = =, = :)						
Класс В (n=29)	3,94 (3,64-4,32)	4,54 (4,19-4,60)	1,38 (0,00-2,23)						
	(0,0:1,0=)	1,6 : (1,25 1,66)	1,00 (0,00 2,20)						
Класс C (n=30)	4,19 (3,85-4,58)	4,50 (4,26-4,75)	2,01 (1,36-3,37)						
	1,17 (5,05 1,50)	1,20 (1,20 1,70)	2,01 (1,50 5,57)						
р-уровень*	<0,05	<0,05	0,0918						
P JPODCIID	\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\	\0,03	0,0710						
	1								

Качество клеток трофэктодермы						
Класс A (n=28)	4,30 (4,19-4,88)	4,73 (4,58-4,88)	2,58 (1,20-3,55)			
Класс В (n=30)	4,05 (3,85-4,38)	4,55 (4,29-4,60)	1,63 (0,00-2,36)			
Класс C (n=25)	3,88 (3,63-4,17)	4,42 (4,13-4,60)	1,41 (0,00-2,23)			
р-уровень*	<0,05	<0,05	НД			

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, *тест Крускала-Уоллиса

3.7. Поиск связи между наличием блестящей оболочкой ооцита и имплантационным потенциалом бластоцисты

Как показали данные, полученные в настоящей работе, толщина блестящей оболочки не влияет на процесс выхода эмбриона из зоны пеллюцида в условиях *in vitro*. Однако принимая во внимание, что процесс хетчинга регулируется не только протеолитическими ферментами клеток трофобласта, но и факторами, выделяемыми внутри полости матки, было проведено изучение имплантационного потенциала бластоцист с полным удалением блестящей оболочки перед переносом в полость матки. Для этого в исследование были включены 116 эмбрионов на стадии бластоцисты, переносимые пациентам в полость матки (рисунок 70).

Перенесенные эмбрионы были разделены на следующие группы:

- Группа 1 бластоцисты, у которых было проведено рассечение блестящей оболочки (вспомогательный хетчинг);
 - ✓ Группа 1а бластоцисты, у которых было проведено частичное удаление зоны пеллюцида (лазерный хетчинг);
 - ✓ группа 1б бластоцисты, у которых было проведено полное удаление зоны пеллюцида (ферментативный хетчинг);
- группа 2 эмбрионы без хетчинга.



Рисунок 70. Бластоцисты человека, переносимые в полость матки. A- бластоциста в процессе спонтанного хетчинга, класс 3BB; B- бластоциста класса 4AA с выраженными трофэктодермальными отростками (стрелка), без хетчинга (ув.400)

Частота имплантации не различалась в группах сравнения и составила в группе 1 38,7% (81 случай): в подгруппе 1а — 34,9% (37 случаев), в подгруппе 1б — 42,7% (44 случая), в группе 2 — 35% (35 случаев) (р=0,5235 для сравнения групп 1 и 2, р=0,4133 для сравнения 3-х групп) (Таблица 22).

Клиническая беременность (регистрация сердцебиения эмбриона по данным УЗ) наступила у 74 (35,4%) пациенток группы 1: у 30 – в подгруппе 1а (28,3%), у 44 – в подгруппе 1б (42,7%), и у 27 женщин в группе 2 (27%) (р=0,1404 для сравнения групп 1 и 2, р=0,0286 для сравнения 3-х групп), т.е. наступила значимо чаще в группе эмбрионов с полным удалением зоны пеллюцида. ОШ имплантации в группе полного удаления зоны пеллюцида по сравнению с отсутствием хетчинга составило 1,9 (95% ДИ=1,01;3,6). ОШ частоты имплантации в группе ферментативного хетчинга по сравнению с проведением лазерного хетчинга также составило 1,9 (95% ДИ=1,02;3,5).

Таблица 22. Частота имплантации эмбрионов человека в полости матки в зависимости от типа проведенного вспомогательного хетчинга

V	Ізучаемая группа	Частота имплантации	p
Группа 1 –	группа 1а частичное удаление	34,9%	НД
бластоцисты, у	зоны пеллюцида (лазерный		
которых было	хетчинг) (n=37)		
проведено	группа 1б проведено полное	42,7%	НД
рассечение	удаление зоны пеллюцида		
блестящей	(ферментативный хетчинг)		
оболочки	(n=44)		
группа 2 – эмбри	оны без хетчинга (n=35)	35%	НД

Частота самопроизвольных прерываний беременностей была несколько выше у пациенток группы 16, хотя и не статистически значимо. Было диагностировано 20 потерь беременности в сроке до 22 недель гестации: 5 – в группе 1a (4,7%), 11 – в группе 1б (10,7%), 4 – в группе 2 (4%) (p=0,1022). В группе 1беременность закончилась родами у 58 (27,7%) пациенток: у 25 (23,6%) в подгруппе 1а и у 33 (32,0%) в подгруппе 1б. В группе 2 беременность закончилась родами у 23 (23%) пациенток (р=0,3742 для сравнения групп 1 и 2, р=0,2567 для сравнения 3-х групп). Всего родилось 89 детей: в группе 1 у 52 пациенток родилось по 1 ребенку, у 6 родились монозиготные двойни, в группе 2 у 23 пациенток родилось по 1 ребенку, у 2 родились двойни (р=0,6520). При сравнении 3-х групп было выявлено, что все двойни родились в группах 1a (n=6, 5,7%) и 2 (n=2, 2%). В группе 1б многоплодных беременностей зарегистрировано не было (р=0,0327). Таким образом, многоплодие при проведении лазерного хетчинга по сравнению с проведением ферментативного хетчинга наблюдалось в 5,7 раза чаще, а при отсутствии хетчинга по сравнению с проведением ферментативного хетчинга – в 2 раза чаще. Настоящие клинические исходы более подробно описаны в диссертации Ибрагимовой Э.О. (руководители д.м.н. Долгушина Н.В., к.б.н. Макарова Н.П.).

Как показало наше исследование, спонтанный хетчинг зависит от качества клеток трофэктодермы. Мы решили проверить, имплантационный потенциал бластоцист с качеством трофэктодермы класса В и ниже. Для этого отобрали 300 бластоцист, которые были перенесены в полость матки, следующих классов: степень экспансии 3 и выше, класс внутренней клеточной массы А, класс трофэктодермы — В и С, и разделили их на три группы: LAsH — частичное удаление зоны пеллюцида с помощью инфракрасного лазера; PAsH — полное снятие зоны пеллюцида и освобождение бластоцисты перед переносом в полость матки и группу контроля, в которой вспомогательный хетчинг не был осуществлен. И оценили частоту имплантации в этих группах. Результаты показаны в таблице 23.

Таблица 23. Частота имплантации эмбрионов на стадии бластоцисты с клетками трофэктодермы класса В и ниже с применением рассечения/удаления блестящей оболочки

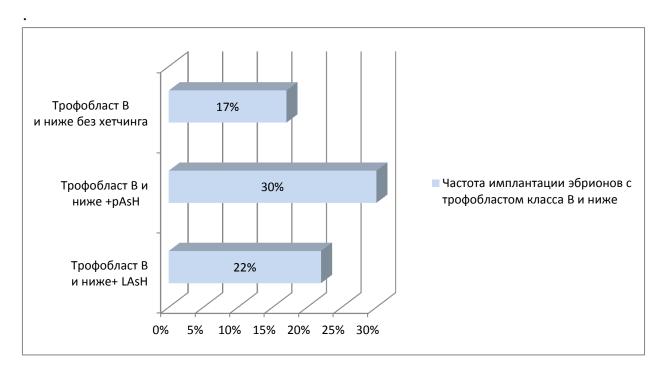
Группа	N	Число эмбрионов с имплантаци- ей в полости матки	Число эмбрионов без импланта- ции
Трофобласт класса В и ниже +частичное	100	22*	78
рассечение блестящей оболочки			
Трофобласт класса В и ниже +полное	100	30*	70
удаление блестящей оболочки			
Трофобласт класса В и ниже +блестящая	100	17	83
оболочка без изменений			

^{*}Данные представлены как числа и %, χ^2 -тест; p < 0.01

В группе без вспомогательного хетчинга имплантировались 17 бластоцист из 100 (17%), в группе с частичным рассечением блестящей

оболочки — 22 из 100 (p<0,01), в группе в полным удалением зоны пеллюцида — 30 (p<0,01). При анализе разницы между группами с разными видами вспомогательного хетчинга была обнаружена достоверная разница (p<0,047).

Рисунок 71. Частота имплантации эмбрионов с качеством трофобласта класса В и ниже в полости матки



Полное удаление зоны пеллюцида способствует имплантации эмбриона на стадии бластоцисты с качеством клеток трофобласта класса В и ниже в полости Можно говорить о том, матки. что даже малоклеточная трофэктодерма способна имплантироваться В эндометрий при непосредственном контакте клеток друг с другом.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Качество женской половой клетки влияет не только на оплодотворение, эмбриональное и фетальное развитие, но даже на течение заболеваний организма во взрослом состоянии [102]. Однако до сих пор не установлено, в чем именно выражается данное влияние, не выработано однозначное определение «компетентной» женской половой клетки. Особенно это касается ооцитов, полученных при стимуляции суперовуляции, когда оплодотворение происходит вне организма матери.

Применение метода экстракорпорального оплодотворения позволило проводить наблюдения за развитием эмбрионов человека от ооцита до стадии бластоцисты без зоны пеллюцида, соблюдая все этические нормы и правила. В настоящее время «компетентным» ооцитом считается клетка, способная к активации при проникновении сперматозоида, обеспечению дробления эмбриона и достижению им стадии бластоцисты. Активация собственного генома эмбриона человека происходит на третьи сутки после оплодотворения на 8-клеточной стадии: начинают работать более 4000 генов, которые обеспечивают дальнейшее дробление, компактизацию, формирование бластоцисты, имплантацию и все последующее развитие. Однако до этого момента важную роль играют накопленные в течение оогенеза продукты мРНК, субстраты, протеины, питательные соединения, которые аккумулируются в ооците.

Современная наука приходит к пониманию того, что именно от морфологического состояния ооцита зависит и процесс хетчинга, имплантации и прогрессирование беременности. Однако влияние каждой стадии морфологических изменений ооцита на его дальнейшее развитие до сих пор не изучено. Влияние патологических изменений женских половых клеток на эмбриологические характеристики, особенно в рамках клинических исходов программ экстракорпорального оплодотворения также остается пока непонятым.

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, позволяют сделать уверенный вывод, что морфологические изменения встречаются при стимуляции суперовуляции у человека достаточно часто. Из изученных 6134 ооцит-кумулюсных комплексов были морфологически нормальными только 28,7% женских половых клеток на стадии М II. Это означает, что только одна треть клеток окажется способной успешно развиваться до стадии бластоцисты и пройдет процесс выхода эмбриона из блестящей оболочки. У таких ооцитов светлая агранулярная цитоплазма без перивителлиновое прозрачной включений, пространство заполнено жидкостью без включений и дебриса, полярное тело округлое, прилегает к пеллюцида Остальные оолемме, структура 30НЫ не изменена. проанализированные (более 60%) имели ооциты различные виды морфологической патологии клеточных структур. Цитоплазматических 2 раза аномалий было выявлено В меньше ПО сравнению экстрацитоплазматическими (25,8% против 41,1%). Сочетанный фактор (аномалии как цитоплазмы, так и экстрацитоплазматических структур) выявляли в относительно небольшом проценте ооцитов — 4,5%. Среди морфологических изменений экстрацитоплазматических структур наиболее часто встречается дебрис в перивителлиновом пространстве (57,8%), меньше всего распространены у ооцитов человека нарушения структуры зоны пеллюцида. В 3,2% — деформация зоны, в приблизительно 1% случаев выявляли изменение толщины (истончение или утолщение) блестящей оболочки. Среди морфологических нарушений цитоплазмы самое частое явление (47,3%) — появление рефракторных телец внутри цитоплазмы.

Проведенный анализ частоты встречаемости морфологических нарушений женских половых клеток показал значительную неравномерность различных видов патологии. Отметим, что анализ частоты встречаемости различных видов нарушений ооцитов в популяции российских женщин проведен впервые, аналогов он не имел. Современные публикации по частоте встречаемости различных видов нарушений морфологии женских половых

клеток содержат данные только по определенным видам нарушений у европейских женщин [102, 307]. Результаты этих исследований не совпадают с результатами, полученными на популяции российских женщин.

После первичной морфологической оценки ооцитов, полученных в исследования, проанализировали эмбриологические ходе проведения нормального оплодотворения, морфологию характеристики (частоту полученных эмбрионов) в группах сравнения. По объективным данным, ооциты с цитоплазматическими типами нарушений имели значительно более низкую частоту оплодотворения и низкое качество полученных эмбрионов. Также в данной группе было больше всего эмбрионов, прекративших дробление на ранних этапах культивирования. Эти данные согласуются с результатами других исследований, согласно которым наличие различных цитоплазматических аномалий отрицательно коррелирует с частотой оплодотворения и качеством полученных эмбрионов [307].

предположить, что цитоплазматические Можно виды аномалий ооцитов косвенными признаками цитоплазматической являются неполноценности клетки, то есть асинхронизации созревания ядра и Низкая подготовки органелл клетки К оплодотворению. частота оплодотворения (78,9% против 94% в группе морфологически нормальных клеток) ооцитов с цитоплазматическими аномалиями может быть связана как с механическим смещением веретена деления и нарушением архитектоники цитоскелета, так и со структурными нарушениями органелл, приводящими к метаболическим нарушениям в клетке. Мы предполагаем, что ооциты с цитоплазматическими нарушениями имеют нарушенный потенциал к формированию полноценного эмбриона за счет метаболических нарушений на молекулярном уровне, которые невозможно диагностировать с помощью световой микроскопии. В пользу данного предположения говорят и результаты исследования L. Masala с коллегами (2018), которое было выполнено на животных моделях. В ходе этого исследования изучалась деградация материнских транскриптов после активации собственного генома эмбриона у морфологически несостоятельных ооцитов. Исследовали панель материнских генов (DPPA3, GDF9, NMP2, ZAR1), гены домашнего хозяйства (ACTB, RPL19, SDHA, YWHAZ, ATP1A1), гены метилирования ДНК (DNMT1, DNMT3A. DNMT3B), импринтинга (GF2R), геномного плюрипотентности (NANOG, POU5F1) и гены, регулирующие клеточный цикл (CCNB1, CDK1, MELK). Авторы показали уменьшение количества транскриптов у низкокомпетентных ооцитов, что изменяло «нормальный» ход дробления эмбриона. В этом случае транскриптов ооцита не хватает для развития эмбриона до момента включения собственного генома. Также авторы выявили прямую связь между возрастом животного и активностью изучаемых генов, то есть влияние возраста на развитие эмбриона (эффект импринтинга) [242].

При нормальном развитии к моменту включения собственного генома эмбрион должен быть «чист» от материнских мРНК и синтезировать свои, однако при низком качестве ооцита данное событие не происходит, что сказывается на дальнейшем дроблении эмбриона и ставит под вопрос его дальнейшее развитие. Исследователи пишут о задержке развития эмбриона по причине его «загрязненности» материнскими транскриптами [241]. Данная научная работа позволяет говорить о молекулярном статусе ооцита как о компетентности, дающей возможность развиваться в полноценный эмбрион. К сожалению, на эмбрионах человека выполнение аналогичного исследования не представляется возможным.

В группе ооцитов с цитоплазматическими видами нарушений их разделили по видам нарушений цитоплазмы. Анализ частоты оплодотворения показал, что минимальную частоту оплодотворения имели ооциты с агрегатами ГЭР в цитоплазме, максимальную — 92,2% — ооциты с рефрактерными тельцами, которая была близкой к частоте оплодотворения морфологически нормальных ооцитов. Как показал дальнейший анализ, ооциты с агрегатами ГЭР в цитоплазме имели худшие по качеству эмбрионы и, что самое важное, высокую частоту анеуплоидии хромосом.

Согласно данным электронной микроскопии, ооциты с агрегатами ГЭР имеют атипичное расположение клеточных органелл [370]. Исследователь показал, что область диска ГЭР представляет собой гипертрофированный ГЭР без митохондрий в форме трубочек, но не лакун. Митохондрии в таких ооцитах многочисленны, но морфологически аномальны (просветленный матрикс, вакуолизация). Также авторы показали, что веретено деления в ооцитах с таким видом нарушений дезорганизовано, имеет нетипичное внутри клетки [370]. Именно такими внутриклеточными положение нарушениями может быть обоснована низкая частота оплодотворения ооцитов. Важно отметить, появление агрегатов также что регистрируемых на световом уровне, невозможно зарегистрировать в ооцитах на стадии зародышевого пузырька. Диски ГЭР появляются только в ооцитах на стадии MII, то есть их появление связано с последними этапами мейоза, а при стимуляции суперовуляции с назначением препаратов для пика лютеинизирующего гормона.

Ооциты с экстрацитоплазматическими аномалиями имели сниженную оплодотворения (85,7%)ПО сравнению морфологически (94%).Относительно нормальными ооцитами влияния экстрацитоплазматических нарушений на частоту оплодотворения и качество эмбрионов в литературе нет единого мнения. Наши данные не согласуются с исследованиями Lasiene et al. (2009) и Ubaldi et al. (2008), в которых частота оплодотворения ооцитов с экстрацитоплазматическими видами аномалий была значительно ниже, чем в группе контроля [219, 366]. В исследовании Chamayou et al. (2006)при оплодотворении ооцитов экстрацитоплазматическими нарушениями были получены эмбрионы более низкого качества, чем в контрольной группе. При этом частота наступления беременности в обеих группа существенно не различалась [88].

Большинство исследователей придерживаются мнения, что экстрацитоплазматические аномалии строения являются только фенотипическими особенностями клеток и не нарушают их способность к

оплодотворению и дальнейшему развитию [66]. Наши данные также подтверждают это. Морфологические изменения экстрацитоплазматических структур не влияют на оплодотворение методом ИКСИ и развитие эмбрионов человека.

Результат по частоте аномального оплодотворения (появлению числа пронуклеусов отличного от двух) оказался достоверно выше в группе с аномалиями цитоплазматических структур. В настоящем исследовании частота аномального оплодотворения морфологически нормальных ооцитов составила 0,8%, а при нарушениях морфологии цитоплазмы — 6,5% (p<0,001). Это объясняется и работой по анализу транскриптов в ооцитах со сниженным качеством и данными, которые были получены нами по изучению количества мтДНК в ооцитах в различными видами морфологических изменений [242].

Митохондрии являются важными органеллами, участвующими в оплодотворении. Одним из самых первых ответов на повышение цитозольного содержания Са²⁺ является стимуляция энергетической функции митохондрий. Проникая через специфические каналы, Ca²⁺ вызывает активацию Са²⁺-чувствительных митохондриальных ферментов, а затем увеличение отношения NADH/NAD и производство ATФ. Кроме того, Ca²⁺зависимые митохондриальные ферменты могут быть активированы и непосредственно путем увеличения цитозольного Ca²⁺. В дополнение к энергии для активации ооцита и развития эмбриона, обеспечению митохондрии участвуют в регуляции внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} . За счет их активного поглощения и высвобождения Ca²⁺, митохондрии служат буфером для цитозольного уровня Ca^{2+} . Митохондрии, расположенные в непосредственной близости от ГЭР также могут облегчить повторное наполнение ГЭР-накопителей после высвобождения Ca²⁺, вызванного IP3.

Частота отсутствия оплодотворения в сравниваемых группах также оказалась различной. Достоверно ниже она была в группах с выявленными нарушениями морфологии как цитоплазмы, так и экстрацитоплазматических

структур. При выявлении цитоплазматических нарушений частота оплодотворения (отсутствие пронуклеусов и второго полярного тельца) составила 4.7% (p<0,01), при экстрацитоплазматичесих нарушениях — 6.6% (p<0,001) по сравнению с 2% в группе морфологически нормальных ооцитов.

Согласно данным электронной микроскопии, полученным при анализе ооцитов человека без пронуклеусов (отсутствие оплодотворения и активации клетки), внутри цитоплазмы обнаруживают дезорганизацию мейотического веретена деления и аномальную деконденсацию головки сперматозоида [142]. Высокую частоту отсутствия оплодотворения в ооцитах человека с экстрацитоплазматическими нарушениями можно объяснить деструкциями первого полярного тельца, затрагивающими веретено деления. Большой объем первого полярного тельца может быть причиной неправильного и неравномерного расхождения хромосом, а также «забором» слишком большого количества цитоплазмы, что оставшийся делает ООЦИТ некомпетентным. Аномалии перивителлинового пространства также часто сопряжены сего увеличением и, соответственно, с уменьшением объема самой женской половой клетки, что также делает ее некомпетентной для При нормального оплодотворения. цитоплазматических аномалиях отсутствие оплодотворения может быть вызвано именно нарушениями содержания материнских транскриптов, которые участвуют в замене протаминов сперматозоида на гистоны при активации ооцитов.

Дегенерация ооцитов после инъекции сперматозоида в ооцит достоверно выше в группе с цитоплазматическим нарушениями, что объясняется внутриклеточными деструктивными процессами в распределении органелл. Особенно это касается вакуолизации цитоплазмы, когда игла нарушает целостность внутрицитоплазматических структур и их содержимое попадает в саму цитоплазму.

Исследование ооцитов человека с центральной гранулярностью цитоплазмы, проведенное с помощью электронного микроскопа, показало, что гранулярность представляет собой крупную темную губчатую зернистую

область в цитоплазме, в которой нарушена организация органелл. Рост, созревание и оплодотворение ооцитов требуют правильной структуры и перемещения клеточных органелл. При цитоплазматическом нарушении в на микрофотографиях виде гранулярности визуализируется цитоплазмы на «здоровую» часть и «пораженную» гранулярностью. В неповрежденной части были обнаружены электронно-плотные кортикальные гранулы нормального строения, около оолеммы не увеличенное перивителлиновое пространство. Внутри перивителлинового пространства было обнаружено незначительное количество клеточного дебриса, извитые микровиллии, около оолеммы также находились просветленные кортикальные гранулы. В кортикальной области анализируемых ооцитов без гранулярности визуализировались комплексы ГЭР+митохондрии. Митохондрии имели электронно-плотный матрикс без просветлений, с электронно-плотными четкими кристами. В этих областях было равномерное распределение клеточных органелл, что соответствуют нормальному электронно-микроскопическому строению женской половой клетки человека.

В области гранулярности было обнаружено скопление цитоплазматических органелл, комплексы ГЭР гипертрофированы. митохондрий, окружающих ГЭР, просветленный матрикс, у некоторых митохондрий – вакуоли внутри крист. Часто можно было наблюдать комплексы ГЭР, окруженные небольшим числом митохондрий, что может говорит о недостаточном обеспечении ГЭР АТФ, невыполнением функций органелл в процессе активации ооцита после оплодотворения. Наши данные подтверждает работа Yolanda Segovia с коллегами [2017], в которой показаны внутриклеточные изменения на уровне организации органелл у женщин с эндометриозом и причины низкого качества эмбрионов [331].

Центрально выраженная гранулярность цитоплазмы, как показали данные, негативно влияет на частоту оплодотворения, качество полученных эмбрионов, а частота наступления клинической беременности у пациенток с

центральной гранулярностью цитоплазмы ооцитов не превышает 10% [126, 129, 219]. Большинство авторов объясняют низкую эффективность программ ВРТ у данной группы пациенток высокой распространенностью анеуплоидии в ооцитах с изучаемым типом аномалии [202, 370]. Тем не менее, не исключено наличие метаболических изменений в ооцитах с центральной гранулярностью цитоплазмы, которые могут оказывать как прямое негативное влияние на развитие эмбриона, так и нарушать формирование веретена деления, способствую возникновению анеуплоидии во время второго мейотического деления.

Проведенное электронно-микроскопическое исследование показало, что морфологические нарушения цитоплазмы ооцитов человека, выявляемые световом уровне, влекут за собой И нарушения организации внутриклеточных органелл, частности поражая комплексы В ГЭР+митохондрии. Данные структуры критически важны для процесса активации ооцита после проникновения сперматозоида в ооцит. ГЭР является главным компонентом хранения кальция, который участвует в активации клетки и запускает каскад реакций после оплодотворения. Предыдущие исследования у всех животных, в том числе у человека, показали, что ооциты должны пройти надлежащую кальциевую реакцию во время оплодотворения, чтобы оплодотворение и последующее развитие продолжались нормально [232].

Поскольку ГЭР является основным внутриклеточным хранилищем Ca^{2+} , он играет чрезвычайно важную роль во внутриклеточной передаче сигналов путем сдерживания и высвобождения кальция. Ооциты различных видов животных останавливаются на разных стадиях клеточного цикла, и, таким образом, сигнал Ca^{2+} , вызванный оплодотворением, принимает форму одного или нескольких переходных процессов в зависимости от вида. Например, у медуз, морского ежа и Хепориз наблюдается одна волна Ca^{2+} при оплодотворении. Напротив, у аннелид, асцидий и млекопитающих можно обнаружить несколько переходных периодов Ca^{2+} [346].

Независимо от вида животного, сигналы Ca²⁺ возникают из-за высвобождения Ca^{2+} из ГЭР или Ca^{2+} -притока из внеклеточной среды. Высвобождение Са²⁺ из ГЭР опосредуется либо через рецептор инозитол 1,4,5-трифосфата (IP3), либо через рианодиновый рецептор, оба из которых являются лиганд-зависимыми ионными каналами, которые локализуются на Недавнее ГЭР [232]. мембране исследование показало, что фосфорилирование рецептора ІРЗ увеличивает его чувствительность, что высвобождение Са²⁺ в вызывает цитоплазму, временно увеличивая концентрацию Са²⁺ во время созревания ооцитов мыши [384]. IP3-рецептор участвует в инициации и поддержании пиков Ca2+ при оплодотворении и у человека [234, 389].

Однако поддержание пиков Ca²⁺ в ооцитах млекопитающих также требует притока Ca²⁺ из внеклеточной среды. В 2016 г. была проведена исследовательская работа на ооцитах мышей, убедительно доказавшая присутствие кальция не только в ГЭР, но и в митохондриях и цитоскелете [364]. Выход кальция при активации гамет происходит как из ГЭР, так и из митохондрий. Именно так происходит процесс активации гамет при оплодотворении и именно от этих органелл зависит последующее развитие зиготы и эмбриона. Однако регулирование каналов Ca²⁺, участвующих в процессе его осцилляций, недостаточно изучено в ооцитах человека. Известно, что STIM1 представляет собой единственный трансмембранный белок с Ca²⁺ чувствительным доменом, расположенным в просвете ГЭР. Он воспринимает незаметные изменения концентрации Ca^{2+} , запасенного в просвете ГЭР. При опустошении ГЭР STIM1 объединяет и активирует серию кальциевых каналов В плазматической мембране [393]. исследование показало, что существует повышенная регуляция экспрессии STIM1 в момент формирования пронуклеусов, и что эта экспрессия остается на том же уровне на последующих стадиях активации зигот [166, 212]. Их STIM1 результаты показывают, ЧТО необходим ДЛЯ нормального

оплодотворения ооцитов, поскольку он участвует в поддержании долговременного повторяющегося сигнала Ca²⁺ [166].

Качество эмбрионов человека, оцениваемое согласно принятым морфологическим критериям, также оказалось достоверно хуже в группе ооцитов морфологическими нарушениями. В группе ооцитов цитоплазматическими видами нарушений по сравнению с контрольной была ниже появления эмбрионов класса А (52,6% 65,7%, частота соответственно) и выше частота эмбрионов класса С (11,5% и 5,2%, соответственно). Морфологическая оценка эмбрионов на ранних стадиях преимплантационного развития человека важна для дальнейшего прогноза имплантации. Эмбрионы класса D представляют собой эмбрионы неудовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов более 50% и остановку дробления. В группе ооцитов с цитоплазматическими нарушениями таких эмбрионов выявлено в 2,7 раза больше (1,8% против 4,7%). Частота остановки дробления в группе экстрацитоплазматических аномалий сопоставима с группой морфологически нормальных женских половых клеток (1,8% против 1,0%).

Необходимо отметить, что высокая частота остановки развития эмбрионов человека в условиях *in vitro* представляет собой одну из особенностей данного способа ВРТ, которая, как полагают, обусловлена неоптимальными условиями при культивировании и какими-либо дефектами в самом эмбрионе. Когда немногочисленные эмбрионы, полученные в цикле ЭКО, достигают стадии развития бластоцисты, многие из них оказываются неспособными развиваться уже после переноса в полость матки. Частота имплантации эмбрионов человека в программах ЭКО не превышает 35-40% (в зависимости от анамнеза пациентов). Причины столь высокого уровня остановки развития эмбрионов остаются неясными, но можно предположить, срабатывает некий что таким образом защитный механизм ДЛЯ предотвращения дальнейшего развития аномальных некачественных эмбрионов. У очень многих женщин наблюдают по крайней мере один

замерший эмбрион за цикл лечения, что говорит о достаточной распространенности такого явления у человека [215].

Наиболее частой причиной остановки человеческих эмбрионов в генетические дефекты, a неспособность развитии являются также собственного генома эмбриона к активации и дефекты митохондриального аппарата. Именно поэтому в настоящей работе были проанализирована частота анеуплоидии эмбрионов, полученных из ооцитов с различными видами нарушений. Была выявлена взаимосвязь между нарушениями морфологии женских половых клеток и генетическими аномалиями эмбрионов, полученных в программах экстракорпорального оплодотворения. Известно, что анеуплоидии половых клеток ограничивают не только саму фертильность человека, но и возможность терапии бесплодия методами ВРТ, особенно у пар старшего репродуктивного возраста. Анеуплоидии в ооцитах могут возникать на различных этапах оогенеза, и на развитие хромосомных нарушений в гаметах могут потенциально влиять различные факторы, большая часть из которых являются немодифицируемыми.

В группе ооцитов с цитоплазматическими нарушениями было получено значительно больше эмбрионов с анеуплоидиями (68,4%), чем в группе морфологически нормальных ооцитов (31,3%), а шанс получения эмбрионов с анеуплоидиями был в 3,6 раза выше при наличии цитоплазматических нарушений. Полученные данные согласуются с исследованием А.G. Schmultzer et al., в котором наблюдали повышение анеуплоидии в ооцитах с патологией цитоплазмы по данным биопсии полярного тельца, и с исследованием S. Kahraman et al., в котором эмбрионы, полученные при оплодотворении ооцитов с центральной гранулярности, имели более [202,327]. высокую частоту анеуплоидии В группе ооцитов экстрацитоплазматическими нарушениями также наблюдали более высокую частоту появления эмбрионов с анеуплоидиями (38,9%), а при наличии экстрацитоплазматических аномалий шанс получения эмбрионов анеуплоидиями был выше в 1,3 раза. В исследовании A.G. Schmultzer et al.

также наблюдали повышений уровень анеуплоидии в ооцитах с патологией экстрацитоплазматических структур [327].

Внутри группы ооцитов с цитоплазматическими нарушениями наибольшую частоту анеуплоидии эмбрионов несли ооциты с центрально выраженной гранулярностью и агрегатами ГЭР (69,4% и 65,2% соответственно).

Из экстрацитоплазматическими ооцитов аномалиями частота анеуплоидных эмбрионов составила 31,0%, что не отличается от такового морфологически нормальных (31,3%).показателя группы ооцитов Идентификация анеуплоидных эмбрионов остается сложной задачей из-за высокого уровня мозаичности, атипичного деления клеток, фрагментации субхромосомной нестабильности микро/мультиядерности клеток, И эмбрионов человека. Более того, некоторые из этих процессов происходят и в in vivo условиях после зачатия, поэтому предполагается, что это не специфическое следствие условий культивирования [108].

Учитывая сложность мейоза во время оогенеза по сравнению со сперматогенезом, неудивительно, что большинство мейотических ошибок имеют материнское происхождение. До 70% мейотических анеуплоидий «наследуется» от ооцита, в зависимости от того, какая хромосома (ы) была поражена [176]. Частота анеуплоидии человека также увеличивается с возрастом матерей [264]. Однако мозаичные анеуплоидии, которые происходят не в мейозе, а в митозе, как правило, не коррелируют с возрастом матери, за исключением случаев нерасхождения в митозе [108].

Имеются данные, подтверждающие то, что кроме потенциального наследования аберрантной материнской РНК и белков, вредные мутации в генах матери, связанные с мейозом или митозом, и/или их регуляторами также могут приводить к аномальной сегрегации хромосом и делению клеток. Недавно R.C. МсСоу и его коллеги (2015) обнаружили генетический вариант киназы PLK4, ген, который, как известно, вызывает анеуплоидию при нарушении центросом; этот вариант чаще обнаруживался у женщин, от

которых поучались анеуплоидные эмбрионы исключительно из-за митотических ошибок [245]. Наконец, накопление мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) матери в течение нескольких лет между оогенезом плода и возобновлением мейоза может также приводить к дефектам митохондрий и анеуплоидиям.

Таким образом, ооциты с морфологическими аномалиями, в первую очередь с цитоплазматическими, составляют группу риска по развитию эмбрионов с анеуплоидиями. Основываясь на полученных нами данных, целесообразно рекомендовать пациенткам с морфологическими аномалиями ооцитов дополнительное медико-генетическое консультирование для решения вопроса о необходимости проведения молекулярно-генетического анализа эмбрионов. Применение генетического скрининга эмбрионов у данной категории пациенток способно не только повысить эффективность программ ЭКО, но и снизить риск рождения детей с врожденной генетической патологией.

Оплодотворение ооцита, дробление эмбриона до стадии бластоцисты, хетчинг и последующая имплантация являются энергозависимыми процессами, а значит, на любом из этапов нарушения функции митохондрий, единственным источником которых является зрелый ооцит, приведут к отсутствию оплодотворения, остановке развития эмбриона или отсутствию имплантации. Именно поэтому в настоящей работе была предпринята попытка количественно оценить содержание мтДНК в ооцитах с различными видами морфологических нарушений.

Данные, полученные настоящей работе, В показывают, что морфологические изменения женских половых клеток связаны с числом мтДНК в цитоплазме. Ооциты с цитоплазматическими видами аномалий содержали меньшее число копий мтДНК, чем ооциты c экстрацитоплазматическими нарушениями или морфологически нормальные клетки. Распределение числа копий мтДНК ооцитов находилось в очень широком диапазоне от 5'440 до 9'800'000 копий для зрелых клеток на стадии

МІІ. Медиана распределения составляла 2'000'000 с интерквартильным размахом от 813'000 до 3'300'000 копий по всем изученным ооцитам.

В группе цитоплазматических аномалий медиана мтДНК с интерквартильным размахом составила 1'300'000 (263'500 - 2'325'000) копий, в группе экстрацитоплазматических аномалий — 2'000'000 (1'350'000 - 4'150'000) копий, в группе морфологически нормальных — 2'500'000 (1'400'000 - 4'000'000) копий (p<0,0001).

Число копий мтДНК в ооцитах с экстрацитоплазматическими видами нарушений значительно выше, чем ооцитах с цитоплазматическими аномалиями, и не отличалось от морфологически нормальных клеток. Между различными типами экстрацитоплазматических аномалий также не было выявлено существенных различий в копийности мтДНК. Негативное влияние данных видов нарушений на развитие эмбрионов, частоту наступления беременности и живорождений является спорным [311, 358]. придерживаемся мнения, что экстрацитоплазматические типы нарушений являются специфической реакцией на экзогенную стимуляцию функции яичников, их наличие не нарушает способность клетки к оплодотворению и развитию эмбриона, способного к имплантации. Полученные данные свидетельствуют о том, что количество митохондрий в ооцитах с экстрацитоплазматическими аномалиями не снижалось, но тем не менее, мы не может достоверно утверждать, что подобные клетки метаболически полноценны.

Минимальное число копий мтДНК выявили в ооцитах человека с аномальными агрегатами ГЭР. Данный вид морфологических нарушений крайне негативно влияет на процесс оплодотворения, дробления и развитие эмбриона до стадии бластоцисты, что было показано на предыдущих этапах исследования.

Максимальное число копий мтДНК, практически не отличающееся от морфологически нормальных ооцитов, определялось в ооцитах с рефрактерными тельцами в цитоплазме. Рефрактерные тельца состоят из

смеси липидов и липофусцина. Наличие рефрактерных телец в цитоплазме ооцитов не оказывает негативного влияния на эмбриологические характеристики и клинические исходы программ ВРТ, а их появление рассматривается как результат адаптации клетки к неблагоприятным условиям окружающей среды [281]. Мы придерживаемся мнения, что появление данного типа аномалий ооцитов не связано с проявлением патологического процесса в клетке, и метаболический потенциал клеток с рефрактерными тельцами не нарушен.

Согласно полученным данным, наличие или отсутствие, а также тип выявленных морфологический нарушений зависели от числа копий мтДНК в изучаемых клетках. В настоящий момент неясно, вызваны ли нарушения цитоплазмы (например в виде грубозернистой деструкции), снижением копий мтДНК, или это обратный процесс, а первична морфологическая аномалия, которая вызывает дезорганизацию внутриклеточных структур (митохондрий) и тем самым приводит к снижению числа копий мтДНК. Мы считаем, что при созревании патологические изменения цитоплазматической организации женских половых клеток приводят к дегенерации комплексов «ГЭР+митохондрии», тем самым снижая суммарно число копий мтДНК.

Снижение числа копий мтДНК в ооцитах человека с экстрацитоплазматическими аномалиями по сравнению с морфологически нормальными было выявлено незначительное и могло быть обусловлено, например, особенностями стимуляции суперовуляции в процессе роста.

Как показали исследования с помощью электронной микроскопии, распределение и организация митохондрий являются динамическими процессами во время созревания ооцитов, и эти изменения могут быть функцией митохондрий. Основная функция митохондрий связаны с заключается в обеспечении АТФ. АТФ чрезвычайно важен для ядерных и цитоплазматических событий созревания. Формирование веретена движение хромосом зависят от экспрессии и активности моторных белков, которые используют АТФ в качестве источника энергии. Предыдущие

исследования показали, что увеличение концентрации АТФ необходимо для созревания ооцитов как крупного рогатого скота, так и человека [123]. Ооциты с более высокой концентрацией АТФ имеют значительно более высокие показатели для оплодотворения и формирования бластоцисты [263]. Более низкие концентрации АТФ в ооцитах, по меньшей мере, частично ответственны за снижение уровня нормального формирования веретена в ооцитах млекопитающих. Снижение содержания АТФ путем лечения карбонил цианид р-трифторметоксифенилгидразоном, ингибитором окислительного фосфорилирования, приводит к уменьшению процента ооцитов мышей с ядерным созреванием, нормальным образованием веретена и выстраиванием хромосом, равномерным распределением митохондрий и способностью формировать бластоцисты [159—160].

Что касается ооцитов человека, количество митохондрий, TO присутствующих в цитоплазме женских половых клеток, варьирует в зависимости от стадии развития клетки. Во время стадии миграции первичных половых клеток число митохондрий составляет приблизительно 10, увеличиваясь до 200 на стадии стволового оогония. Первичные ооциты содержат приблизительно 6000 митохондрий, и это число увеличивается до более чем 100 000 копий митохондриальной ДНК во время созревания ооцитов с одной или двумя копиями мтДНК на органеллу [143]. Однако функциональное значение столь большого количества копий мтДНК в ооцитах Согласно предыдущим исследованиям, остается неясным. существует два возможных объяснения большого количества копий мтДНК. Во-первых, было высказано предположение, что увеличение митохондрий и мтДНК время оогенеза является генетическим механизмом, обеспечивающим достаточное количество органелл и геномов в клетках до их имплантации, поскольку репликация мтДНК не происходит на стадиях дробления в эмбриогенезе млекопитающих [339]. Для изучения влияния количества копий мтДНК на фертильность T. Wai et al. (2010) проводил генетические модификации числа копий мтДНК на модели мыши путем

удаления одной копии гена Tfam, необходимого компонента митохондриального нуклеотида, на разных стадиях развития зародышевой линии. Ученые обнаружили, что зрелый ооцит, который имеет менее 4000 копий мтДНК, все еще может быть оплодотворен и обычно развивается до стадии бластоцисты, но наблюдается резкое сокращение эмбриональной жизнеспособности после имплантации у эмбрионов с низким количеством копий мтДНК (<50 000 копий мтДНК) [383]. Ингибирование репликации мтДНК с помощью 20,30-дидезоксицитидина, нуклеозидного аналога, который может ингибировать репликацию мтДНК, не показывает влияния созревание ооцитов мыши и распределение заметного на Однако 20,30-дидезоксицитидин митохондрий. значительно снижает образование бластоцист [159]. Кроме того, на модели свиньи добавление нейрегулина 1 стимулирует репликацию митохондрий, увеличивает количество копий мтДНК в ооцитах М II по сравнению с ооцитами на стадии зародышевого пузырька и увеличивает процент образования эмбрионов на стадии бластоцисты, полученных путем оплодотворения in vitro [238]. Эти данные свидетельствуют о том, что количество копий мтДНК в основном влияет на потенциал эмбрионального развития, но не на созревание ооцитов. Вторая теория числа мтДНК заключается в том, что большое количество мтДНК может уменьшить накопление мутаций в мтДНК [106], которая представляет собой небольшой геном, унаследованный от матери. Варианты сегрегируются уже в начале митотического деления предшественников зародышевых клеток и затем быстро передаются будущим поколениям. Анализ распределения патогенных мутаций мтДНК у потомства от матерейносителей у мышей показывает, что шансы наследования патогенной мутации увеличиваются в зависимости от доли этих мутаций у матери, но нет сильного отбора против этого типа мутации [106]. На основе этой концепции было выдвинуто предположение, что большое количество мтДНК пропорционально уменьшает количество вариантов мтДНК у матери, тем

самым эффективно уменьшая вероятность того, что потомство наследует патогенную мутацию.

Мы также провели анализ факторов, способных влиять на число копий мтДНК в исследуемых препаратах. Вклад мтДНК сперматозоида не может, по нашему мнению, оказывать существенного влияния на содержание мтДНК в ооцитах: во-первых, потому что мтДНК подвергается деградации после оплодотворения (даже при использовании метода ИКСИ), а во-вторых, сперматозоид человека содержит всего одну спиральную митохондрию, в то время как число мтДНК в одном сперматозоиде составляет около 100 копий [301]. Для предотвращения попадания клеток кумулюса в исследуемый препарат были отобраны неоплодотворившиеся ооциты только после механического и энзимного очищения ооцита перед проведением ИКСИ, а также осуществлен дополнительный контроль в процессе отмывания ооцита перед переносом в стерильную пробирку.

Снижение числа копий мтДНК в ооцитах уменьшает функциональные возможности не только самой клетки, но и эмбриона на ранних этапах его развития как *in vitro*, так и *in vivo*. Вероятно, эмбрионы, полученные при оплодотворении ооцитов с низким числом копий мтДНК, будут иметь низкий потенциал для продукции энергии на том этапе, когда происходит активное дробление, а собственные митохондрии эмбриона еще не синтезируются. Это подтверждают результаты, полученные на предыдущих этапах настоящего исследования, когда и частота оплодотворения, и частота формирования эмбрионов морфологически хорошего качества снижены в группе ооцитов с цитоплазматическими нарушениями. Снижение функциональной активности митохондрий в ооцитах с нарушениями цитоплазмы может приводить, вопервых, нарушению структуры цитоскелета (a следовательно, возникновению аномальных агрегатов ГЭР, аномальному дроблению), и вовторых, к дефектам формирования веретена деления, повышая вероятность возникновения анеуплоидии в процессе мейотического деления. Данный

механизм может лежать в основе низкой частоты имплантации эмбрионов, полученных из ооцитов с цитоплазматическими видами аномалий.

Потенциальными патогенетическими механизмами отрицательного влияния морфологических нарушений на дальнейшее развитие эмбриона на каждом этапе могут быть генетические и/или метаболические нарушения в ооцитах, маркерами которых и являются выявляемые на световом уровне изменения. Данные об особенностях эмбриологического этапа программы ЭКО, описанные выше, показали: мейотически зрелые женские половые клетки могут иметь изменения как цитоплазмы, так и экстрацитоплазматических структур, наблюдаемые при световой микроскопии. Эти изменения имеют значение для оплодотворения и дальнейшего дробления эмбриона. Однако в настоящее время нет данных о влиянии различных морфологических изменений экстра- и цитоплазматических структур ооцита на процесс хетчинга.

В условиях *in vitro* хетчинг происходит на 5-6-й день развития путем разрыва оболочки и выхода бластоцисты через образовавшуюся щель. Разрыв оболочки связан с двумя факторами: 1) клетки трофэктодермы выделяют протеолитический фермент катепсин, растворяющий участок зоны пеллюцида, 2) бластоциста увеличивается в размерах и механически разрывает зону пеллюцида. Однако ряд фактов указывает на то, что в условиях *in vivo* могут действовать дополнительные факторы, приводящие к растворению блестящей оболочки, что способствует более быстрому и эффективному хетчингу и имплантации. Следует отметить, что процессы и лежащие в основе имплантации эмбриона механизмы, человека, до настоящего времени остаются загадкой, несмотря на все попытки исследователей понять этот сложный процесс. Усилия ученых направлены как на познание особенностей клеток эмбриона на стадии бластоцисты (клетки трофобласта), так и на уникальный временной промежуток внутри матки (клеток эндометрия), называемый «окном имплантации». Время, когда клетки эндометрия обладают максимальной рецептивностью к клеткам трофобласта, ограничено 4 днями. Именно тогда происходит синергия действий эндометрия и бластоцисты и наступает успешная имплантация. Как показала практика культивирования эмбрионов человека в условиях in vitro, далеко не все бластоцисты способны осуществить хетчинг, даже если зона пеллюцида надорвана. Эмбрион человека на стадии бластоцисты затрачивает определенное время (от нескольких часов до суток), чтобы выбраться из надорванной оболочки. Длительный или неудачный хетчинг может быть фактором, снижающим частоту имплантации программах оплодотворения. Эмбрион стадии экстракорпорального человека на бластоцисты в процессе выхода из блестящей оболочки может частично повредить слой внутренней клеточной массы, что приведет к появлению монозиготных близнецов. Именно поэтому следует больше проводить исследований, касающихся выполнения метода вспомогательного хетчинга.

Согласно уже имеющимся данным, эмбрионы человека на стадии бластоцисты, полученные экстрацитоплазматически ИЗ ооцитов аномалиями, самостоятельно освобождаются из блестящей оболочки в 5,6 раза чаще (ОШ=5,62; 95% ДИ=1,234; 0,256) по сравнению с эмбрионами, полученными из ооцитов с цитоплазматическими аномалиями. Частота спонтанного хетчинга эмбрионов человека, полученных из ооцитов с цитоплазматическими нарушениями, составила 26,8%, группе 60,0%. экстрацитоплазматических нарушений Частота выхода естественного «вылупления» эмбриона в группе с цитоплазматическими была нарушениями достоверно ниже ПО сравнению группой морфологически нормальных женских половых клеток (р=0,025). В группу экстрацитоплазматических аномалий ооцитов входили женские половые клетки в том числе с нарушением зоны пеллюцида. Можно предполагать, что высокая частота спонтанного хетчинга может быть связана с нарушением структуры блестящей оболочки, что способствовала ее разрыву при влиянии клеток трофобласта. Данные по группе сочетанной патологии ооцитов (и

цитоплазматические, и экстрацитоплазматические) по самостоятельному освобождению эмбриона от блестящей оболочки также оказались выше группы морфологически нормальных ооцитов (46,7% против 39,5%). Для поиска связи между толщиной блестящей оболочки и частотой спонтанного хетчинга эмбрионов человека на стадии бластоцисты в группе ооцитов с экстрацитоплазматическими была аномалиями выделена структура патологии: дебрис перивителлиновом пространстве, увеличенное перивителлиновое пространство и утолщение зоны пеллюцида. Результаты показали, что толщина блестящей оболочки не влияет на процесс спонтанного хетчинга. Частота освобождения эмбриона из зоны составила в этой группе 68,8% (р=0,027), что достоверно выше групп ооцитов с другими патологиями, в том числе группы эмбрионов человека на стадии бластоцисты, полученных из морфологически нормальных ооцитов (39,5%).

Эти данные указывают на то, что на процесс хетчинга влияет не толщина блестящей оболочки ооцита, а его структура. Зона пеллюцида у человека имеет сложную трехмерную гликопротеиновую структуру, выполняющую важные функции в процессе оплодотворения. Четыре гликопротеина (ZP1-ZP4), обнаруженные в блестящей оболочке ооцитов человека, генетически детерминированы. Их молекулярная характеристика показала, что ген ZP1 расположен на хромосоме 11 и кодирует полипептид из 638 аминокислот [156]. Ген ZP2 локализован на хромосоме 16 и кодирует полипептид из 745 аминокислот, а ген ZP3 — на хромосоме 7 и кодирует 424 аминокислот [172]. ИЗ Кроме того, показано, полиморфизм гена ZP3 (наличие дополнительного G в экзоне 8) кодирует нефункциональный (или пока неизвестный) полипептид из 372 аминокислот.

Также у человека ген POMZP3 кодирует протеин ядерных пор [172]. Ген ZP4 локализован на хромосоме 1 и кодирует длинный полипептид из 540 аминокислот. Трехмерная структура блестящей оболочки у человека на пятые сутки развития эмбриона обычно истончается под действием

физического напряжения (рост полости бластоцисты). Ранее было показано, что до 75% эмбрионов остаются в блестящей оболочке и субоптимальные условия культивирования in vitro вызывают спонтанное «затвердевание» зоны пеллюцида [117]. Также в ранних работах по изучению эмбрионов человека показано спонтанное изменение строения блестящей оболочки эмбриона при отсутствии в культуральной среде сыворотки, фолликулярной жидкости или фетуина [109]. В настоящее время нет данных, которые бы опровергли данные результаты. В 2000 г. А. Gabrielsen с коллегами провели исследование факторов, влияющих на блестящую оболочку в процессе культивирования в условиях in vitro [153]. Авторы показали, что изменения структуры зоны пеллюцида у человека зависят от таких показателей, как преовуляторное гормональное окружение и анамнез пациентки.

При анализе литературных данных по частоте спонтанного хетчинга эмбриона была найдена только одна публикация W.T. Garside с соавторами (1997). В ней изучали изменения толщины блестящей оболочки эмбриона при культивировании in vitro, и авторы убедительно доказали уменьшение толщины зоны пеллюцида у пациенток старше 35 лет [158]. В работе измеряли с помощью микрометра толщину зоны пеллюцида у каждой зиготы и каждого эмбрионов на стадии дробления 4 раза, затем рассчитывали среднее значение. Суммарно было изучено 427 эмбрионов/зигот. Авторы эмбрионов показали, что толщина 30НЫ пеллюцида человека, культивируемых в условиях *in vitro*, изменяется от 17,7 мкм у зигот, к 16,3 мкм на вторые сутки и составляет 14,9 мкм к третьим суткам развития. Толщина блестящей оболочки находится в связи с числом бластомеров, процентом фрагментации, то есть с морфологической оценкой качества эмбриона человека. Достоверно чаще имплантировались эмбрионы с более тонкой зоной пеллюцида по сравнению с эмбрионами с толстой оболочкой, и среднее значение толщины блестящей оболочки достоверно снижалась с

возрастом пациентки, что было наиболее заметно в группе женщин после 35 лет.

Некоторые авторы пишут о «затвердевании» блестящей оболочки после криоконсервации эмбрионов человека, особенно это касается замораживания медленным способом [254]. При этом никаких критериев понятия «твердости» ни в зарубежной, ни в отечественной литературе выработано не было. Нет и способа определить эффект затвердевания зоны пеллюцида у эмбрионов человека.

Как видно из анализа литературы, изменения зоны пеллюцида в виде ее истончения или утолщения, могут как влиять на спонтанный хетчинг, так и не влиять. В настоящей работе неожиданным был результат отсутствия связи между спонтанным хетчингом эмбриона и толщиной зоны пеллюцида. Однако процесс самостоятельного высвобождения эмбриона из зоны достоверно коррелировал с качеством клеток трофобласта. Эмбрионы с многоклеточным плотно упакованным трофобластом осуществляли хетчинг достоверно чаще по сравнению с другими выделенными морфологическими группами (47,2% «вышли» из зоны в группе трофобласта класса А против 41,7% — класс В и 11,1% — класс С). Качество клеток эмбриобласта не имело значения для самостоятельного хетчинга. Эмбрионы с качеством клеток внутренней клеточной массы класса С (дегенерация клеток) в 55,5% случаев осуществили самостоятельный хетчинг.

Изучение молекулярно-генетических маркеров хетчинга эмбрионов человека на стадии бластоцисты показало, что экспрессия мРНК генов, ответственных за эффективность спонтанного хетчинга, различна. В группе бластоцист с эффективным хетчингом отмечалась более высокая экспрессия мРНК генов *CTSL2*, *GATA3* и *CGB*.

Морфология клеток эмбриобласта и трофобласта коррелировала с экспрессией мРНК генов *CTSL2* и *GATA3*, которая была выше у эмбрионов 5 степени экспансии эмбрионов класса А. Таким образом, у бластоцист,

совершивших спонтанный хетчинг, а также у бластоцист отличного качества отмечалась более высокая экспрессия мРНК генов CTSL2 и GATA3. Экспрессия CGB была выше лишь у бластоцист, совершивших спонтанный хетчинг.

В 2008 г. впервые на эмбрионах хомячка G.V. Sireesha с коллегами показали, что в эмбрионах на стадии бластоцисты секретируются катепсины различных типов, в том числе L [341]. Авторам удалось установить связь катепсинов с процессом хетчинга, однако понимания участия этих траскриптов в инициации самостоятельного выхода эмбриона из зоны пеллюцида они не смогли достичь, что и было отмечено в статье.

количественного ПЦР Методом было показано количество транскриптов катепсина L, В и Р при культивировании эмбрионов золотистого хомячка в течение 72 часов [335]. Авторы убедительно доказали участие катепсинов L в процессе хетчинга, их экспрессию в клетках трофобласта у золотистого хомячка. Катепсин L регулирует участие клеток эмбриона в разрыве блестящей оболочки и его выход для имплантации в Аномальная полости матки. регуляция протеаз во время доимплантационного эмбриогенеза приводит к отсутствию имплантации, инвазии клеток трофобласта в эндометрии и ненаступлению беременности.

Необходимо понимать, что не только катепсин L участвует в процессе хетчинга. Однако действие многих видов протеаз у человека до настоящего времени не изучено. В исследовании мы впервые на донированных эмбрионах показали, что экспрессия мРНК гена катепсина L CTSL2 выше у бластоцист человека, совершивших спонтанный хетчинг, и установлена взаимосвязь с морфологическими особенностями эмбрионов человека на стадии бластоцисты. Для эмбрионов человека аналогичных работ проведено не было.

Что касается гена *GATA3*, то он является регуляторным геном, который начинает экспрессироваться в клетках эмбриона человека со стадии дробления на 4 бластомера. Показано, что белки семейства *GATA* участвуют

в дифференцировке клеток трофобласта, в эмбрионах на стадии бластоцисты мРНК гена *GATA3* отсутствуют в клетках внутренней клеточной массы. Исследователи продемонстрировали, что *GATA3* напрямую регулирует Cdx2экспрессию эмбриона на стадии бластоцисты. функционирование Cdx^2 важно для развитие клеток трофобласта, авторы GATA3 ген является предположили, что И важным регулятором молекулярных событий, которые происходят при дифференцировке клеток эмбриона. Результаты нашего исследования показали, что экспрессии мРНК гена *GATA3* достоверно выше в группе эмбрионов человека на стадии бластоцисты, которые совершили спонтанный хетчинг (p<0,0005) по сравнению с эмбрионами, оставшимися в блестящей оболочке на шестые сутки культивирования [388].

Внутри полости матки эмбрион на стадии бластоцисты осуществляет дистантное и контактное взаимодействие с клетками эндометрия. Важную роль играет выделяемый клетками трофобласта ЭТОМ диалоге хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), который также служит единственным маркером ранней имплантации. Эмбрионы человека, способные в достаточном количестве экспрессировать ХГЧ клетками трофобласта, имеют больше всего шансов осуществить самостоятельный выход из блестящей оболочки и прикрепиться внутри полости матки. В нашем исследовании было впервые показано на эмбрионах человека, что экспрессия мРНК гена *CGB* зависит от качества клеток трофобласта. Экспрессия достоверно выше в группе с морфологической оценкой клеток трофэктодермы класса А (многоклеточный компактный слой клеток). Уровень экспрессии мРНК гена *СGB* не зависит от качества клеток внутренней клеточной массы. Сам по себе ХГЧ является медиатором эффективного хетчинга, что определяется качеством клеток трофобласта. Эмбрион человека на стадии бластоцисты активно участвует в первом шаге

имплантации внутри полости матки именно с помощью ХГЧ как сигнальной системы.

При культивировании эмбрионов человека до пяти суток и последующего их переноса в полость матки, не все бластоцисты могут осуществить самостоятельный хетчинг — это показали и наши данные, и данные литературы. Именно поэтому была разработана технология вспомогательного хетчинга, которая способствует успешной имплантации и наступлению беременности.

Наибольшее распространение в практике проведения программ экстракорпорального оплодотворения получили методы лазерного или механического рассечения блестящей оболочки. Реже химический хетчинг — «выжигание» отверстия с помощью кислого раствора Тироде. Перечисленные методы обладают двумя недостатками: 1) оболочка лишь надсекается, и эмбриону на стадии бластоциста предстоит выйти из оболочки самостоятельно, затрачивая на это время; 2) отверстие в оболочке производят в случайном месте, в то время как при естественном хетчинге трофэктодерма выделяет катепсин с абэмбрионального конца, а механизм выхода из оболочки предполагает выход бластоцисты абэмбриональным концом вперед. Такой метод проведения вспомогательного хетчинга несет большой риск разрыва клеток эмбриобласта и приводит, как уже было сказано, к формированию многоплодных беременностей.

Несколько исследований, в том числе проведенное М. Мопtag с соавторами, показали, что применение частичного вспомогательного хетчинга оказывало влияние на частоту имплантации эмбрионов женщин старшего репродуктивного возраста (более 37 лет). Авторы связали положительную динамику беременностей со структурными изменениями, которые происходят в блестящей оболочке обозначенной группы пациенток. На основании результатов сканирующей электронной микроскопии было показано сглаживание пор зоны, исчезновение трехмерной структуры, ее

«губчатость». Однако данные, полученные авторами в рандомизированном контролируемом исследовании, были статистически незначимыми. Тем не менее, было описано показание для проведения частичного вспомогательного хетчинга у женщин старше 37 лет [252].

Е.-Н. Wang с соавторами в 2016 г. опубликовали работу, в которой показали преимущества истончения блестящей оболочки у размороженных эмбрионов в частоте формирования бластоцист [386]. Исследователи осуществляли вспомогательный хетчинг у эмбрионов человека на стадии дробления и культивировали их до пяти суток до момента переноса в полость матки. Было обнаружено различие по частоте бластуляции при выполнении вспомогательного хетчинга на 2/3 оболочки (полное рассечение) и истончением 1/2 зоны пеллюцида. Во второй группе частота формирования бластоцист была выше (67,35 против 71,43%). При этом авторы не оценивали частоту имплантации эмбрионов и частоту наступления беременности.

Данные по частоте имплантации эмбрионов в полости матки, полученные в настоящей работе, показали, что при использовании таких методов вспомогательного хетчинга, как частичное рассечение блестящей оболочки или ее полное удаление частота имплантации достоверно не изменяется, не увеличивается и частота наступления беременности (34,9% – частичное рассечение, 42,7% – полное удаление и 35% без хетчинга). Однако прослеживалась тенденция к увеличению частоты имплантации эмбрионов на стадии бластоцисты в полости матки при использовании метода полного удаления зоны пеллюцида.

Преимуществом полного удаления является то, что бластоциста оказывается полностью свободной от блестящей оболочки и не тратит время на вылупление. При таком виде вспомогательного хетчинга не происходит механического разделения клеток, формирующих эмбрион, что может позволить проводить профилактику монозиготных близнецов в программах экстракорпорального оплодотворения при переносе одной морфологически

нормальной бластоцисты. Мы предполагаем, что бластоциста без блестящей оболочки сразу после ее переноса в полость матки контактирует с клетками эндометрия во время окна имплантации, что способствует успешному наступлению беременности. Именно этим обстоятельством и обусловлена тенденция к увеличению частоты имплантации в группе с ферментативным хетчингом.

Выделение в общей группе эмбрионов человека на стадии бластоцисты с качеством клеток трофобласта В и ниже показало, что у таких бластоцист достоверно увеличивается частота имплантации в полость матки. В группе с частичным рассечением блестящей оболочки — 22%, полным удалением зоны — 30% и без проведения вспомогательного хетчинга — 17% (p<0,01).

Процесс имплантации эмбрионов человека представляет собой сложный, высокоорганизованный процесс, состоящий из трех этапов: 1) бластоциста контактирует c эндометрием (оппозиция), клетки трофобласта бластоцисты человека прикрепляются к рецептивным клеткам эндометрия (адгезия) и 3) проникновение клеток трофобласта внутрь эпителия эндометрия до базальной мембраны и внедрение в строму (инвазия) [208]. Контакт клеток трофобласта с клетками эндометрия при полном удалении блестящей оболочки способствует «диалогу» между клетками трофобласта эмбриона человека и клетками эпителия, выстилающего полость матки. Клетки трофобласта выделяют секреторные молекулы, которых достаточно для того, чтобы произошла имплантация. Исследования, недавно проведенные в нашем Центре, показали, что несмотря на способность бластоцист с низким качеством клеток трофобласта (к примеру, он малоклеточный, дегенеративный) при удалении блестящей оболочки имплантироваться в эндометрии, беременности достоверно развиваются и происходят самопроизвольные прерывания на ранних сроках гестации [11].

Здесь возникает ряд этических вопросов о целесообразности применения метода полного удаления зоны пеллюцида у эмбрионов человека на стадии бластоцисты с морфологически плохим качеством клеток трофобласта и переноса таких эмбрионов в полость матки. Данное обстоятельство требует дальнейших исследований на больших выборках пациенток с учетом анамнеза и с большим числом эмбрионов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установленные в работе закономерности влияния цитофизиологических молекулярно-биологических особенностей И постовуляторных ооцитов на преимплантационное развитие эмбрионов человека способствуют пониманию фундаментальных механизмов регуляции созревания женской половой клетки, формирования ее способности к последующее оплодотворению И влияния на развитие эмбриона. Морфологические аномалии женских гамет, выявляемые на светооптическом уровне, сопровождаются снижением числа копий митохондриальной ДНК, дезорганизацией гладкого эндоплазматического ретикулума, нарушением расхождения хромосом в ядрах бластомеров эмбриона и особенностями экспрессии генов. Показано, что морфофункциональное состояние ооцита определяет процессы хетчинга, имплантации бластоцисты и развитие беременности.

Систематизированные данные 0 значимости структурных функциональных изменений гамет для развития эмбриона от стадии зиготы высвобождения бластоцисты ИЗ блестяшей оболочки до процесса необходимость морфологической обосновывают оценки ДЛЯ прогнозирования успешного развития эмбриона и наступления беременности

Предложенные критерии оценки морфофункционального состояния постовуляторных ооцитов создают научную основу для оптимизации методов экстракорпорального оплодотворения, применяемых для лечения бесплодия у человека.

выводы

- 1. Морфологические особенности постовуляторных женских половых клеток влияют на развитие эмбриона человека в условиях *in vitro*, при этом параметры раннего эмбриогенеза зависят от типа изменений цитоплазматических и экстрацитоплазматических структур гамет.
- 2. Частота встречаемости морфологически нормальных женских половых клеток человека в изученной выборке составляет 28,7%. Наиболее часто регистрируют экстрацитоплазматические типы нарушений, которые встречаются в 1,5 раза чаще цитоплазматических.
- 3. В структуре цитоплазматических нарушений в 1,8 раз чаще регистрируют появление рефрактерных телец внутри цитоплазмы по сравнению с другими поражениями цитоплазмы. В группе экстрацитоплазматических аномалий наиболее частая патология дебрис в перивителлиновом пространстве (57,8%).
- 4. Частота нормального оплодотворения (2 пронуклеуса, 2 полярных тельца) достоверно выше в группе с морфологически нормальными ооцитами и снижена при выявляемых нарушениях. Отсутствие оплодотворения в группе с различными типами морфологических аномалий ооцитов выявляют в 2,5 раза чаще по сравнению с морфологически нормальными ооцитами, что может быть связано со снижением «качества» цитоплазмы в случае цитоплазматических аномалий и дефектами расхождения хромосом в первое полярное тельце при экстрацитоплазматических нарушениях.
- Частота выявления остановки дробления эмбрионов человека (класс D), полученных из ооцитов с цитоплазматическими типами нарушений, в 2,7 раза больше по сравнению с группой морфологически нормальных клеток.
- 6. Из ооцитов с центрально выраженной гранулярностью формируется 69,4% эмбрионов с анеуплоидией (в группе морфологически

- нормальных ооцитов 31,3%). Цитоплазматическая патология оказывает влияние на генетический статус эмбриона человека *in vitro*. Анеуплоидии 13, 18, 21, X и Y хромосом выявляются у 38,9% эмбрионов, полученных из ооцитов с экстрацитоплазматическими аномалиями, и у 68,4% эмбрионов, полученных из ооцитов с патологией цитоплазмы.
- 7. Центрально выраженная гранулярность ооцита человека на электронно-микроскопическом уровне представляет собой нарушение цитоплазматической организации органелл: скопление комплексов ГЭР+митохондрии (кластеризация), просветление и вакуолизация матрикса митохондрий, снижение числа митохондрий, окружающих ГЭР, вакуолизация цистерн ГЭР. Ооциты с агрегатами ГЭР в цитоплазме имеют самую низкую частоту оплодотворения из всех типов морфологических нарушений женских половых клеток 44,7%
- 8. Содержание мтДНК в ооцитах с различными типами аномалий различается в зависимости от типа нарушений. Женские половые клетки с цитоплазматическими нарушениями имеют на порядок сниженное число мтДНК по сравнению с экстрацитоплазматическими и морфологически нормальными.
- 9. Частота самостоятельного спонтанного хетчинга эмбрионов человека на стадии бластоцисты, полученных из морфологически нормальных клеток, составляет 39,5%. Эмбрионы человека на стадии бластоцисты, полученные из ооцитов с экстрацитоплазматическими аномалиями, самостоятельно высвобождаются из блестящей оболочки в 5,6 раза чаще по сравнению с эмбрионами, полученными из ооцитов с цитоплазматическими аномалиями. Процесс естественного хетчинга бластоцисты человека в условиях in vitro в 4 раза чаще происходит у эмбрионов с качеством клеток трофэктодермы А. Морфология клеток эмбриобласта в эмбрионах человека на стадии бластоцисты не влияет на процесс самостоятельного хетчинга. Эмбрионы с дегенерацией

- клеток внутренней клеточной массы (морфологический класс С) осуществляют процесс спонтанного хетчинга в 55,5% случаев.
- 10.Высокая экспрессия мРНК генов спонтанного хетчинга *CTSL2* и *GATA3* была обнаружена у эмбрионов человека на стадии бластоцисты, совершивших спонтанный хетчинг, по сравнению с оставшимися в блестящей оболочке. Повышенная экспрессия мРНК гена *CGB* бластоцист, совершивших спонтанный хетчинг, была выявлена только у эмбрионов отличного качества по клеткам трофэктодермы.
- 11. Цитологический метод как частичного рассечения блестящей оболочки, так и ее полного удаления не влияет на частоту имплантации эмбрионов человека на стадии бластоцисты в общей когорте переносимых в полость матки эмбрионов. Бластоцисты с качеством клеток трофэктодермы В и ниже имплантируются в полости матки в 4,3 раза чаще при использовании метода полного удаления блестящей оболочки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бейк Е.П. и др. Эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста / Е.П. Бейк, А.Г. Сыркашева, Н.В. Долгушина // Гинекология. 2018. Т. 20. № 1. С. 109–112.
- 2. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению / Под ред. Г. Т. Сухих, Т. А. Назаренко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 518 с.
- Брагина Е. и др. Количественное электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов при диагностике мужского бесплодия / Е.Е. Брагина, Е.Н. Бочарова // Андрология и генитальная хирургия. 2014. №1. С. 41–50.
- Брагина Е.Е. и др. Количественное ультраструктурное исследование хроматина сперматозоидов при нарушении фертильности // Андрология и генитальная хирургия. – 2009. – №1. – С. 44–49.
- Брагина Е.Е. и др. Ультраструктурный и количественный кариологический анализ половых клеток из эякулята пациента с абсолютной астенозооспермией / Е.Е. Брагина, Л.Ф. Курило, Л.В. Шилейко // Проблемы репродукции. 1997. Т. 3. №4. –С. 72–75.
- 6. Брагина Е.Е. и др. Электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов человека и его роль в диагностике мужского бесплодия / Е.Е. Брагина, Р.М. Абдумаликов, Л.В. Шилейко, // Проблемы репродукции. −2000. Т. 6. №6. С. 62–71.
- 7. Витязева И.И. и др. Современные подходы к лечению азооспермии методом микро-ТЕСЕ в программе ЭКО/ИКСИ: Обзор литературы / И.И. Витязева, С.В. Боголюбов, И.И. Дедов // Проблемы эндокринологии. 2013. Т. 59. № 5. С. 47–60.
- 8. Волкова О.В. и др. Международные термины по эмбриологии человека с официальным списком русских эквивалентов / Российская

- эмбриологическая номенклатурная комиссия; ред. А.Л. Колесников, Н.Н. Шевлюк, Л.М. Ерофеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014 – 422 с.
- 9. Данилова Л.В. и др. Транспорт и созревание сперматозоидов в половых путях самца и самки / Л.В. Данилова, Е.С. Габер // Сперматогенез и его регуляция. М.: Наука, 1983. С. 65–97.
- 10. Демяшкин Г.А. Морфологический анализ сперматогенеза основа диагностики мужского идиопатического бесплодия / Демяшкин Григорий Александрович; Первый моск. гос. мед. ун-т. им. И.М. Сеченова. М., 2017. 141 с.
- 11.Долгушина Н.В. и др. Предикторы эффективности спонтанного хетчинга бластоцист человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Н.В. Долгушина, Э.О. Ибрагимова, А.Ю. Романов // Акушерство и гинекология. 2018. № 2. С. 88–95.
- 12. Ковальская Е.В. и др. Современные представления о компактизации эмбрионов человека в условиях In Vitro / Е.В. Ковальская, А.Г. Сыркашева, А.Ю. Романов // Технологии живых систем. 2017. Т. 14. № 1. С. 25–35.
- 13. Коротченко О.Е. и др. Эффективность преимплантационного генетического скрининга у пациенток с привычным невынашиванием беременности и бесплодием / О.Е. Коротченко, А.Г. Сыркашева, Н.В. Долгушина // Акушерство и гинекология. 2018. № 3. С. 64—69.
- 14. Курило Л. Ф. и др. Анализ повреждающего действия различных доз никотина на женские половые клетки плодов крыс / Л.Ф. Курило, Е.Л. Игнатьева, Г.В. Марданова //Цитология и генетика. 1987. Т.21. №2. С. 91–94.
- 15. Курило Л. Ф. Гаметогенез человека: выявление и анализ аномалий хромосом и гамет в целом, тестирование гаметотоксического эффекта повреждающих факторов // Лабораторное дело. 1989. №10. С.4—8.
- 16. Курило Л. Ф. Дегенерация оогониев в пре- и перинатальном оогенезе человека // Цитология и генетика. 1981. Т.15. №4. С. 78—82.

- 17. Курило Л.Ф. Закономерности овариогенеза и оогенеза млекопитающих.

 М.: Lambert Academic Publishing, 2012. 292 с.
- 18. Курило Л. Ф. Морфо-функциональные характеристики оогенеза млекопитающих и человека: Автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук: (03.00.11). М., 1985. 47 с.: ил.
- 19. Курило Л.Ф. Нарушение репродуктивной функции при первичной цилиарной дискинезии и синдроме Картагенера // Синдром Картагенера у детей. М.: Династия, 2007. С. 58–64.
- 20. Курило Л. Ф. и др. Некоторые данные об оогенезе, оплодотворении и возможности культивирования in vitro яйцеклеток человека / Л.Ф. Курило, Б.В. Леонов, В.А. Лукин //Акушерство и гинекология. 1981. №6. С. 7—11.
- 21. Курило Л.Ф. Оогенез млекопитающих и культивирование ооцитов // Дьяконов Л. П. и др. Животная клетка в культуре: Методы и применение в биотехнологии. М.: Спутник+, 2000. С. 227–243.
- 22. Курило Л. Ф. Развитие техники оплодотворения ооцита вне организма и трансплантации эмбриона // Акушерство и гинекология. 1984. №1. С. 7—10.
- 23. Курило Л.Ф. Развитие эмбриона человека и некоторые моральноэтические проблемы методов вспомогательной репродукции // Проблемы репродукции. — 1998. —Т.4. — №3. — С. 39—49.
- 24. Курило Л. Ф. и др. Современное представление о влиянии повреждающих факторов на половые клетки человека / Л.Ф. Курило, Т.Я. Пшеничникова // Вопросы охраны материнства и детства. 1983. Т.28. №9. С. .54–58.
- 25.Курило Л. Ф. и др. Современные подходы к изучению гонадо- и гаметотоксического эффекта экзогенных факторов / Л.Ф. Курило, Л.В. Хилькевич // Медицинская генетика: Экспресс-информация. 1989. №9. С 1–16.

- 26.Курило Л.Ф. и др. Структура наследственных нарушений репродуктивной системы / Л.Ф. Курило, Л.В. Шилейко, Т.М. Сорокина // Вестник РАМН. 2000. №5. С. 32–36.
- 27. Курило Л. Ф. и др. Ультраструктура цитоплазмы женских половых клеток дофолликулярных стадий развития у человека / Л.Ф. Курило, М.Г. Зеленин // Цитология и генетика. 1985. Т.19. №4. С. 255—260.
- 28. Курило Л. Ф. и др. Хронология и динамика развития женских половых клеток в яичниках плодов крупного рогатого скота / Л.Ф. Курило, Н.П. Теплякова // Онтогенез. 1986. Т. 17. №2. С. 190–199.
- 29. Курило Л. Ф. и др. Электронно-микроскопический анализ ядер женских половых клеток дофолликулярных стадий развития у человека / Л.Ф. Курило, М.Г. Зеленин // Цитология и генетика. 1985. Т. 19. №6. С. 415—419.
- 30.Курило Л.Ф. Этические аспекты исследований с эмбрионами человека при выполнении вспомогательных репродуктивных технологий // Бизнес-медицина. 1998. №6. С .12–13.
- 31. Райцина С.С. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. М.: Наука, 1985. 207 с.
- 32. Руднева С.А. и др. Фрагментация ДНК в сперматозоидах и ее взаимосвязь с нарушением сперматогенеза / С.А. Руднева и др. // Андрология и генитальная хирургия. 2014. №4. С. 26–33.
- 33. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека = WHO Laboratory manual for the Examination and processing of human semen / Пер. Н.П. Макаровой; науч. ред. рус. перевода проф. Л.Ф. Курило. М.: Капитал Принт, 2012. 292 с.
- 34.Руководство по андрологии / [О.Л. Тиктинский и др.]; Под ред. О.Л. Тиктинского. Л. : Медицина. Ленингр. отд-ние, 1990. 413, [1] с., [2] л. ил.: ил.

- 35. Савельева А.П. и др. Уровень нерасхождения гоносом и хромосомы 1 в половых клетках пациентов мужского пола с бесплодием // Проблемы репродукции 2001. Т.7. №2. С. 73–78.
- 36. Сыркашева А.Г. и др. Бесплодие у женщин старшего репродуктивного возраста: причины, тактика ведения, перспективы использования преимплантационного генетического скрининга: Обзор литературы / А.Г. Сыркашева, Е.О. Ильина, Н.В. Долгушина // Гинекология. 2016. Т. 18. № 3. С. 40—43.
- 37. Сыркашева А.Г. и др. Влияние антропогенных химических веществ на репродукцию / А.Г. Сыркашева, Н.В. Долгушина, Е.Л. Яроцкая // Акушерство и гинекология. 2018. № 3. С. 16–21.
- 38. Сыркашева А.Г. и др. Изучение числа копий митохондриальной ДНК в ооцитах человека с различными морфологическими аномалиями / А.Г. Сыркашева, А.М. Красный, Т.Д. Майорова // Молекулярная медицина. 2016. Т. 14. № 5. С. 37 41.
- 39. Сыркашева А.Г. и др. Молекулярно-генетические предикторы эффективности хетчинга бластоцист человека в программе ВРТ / А.Г. Сыркашева, О.В. Бурменская, Н.В. Долгушина // Репродуктивные технологии: сегодня, завтра: М-лы XXVI Междунар. конф. РАРЧ «Репродуктивные технологии: сегодня, завтра». [М.], 2016. С. 121–122.
- 40.Сыркашева А.Г. и др. Современные представления о дифференцированном подходе к выбору протокола стимуляции суперовуляции в циклах ЭКО / А.Г. Сыркашева, М.В. Агаршева, М.Г. Андреева // Акушерство и гинекология. 2016. № 5. С. 38—43.
- 41.Хаят С.Ш и др. Структура и патогенез астенозооспермии / С.Ш. Хаят, Е.Е. Брагина, Е.Ю. Захарова // Андрология и генитальная хирургия. 2010. №3. С. 43–47.

- 42. Честков В.В. и др. Выбор среды для витрификации сперматозоидов человека / В.В. Честков //Андрология и генитальная хирургия. 2012. Т. 1. С. 46–49.
- 43.Шафеи Р.А. и др. Хетчинг бластоцисты у человека / Р.А. Шафеи, А.Г. Сыркашева, А.Ю. Романов // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 1. С. 8–20.
- 44.A practical guide to selecting gametes and embryos / Ed. Markus Montag. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2014. 321 p.: il.
- 45. Abbot A.L. et al. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis / A.L. Abbott, T. Ducibella // Frontiers in bioscience: A journal and virtual library. 2001. Vol. 6. P. 792–806.
- 46. Abou-Haila A. et al. Significance of egg's zona pellucida glycoproteins in sperm-egg interaction and fertilization / A. Abou-Haila, M. Bendahmane, D.R. Tulsiani // Minerva ginecologica. − 2014. − Vol. 66. − №4. − P. 409–419.
- 47.Aitken R.J. The Amoroso lecture. The human spermatozoon a cell in crisis? // Journal of reproduction and fertility. 1999. Vol. 115. № 1. P. 1 –7.
- 48. Aitken R.J. et al. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development / R.J. Aitken, M.A. Baker // International Jormal of Developmental Biology. − 2013. − Vol. 57. − №2/4. − P. 265 −272.
- 49. Aitken R.J. et al. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function / R.J. Aitken, J.S. Clarkson, S. Fishel // Biology of Reproduction. − 1989. − Vol. 41. − №1. − P. 183 −197.
- 50. Aitken R.J. et al. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid / R.J. Aitken, T.B. Smith, T. Lord // Andrology. 2013. Vol. 1. №2. P. 192–205.

- 51. Aitken R.J. et al. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility / R.J. Aitken, D.S. Irvine, F.C. Wu // American Journal of Obstetrics and Gynecology. − 1991. − Vol. 164. − №2. − P. 542–551.
- 52. Aitken R.J. et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa / R.J. Aiken, E. Gordon, D. Harkiss // Biology of Reproduction. − 1998. − Vol. 59. − №5. − P. 1037–1046.
- 53. Aitken R.J. et al. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies / R.J. Aitken, R. Bronson, T.B. Smith // Molecular Human Reproduction. 2013. Vol. 19. №8. P. 475 –485.
- 54. Aitken R.J. et al. Sperm penetration into a hyaluronic acid polymer as a means of monitoring functional competence / R.J. Aitken, H. Bowie, D. Buckingham // Journal of Andrology. 1992. Vol. 13. № 1. P. 44–54.
- 55. Aitken R.J. et al. Studies on the development of diluents for the transportation and storage of human semen at ambient temperature / R.J. Aitken, I.W. Allan, D.S. Irvine // Human Reproduction. − 1996. − Vol. 11. − №10. −P. 2186–2196.
- 56.Allen J.W. et al. Hsp70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes / J.W. Allen, D.J. Dix, B.W. Collins // Chromosoma. 1996. Vol. 104. №6. P. 414–421.
- 57.Alvarez J.G. et al. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa / J.G. Alvarez, B.T. Storey // Molecular Reproduction and Development. 1995. Vol. 42. №3. P. 334–346.
- 58.Anderson S. Sequence and organisation of the human mitochondrial genome / S. Anderson, A.T. Bankier, B.G. Barell // Nature. 1981. Vol. 290. P. 457–465.

- 59. Andrews R. M. et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA / R.M. Andrews, P.F. Kubacka, R.N. Chinnery // Nature genetics. 1999. Vol. 23. №2. P. 147.
- 60.Aoki V.W. et al. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability / V.W. Aoki, L. Liu, K.P. Jones // Fertility and Sterility. − 2006. − Vol. 86. − №5. − P. 1408–1415.
- 61.Appell R.A. et al. The effect of temperature on sperm motility and viability / R.A. Appel, P.R. Evans // Fertility and sterility. − 1977. − Vol. 28. − №12. − P. 1329–1332.
- 62. Arifulin E.A. et al. High-throughput analysis of TUNEL-stained sperm using image cytometry / E.A. Arifulin, E.E. Bragina, L.F. Kurilo // Cytometry. 2017. Part. A. Vol. 91. № 9. P. 854–858.
- 63. Asquith K. L. et al. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition / K. L. Asqutih, R.M. Baleato, E.A. McLaughlin // Journal of Cell Science. − 2004. − Vol. 117. − №16. − P. 3645–3657.
- 64.Atzmon Y. et al. Obesity results with smaller oocyte in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles a prospective study / Y. Atzmon, E. Shoshan-Karchovsky, M. Michaeli // Journal of Assisted Reproduction and Genetics: An Official Journal of the American Society for Reproductive Medicine. 2017. Vol. 34. №9. P. 1145–1151.
- 65.Balaban B. et al. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation B. Balaban, B. Urman // Reprod Biomed Online. 2006. Vol. 12. №5. P. 608–615.
- 66.Balaban B. et al. Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos / B. Balaban, A. Isiklar // Human Reproduction. − 2008. − Vol. 23. − №8. − P. 1778–1785.

- 67.Barakat I.A.H. et al. Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of Frozen bovine semen / I.A.H. Barakat, M.A. Dkhil, M.A. Danfour // BioMed Research International. 2015. Vol. 2015. P. 1–7.
- 68.Bartoov B. et al. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome / B. Bartoov, A. Berkovitz, F. Eltes // Journal of andrology. 2002. Vol. 23. №1. P. 1–8.
- 69.Bastiaan H. et al. The influence of homogenous zona pellucida on human spermatozoa hyperactivation, acrosome reaction and zona binding / H. Bastian, D. Franken // Andrologia. 2007. Vol. 39. № 1. P. 7.–11.
- 70.Bell C.E. et al. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development / C.E. Bell, M.D. Calder, A.J. Watson // Molecular Human Reproduction. 2008. Vol.14 № 12. P.691–701.
- 71.Berkovitz A. et al. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? / A. Berkovitz, F. Eltes, A. Ellenbogen // Human Reproduction Update. 2006. Vol. 21. № 7. P. 1787–1790.
- 72.Bianchi S. et al. Ultrastructural markers of quality are impaired in human metaphase II aged oocytes: a comparison between reproductive and in vitro aging / S. Bianchi, G. Macchiarelli, G. Micara // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2015. Vol. 32. № 9. P. 1343–1358.
- 73.Biase F.H. et al. Functional signaling and gene regulatory networks between the oocyte and the surrounding cumulus cells / Biase F.H., Kimble K.M. // BMC Genomics. 2018. Vol. 19. №1. P. 1–13.
- 74.Bluhm B.A. et al. Occurrence of the autofluorescent pigment, lipofuscin, in polar crustacean and its potential as an age marker / B.A. Bluhm, T. Brey,
 M. Klages // Polar Biology. 2001. Vol. 24. №9. P. 642–649.

- 75.Bogolyubov D.S. Karyosphere (Karyosome): A Peculiar Structure of the Oocyte Nucleus / D.S. Bogolyubov // International review of cell and molecular biology. 2018. Vol. 337. P. 1–48.
- 76.Bornman M. et al. Kartagener's syndrome with a difference: a case report /
 M. Bornman, C. de Jager, L. Erasmus // Human Reproduction Update. –
 1996. –Vol. 11. P. 189.
- 77.Braga D.P.A.F. et al. The negative influence of sperm cryopreservation on the quality and development of the embryo depends on the morphology of the oocyte / D.P.A.F. Braga, A.S. Setti, R.C.S. Figueira // Andrology. − 2015. − Vol. 3. − №4. − P. 723–728.
- 78.Brunet S. et al. Meiotic Spindle Assembly and Chromosome Segregation in Oocytes / S. Brunet, M.-H. Verlhac // Oogenesis. 2011. P. 267–290.
- 79.Caballero-Campo P. et al. Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function / P. Caballero-Campo, M. Chirinos, X.J. Fan // Biology of reproduction. 2006. Vol. 74. №4. P. 760–768.
- 80.Carvacho I. et al. Ion Channel Function During Oocyte Maturation and Fertilization / I. Carvacho, M. Piesche, T.J. Maier // Frontiers in cell and developmental biology. 2018. Vol. 6. P. 63.
- 81.Carrell D.T. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? / D.T. Carrell, B.R. Emery, S. Hammond // Human Reproduction Update. 2007. Vol. 13. №3. P. 313–327.
- 82.Carrell D. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises // Journal of Andrology. − 2008. − Vol. .29. − №2. − P.124–133.
- 83.Carroll J. et al. Ca2+ release and the development of Ca2+ release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization / J. Carrooll, K.T. Jones, D.G. Whittingham // Reviews of reproduction. − 1996. − Vol. 1. − № 3. − P. 137–143.
- 84.Carroll J. et al. Spatiotemporal dynamics of intracellular (Ca2+)i oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes / J, Carroll, K.

- Swann, D. G. Whittingham // Development. 1994. Vol. 120. №12. P. 3507–3517.
- 85.Cayli S. et al. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI / S. Cayki, A. Jakab, L. Ovari // Reproductive BioMedicine Online. 2003. Vol. 7. №4. P. 462–468.
- 86.Cayli S. et al. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm / S. Cayli, D. Sakkas, L. Vigue // Molecular Human Reproduction. − 2004. − Vol. 10. − №5. − P. 365–372.
- 87.Celik-Ozenci C. et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations / C. Celik-Ozenci, A. Jakab, T. Kovacs // Human reproduction. − 2004. − Vol. 19. − №9. − P. 2052–2059.
- 88.Chamayou S. et al. Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos / S. Chamayou, C. Ragolia, C. Alecci // Reproductive BioMedicine Online. − 2006. Vol. 13. №5. P. 661–667.
- 89. Chan H.C. et al. Epididymial defensins and sperm maturation / H.C. Chan, Y.L. Zhang // Andrologia. 2005. Vol. 37. №6. P. 200–201.
- 90.Chan. C. W. et al. Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes / C.W. Chan, V.W.S. Liu, E.Y.L. Lau // Molecular Human Reproduction. 2005. Vol. 11. №12. P. 843–846.
- 91.Check J.H. et al. Failed fertilization with conventional oocyte insemination can be overcome with the ability of ICSI according to binding or failing to bind to the zona pellucida / J.H. Check, A. Bollendorf, C. Wilson // Clinical and experimental obstetrics & gynecology. − 2016. − Vol. 43. − №2. − P. 186–168.
- 92. Check J.H. et al. Oocytes from women of advanced reproductive age do not appear to have an increased risk of zona pellucida hardening / J.H. Check,

- D.S. Chase, D. Horwath // Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology. 2012. Vol. 39. №4. P. 440–441.
- 93. Cherr G. N. et al. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling / G.N. Cherr, A.I. Yudin, J.W. Overstreet // Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology. − 2001. − Vol. 20. − №8. − P. 515–525.
- 94. Chiu P. et al. Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties / P. Chiu, B. Wong, C.L. Lee // Human Reproduction. 2008. Vol. 23. №6. P. 1385–1393.
- 95.Chohan K. et al. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm / K. Chohan, J. Griffin, M. Lafromboise // Journal of andrology. 2006. Vol. 27. №1. P. 53–59.
- 96.Cimadomo D. et al. Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence / D. Cimadomo, G. Fabozzi, A. Vaiarelli // Frontiers in endocrinology. 2018. Vol. 9. P. 327.
- 97. Cohen J. et al. Prolonged storage of human spermatozoa at room temperature or in a refrigerator / J. Cohen, C.B. Fehilly, D.E. Walters // Fertility and Sterility. 1985. Vol. 44. № 2. P. 254–262.
- 98.Colanzi A. et al. The Golgi mitotic checkpoint is controlled by BARS-dependent fission of the Golgi ribbon into separate stacks in G2 / Antonino Colanzi, Cristina Hidalgo Carcedo, Angela Persico // The EMBO Journal. 2007. Vol. 26. №10. P. 2465–2476.
- 99. Combelles CM, Cekleniak NA., Racowsky C., Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in vitro matured human oocyte // Human reproduction. 2002. N17. P.1006–1016.
- 100. Combelles C.M. et al. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in vitro matured human oocytes / C.M. Combelles, N.A. Cekleniak, C. Racowsky // Human reproduction. 2002. Vol. 17. №4. P. 1006–1016.

- 101. Conner S.J. et al. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida / S.J. Conner, L. Lefievre, D.C. Hughes // Human Reproduction. 2005. Vol. 20. № 5. P. 1148–1152.
- 102. Conti M. et al. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events / M. Conti, F. Franciosi // Human Reproduction. 2018. Vol. 24. № 3. P. 245–266.
- 103. Cooper T.G. et al. Changes in osmolality during liquefaction of human semen / T.G. Cooper, J.R. Barfield, C.H. Yeung International Journal of Andrology. 2005. Vol. 28. №1. P. 58–60.
- 104. Cooper T.G. et al. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology / T.G. Cooper, C.H. Yeung, S. Fetic // Human Reproduction. 2004. Vol. 19. №10. P. 2283–2288.
- 105. Cooper T.G. In defense of a function for the human epididymis // Fertility and Sterility. $-1990. \text{Vol.} 54. \text{N}_{2} 6. \text{P.} 965-975.$
- 106. Cree L.M. et al. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes / L.M. Cree, D.C. Samuels, L.D. Spate et al. // Nature Genetics. − 2008. − Vol. 40. − №2. − P. 249–254.
- 107. Dalzell L.H. et al. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm / L.H. Dalzell, C.M. McVicar, N. McClure // Fertility and sterility. 2004. Vol. 82. № 5. P. 1443–1445.
- 108. Daughtry B.L. et al. Chromosomal instability in mammalian preimplantation embryos: potential causes, detection methods, and clinical consequences / B.L. Daughtry, S.L. Chavez // Cell and tissue research. 2016. № 363 (1). P. 201–225.
- 109. De Felici M. et al. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture / M. de Felici, G. Siracusa // Gamete Research. 1982. Vol. 6. № 2. P. 107–113.

- 110. De Jonge Ch. et al. Influence of the abstinence period on human sperm quality / Ch. De Jonge, M. Lafromboise, Eu. Bosmans // Fertility and Sterility. 2004. Vol 82. №1. P. 57–65.
- 111. De Lamirande E. et al. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa: I. Effects on the Motility of Intact Spermatozoa and on Sperm Axonemes / E. De Lamirande, C. Gagnon // Journal of Andrology. − 1992. − Vol. 13. − № 5. − P. 368–378.
- 112. De Lamirande E. et al. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa: II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility / E. De Lamirande, C. Gagnon // Journal of Andrology. − 1992. − Vol. 13. − № 5. − P. 379–386.
- 113. De Vos A. et al. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection / A. de Vos, H. Van de Velde, H. Joris // Fertility and Sterility. − 2003. − Vol 79. − № 1. − P. 42–48.
- Dechanet T. et al. Effects of cigarette smoking on reproduction/ T.
 Dechanet, J.C. Anahory, X. Mathieu Daude // Human Reproduction Update.
 2011. Vol. 17. № 1. P. 76–95.
- 115. Deene V. et al. A Case Study on Vacuolated Oocytes Intracytoplasmic Sperm Injection and its Outcome / V. Deene, T.Y. Mudaraddi, Sh.S Gaur // International Journal of Infertility & Fetal Medicine. 2016. Vol. 7. P. 23–26.
- 116. Dittman J. et al. Mechanical characterisation of oocytes The influence of sample geometry on parameter identification / J. Dittmann, A. Dietzel, M. Böl // Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. 2018. Vol. 77. P. 764–775.
- 117. Dokras A. et al. Human trophectoderm biopsy and secretion of chorionic gonadotrophin / A. Dokras, I.L. Sargent, R.L. Gardner // Human Reproduction. 1991. Vol. 6. № 10. P. 1453–1459.

- Dolgushuna N.V. et al. Embryo aneuploidy rate and IVF outcomes in patients with overweight and obesity / N.V. Dolgushina, N.V. Desyatkova,
 O.E. Korotchenko // Problemy reproduktsii. 2017. Vol. 23. № 1. –
 P. 48.
- 119. Ducibella T. et al. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca2+ oscillation number / T. Ducibella, D. Huneau, E. Angelichio // Developmental biology. 2002. Vol. 250. № 2.– P. 280–291.
- Ducibella T. et al. The roles of Ca2+, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development / T. Ducibella, R. Fissore // Developmental biology. 2008-Vol. 315. № 2. P. 257–279.
- 121. Dumollard R. et al. Sperm-triggered (Ca2+) oscillations and Ca2+ homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production / R. Dumollard, P. Marangos, G. Fitzharris // Development. 2004. Vol. 131. №13. P. 3057–3067.
- 122. Dun M.D. et al. The chaperonin containing TCP1 complex (CCT/TRiC) is involved in mediating sperm-oocyte interaction / M.D. Dun, N.D. Smith, M.A. Baker // Journal of Biological Chemistry. − 2011. − Vol. 286. − №42. − P. 36875–36887.
- Duran H.E. et al. The association of reproductive senescence with mitochondrial quantity, function, and DNA integrity in human oocytes at different stages of maturation / H.E. Duran, S.C. Oehninger, Jr.H.W. Jones // Fertility and Sterility. − 2011. − Vol. 96. − №2. − P. 384–388.
- 124. Ebner T. et al. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles / T. Ebner, M. Sommergruber, M. Moser // Human Reproduction. 2006. Vol. 21. №8. P. 2022–2026.
- 125. Ebner T. et al. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity / T. Ebner, M. Moser, M. Sommergruber // Human Reproduction. 2003. Vol. 18. №6. P. 1294–1298.

- 126. Ebner T. et al. Developmental fate of ovoid oocytes / T. Ebner, O.Shebl, M. Moser // Human Reproduction. 2008. Vol. 23. №1. P. 62–66.
- 127. Ebner T. et al. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? / T. Ebner, M. Moser, G. Tews // Reproductive BioMedicine. 2006. Vol. 12. –№ 4. P. 507–512.
- 128. Ebner T. et al. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development / T. Ebner, M. Moser, M. Sommergruber // Fertility and Sterility. 2005. Vol. 83. № 6. P. 1635–1640.
- 129. Ebner T. et al. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum / M. Ebner, O. Moser, M. Shebl // Reproductive biomedicine online: [Print edition]. 2008. Vol. 16. № 1. P. 113–118
- 130. Eddy E.M. Role of heat shock protein Hsp70–2 in spermatogenesis // Reviews of Reproduction. 1999. Vol. 4. № 1. P. 23–30.
- 131. Elkina Y.L. et al. Detection of a mutation in the intron of Spermspecific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in patients with fibrous sheath dysplasia of the sperm flagellum / Y.L. Elkina, M.L. Kuravsky, E.E. Bragina // Andrologia. 2017. Vol. 49. № 2. P. 242–247.
- 132. Elsraite O. et al. Effect of caffeine on human sperm mortility in vitro: [Chapter] // Reproductive medicine and surgery: from the proceedings of the 15th World Congress on in Vitro Fertilization and the 4th Congress on in Vitro Maturation. Bologna: Medimond international proceedings, 2009. P. 144–148.
- 133. Elzanaty S. et al. Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility / S. Elzanaty, J. Malm, A. Giwercman // Human Reproduction. − 2005. − Vol.20. − №1. − P.221–225.

- 134. Erberelli R.F. et al. Hyaluronan-binding system for sperm selection enhances pregnancy rates in ICSI cycles associated with male factor infertility / R.F. Erberelli, R.M. Salgado, D.H.M. Pereira // Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida. 2017. Vol. 21. № 1. P. 2–6.
- 135. Erickson G.F. et al. Ovarial control of follicle development / G.F. Erikson, D.R. Danforth // American journal of obstetrics and gynecology. 1995. Vol. 172. № 2. P. 736.
- 136. Evans E.A. et al. SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR / Eric A Evans; Hong Zhang; Patricia A Martin-DeLeon // Reproductive Biology and Endocrinology. − 2003. − Vol. 1. − №1. − P. 1–12.
- 137. Evsikov A.V. et al. Gene expression during the oocyte-to-embryo transition in mammals / Alexei V. Evsikov, Caralina Marín de Evsikova // Molecular Reproduction and Development. 2009. Vol. 76. №9. P. 805–818.
- 138. Fabbri R. et al. Follicular fluid and human granulose cell cultures: influence on sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction / R. Fabbri, E. Porcu, A. Lenzi // Fertility and Sterility. − 1998. − Vol. 69. − № 1 − P. 112–117.
- Familiari G. et al. Ultrastructural dynamics of human reproduction, from ovulation to fertilization and early embryo development / G. Familiari,
 R. Heyn, M. Relucenti // International review of cytology. 2006. Vol. 249. P. 53–141.
- 140. Faramarzi A. et al. Oocyte morphology and embryo morphokinetics in an intra-cytoplasmic sperm injection programme. Is there a relationship? / Azita Faramarzi, Mohammad Ali Khalili, Sareh Ashourzadeh // Zygote. − 2017. Vol. 25. №02. –P. 190–196.
- 141. Fekonja N. et al. Clinical and structural features of sperm head vacuoles in men included in the in vitro fertilization programme / Nina

- Fekonja; Jasna Štrus; Magda Tušek-Žnidarič // BioMed research international. 2014. S. 1–12.
- 142. Ferrer-Buitrago M. et al. Human oocyte calcium analysis predicts the response to assisted oocyte activation in patients experiencing fertilization failure after ICSI / M. Ferrer-Buitrago, L. Dhaenens, Y. Lu // Human Reproduction. 2018. Vol. 33. № 3. P. 416–425.
- 143. Ferreira E.M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence / E.M. Ferreira, A.A. Vireque, P.R. Adona et al. // Theriogenology. 2009. Vol. 71. № 5. P. 836–848.
- 144. Fesahat F. et al. Developmental and cytogenetic assessments of preimplantation embryos derived from in-vivo or in-vitro matured human oocytes / F. Fesahat, S.M. Kalantar, M.H. Sheikhha // Euopean Journal of Medical Genetics. 2018. Vol. 61. №4. P. 235–241.
- Fierro-González J.C. et al. Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction / Juan Carlos Fierro-González, Melanie
 D. White, Juan Carlos Silva // Nature Cell Biology. 2013. Vol. 15. №12. P. 1424–1433.
- 146. Fissore R.A. et al. et al. Differential distribution of inositol trisphosphate receptor isoforms in mouse oocytes / R.A. Fissore, F.J. Longo, E. Anderson // Biology of Reproduction. 1999. Vol. 60. №1. P.49–57.
- 147. FitzHarris G. et al. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein / G. FitzHarris, P. Marangos, J. Carroll // Developmental Biology. 2007. Vol. 305. №1. P. 133–144.
- 148. Fragouli S. et al. The cytogenetics of polar bodies: Insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy / S. Fragouli, N.N.

- Alfarawati, J.F. Goodall // Molecular Human Reproduction. 2011. Vol.17. №5. P. 286–295.
- 149. Franken D.R. et al. Temperature controlled centrifugation improves sperm retrieval / D.R. Franken, R. van Wyk, C. Stoumann // Andrologia. 2011. Vol. 43. №3. P. 217–221.
- 150. Frattarelli J.L. et al. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles / J.L. Frattarelli, K.A. Miler, B.T. Miller // Fertility and Sterility. − 2008. − Vol. 90. − №1. − P. 97–103.
- 151. Fujiwara T. et al. Development of inositol triphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes / T. Fujiwara, K. Nakada, H. Shirakawa // Developmental biology. 1993. Vol. 156. № 1. P. 69–79.
- 152. Gabrielsen A. et al. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development: A prospective randomized controlled study / A. Gabrielsen, S. Lindenberg, K. Petersen // Human reproduction. 2001. Vol. 16. Part. 10. P. 2166 2170.
- 153. Gabrielsen A. et al. Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment / A. Gabrielsen, P.R. Bhatnager, K. Petersen, S. Lindenberg // Journal of assisted reproduction and genetics. − 2000.- Vol. 17. − № 6. − P. 323–328.
- 154. Gadella B. M. The assembly of a zona pellucida binding protein complex in sperm // Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene. 2008. Vol. 43. Suppl. 5. P. 12–19.
- 155. Gallup G.G. et al. On the origin of descended scrotal testicles: the activation hypothesis / G.G. Gallup, M. M. Finn, B. Sammis // Evolutionary Psychology. 2009. Vol. 7. №4. P. 517–526.

- 156. Ganguly A. et al. "ZP domain" of human zona pellucida glycoprotein1 binds to human spermatozoa and induces acrosomal exocytosis / A.
 Ganguly, P. Bansal, T. Gupta // Reproductive Biology and Endocrinology. −
 2010. − Vol. 8. − №1. − art110. − P. 1−14.
- 157. Gardner D.K. et al. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? / David K. Gardner, Basak Balaban // Molecular Human Reproduction. 2016. Vol. 22. №10. P. 704–718.
- 158. Garside W.T. et al. Sequential analysis of zona thickness during in vitro culture of human zygotes: correlation with embryo quality, age, and implantation / W.T. Garside, J.R. Loret de Mola, J.A. Bucci et al. // Molecular reproduction and development. − 1997. − Vol. 47. − № 1. − P 99–104.
- 159. Ge H. et al. Impaired mitochondrial function in murine oocytes is associated with controlled ovarian hyperstimulation and in vitro maturation / H. Ge, T. Tollner, Q. Dong // Reproduction, Fertility, And Development. 2012. Vol. 24. № 7. P. 945-952.
- 160. Ge H. et al. The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence / H. Ge, T. Tollner, Q. Dong // Molecular Reproduction And Development. 2012. Vol. 79. № 6. P. 392–401.
- 161. Ge Z.J. et al. Oocyte agenig and epigenetics / Z.J. Ge, H. Schatten, C.L. Zhang, Q.Y. Sun // Reproduction. 2015. Vol. 149. № 3. P. 103–114.
- 162. Gianaroli M. C. et al. Predicting aneuploidy in human oocytes: Key factors which affect the meiotic process / M.C. Gianaroli, G. Magli, A. Cavallini // Human Reproduction. 2010. Vol. 25. №9. P. 2374–2386.
- 163. Gianaroli M. C. et al. Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine / M.C. Gianaroli, G. Magli, A.P.

- Ferraretti // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2005. Vol. 53. №3. P. 261–267.
- 164. Gilchrist R.B. et al. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides / R.B. Gilchrist, A.M. Luciano, D. Richani // Reproduction. 2016. Vol. 125. №5. P. 143–157.
- 165. Goldman B. et al. Association of body mass index with embryonic aneuploidy / B. Goldman, D.H. Hodes-Wertz, J.D. McCulloh // Fertility and Sterility. 2015. Vol. 103. № 3. P. 744–748.
- 166. Gómez-Fernández J. et al. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation / José Gómez-Fernández, Emilio Gómez-Izquierdo, Cristina Tomás // Animal Reproduction Science. 2012. Vol. 133. №1-2. –P. 109–116.
- Gonzales D.S. et al. Kinematics of trophectoderm projections and locomotion in the peri-implantation hamster blastocyst / David S. Gonzales,
 Dorothy E. Boatman, Barry D. Bavister // Developmental Dynamics. –
 1996. Vol. 205. № 4. P. 435–444.
- 168. Goud P.T. et al. Presence and dynamic redistribution of type inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in human oocytes and embryos during in vitro maturation, fertilization and early cleavage divisions / P.T. Goud, A.P. Goud, P. VanOostveldt // Molecular Human Reproduction. 1999. Vol. 5. N_2 5. P. 441–451.
- 169. Grossman H. et al. Regulation of GVBD in mouse oocytes by miR-125a-3p and Fyn kinase through modulation of actin filaments / H. Grossman, E. Har-Paz, N. Gindi // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. №1.
- 170. Gu R. et al. Improved cryotolerance and developmental competence of human oocytes matured in vitro by transient hydrostatic pressure treatment prior to vitrification / R. Gu, Yun Feng, Song Guo // Cryobiology. − 2017. − № 75. − P. 144–150.

- 171. Gumus T. et al. Xanthan Gum Production of Xanthomonas spp. Isolated from Different Plants / T. Gumus; A S. Demirci; M. Mirik; M. Arici // Food science and biotechnology. 2010. Vol. 19. № 1. P. 201–206.
- 172. Gupta S.K. et al. Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization / S.K. Gupta, B. Bhandari, A. Shrestha et al. // Cell and Tissue Research. 2012. Vol. 349. № 3. P. 665–678.
- 173. Guzel Y. et al. Understanding follicle growth in vitro: Are we getting closer to obtaining mature oocytes from in vitro-grown follicles in human? / Y. Guzel, O. Oktem // Molecular reproduction and development. − 2017. − Vol. 84. − № 7. − P. 544–559.
- 174. Hammadeh M.E. et al. Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after ICSI / M.E. Hammadeh, E. Sterhler, T. Zeginiadou // Archives of Andrology. − 2001. − Vol 47. − № 2. − P. 83–87.
- 175. Hanako Bai et al. Expression and potential role of GATA factors in trophoblast development / Hanako Bai, T. Sakurai, J.D. Godkin // The Journal of reproduction and development. 2013. Vol. 59. № 1. P. 1–6.
- Handyside A.H. Molecular origin of female meiotic aneuploidies /
 Alan H. Handyside // BBA Molecular Basis of Disease. 2012. –
 Vol. 1822. №12. P. 1913–1920.
- 177. Hancock A. et al. The axonemal ultrastructure of spermatozoa from men with asthenospermia / A. Hancock, D. de Krestser // Fertility and sterility. – 1992. – Vol. 57. – №3. – P. 661 – 664.
- Hassan-Ali H. et al. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection / H. Hassan-Ali, A. Hicham-Saleh, D. El-Gezeiry // Human Reproduction. 1998. Vol. 13. № 12. P. 3425–3430.

- 179. Henkel R.R. et al. Sperm preparation for ART / R.R. Henkel, W.B. Schill // Reproductive Biology and Endocrinology. 2003. Vol. 1. P. 108
- 180. Henkel R. Sperm processing for IVF// Z.P. Nagy, A. Varghese, A. Agarwal. Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices. New York: Springer, 2012. [Chapter].
- 181. Hinduja I. et al. Ultrastructure of the cortex in the human egg /
 I.Hinduja, A. Kumar, T.C. Anand Kumar // Human Reproduction. 1990. –
 Vol. 5. № 1. P. 66–70.
- 182. Hiraoka K.K. et al. Effect the sperm selection magnification (400x vs 1,200x) on fertilization results and embryo development in human Piezo-ICSI / K. K. Hiraoka, Y. Otsuka, T. Ishikawa // Fertility and Sterility. 2017. Vol. 108. 3. e. 147.
- 183. Holstein A.F. et al. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment / A.F. Holstein, W. Schulze, M. Davidoff // Reproductive biology and endocrinology. 2003. Vol. 1. №1. P. 107–123.
- 184. Horst M. et al. Isolation of protein import components from Saccharomyces cerevisiae mitochondria / M. Horst, P Jenö, N.G. Kronodou // Methods in enzymology. 1995. Vol. 260. P. 232 241.
- 185. Hosoe M. et al. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex / M. Hosoe, Y. Shioya // Zygote. − 1997. − Vol. 5. − № 4. − P. 371–376.
- 186. Hunnicutt G. R. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding / G. Hunnicut, P. Primakoff, D.G. Myles // Biology of reproduction. − 1996. − Vol. 55. − № 1. − P. 80–86.
- Hunnicutt G. R. et al. Structural relationship of sperm soluble hyaluronidase to the sperm membrane protein PH-20 / G. Hunnicut, K. Mahan, W.F. Lathrop // Biology of reproduction. 1996. Vol. 54. № 6. P. 1343–1349.

- 188. Huszar G. et al. Semen Characteristics After Overnight Shipping: Preservation of Sperm Concentrations, HspA2 Ratios, CK Activity, Cytoplasmic Retention, Chromatin Maturity, DNA Integrity, and Sperm Shape
- 189. / G. Huszar, C. Celik-Ozenci C., S. Cayli // Journal of andrology. 2004. Vol. 25. № 4. P. 593.–604.
- 190. Huszar G., Jakab A., Sakkas D. et al. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects // Reprod Biomed Online 2007; 14:650–663.
- 191. Huszar G. et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status / G. Huszar, C.C. Ozenci, S. Gayli // Fertility and sterility. 2003. Vol. 79. Suppl. 3. P. 1616 1624.
- 192. Huszar G. et al. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2 / G. Huszar, K. Stone, D. Dix // Biology of Reproduction. 2000. Vol. 63. Part. 3. P. 925–932
- 193. Iwasaki A. et al. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients / A. Iwasaki, C. Gagnon // Fertility and Sterility. 1992.
 Vol. 57. № 2. P. 409–416.
- 194. Jackson R.E. et al. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation // Fertility and Sterility. − 2010. − Vol. 94. − №7. − P. 2626–2630.
- 195. Jacques C. et al. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency / C. Jacques, C. Vasseur, Y. Malthie // Human Reproduction. 2005. Vol. 20. № 3. P. 593–597.
- 196. Jansova D. et al. Localization of RNA and translation in the mammalian oocyte and embryo / D. Jansova, A. Teytkova, M. Koncicka // PloS one. 2018. Vol. 13. №3. e0192544.

- 197. Jaffe L.A. et al. Structural changes of the endoplasmic reticulum of sea urchin eggs during fertilization / L.A. Jaffe, M. Terasaki // Developmental Biology. 1993. Vol. 156. № 2. P. 566–573.
- 198. Jakab A. et al. Intracytoplasmic sperminjection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies / A. Jakab, D. Sakkas, E. Delpiano // Fertility and Sterility. 2005. Vol. 84. №6. P. 1665–1673.
- Jia Z. et al. Resveratrol reverses the adverse effects of a diet-induced obese murine model on oocyte quality and zona pellucida softening / Z. Jia,
 Z. Feng, L. Wang // Food & function. 2018. Vol. 9. №5. P. 2623–2633.
- 200. Jones K.T. et al. Repetitive sperm-induced Ca2+ transients in mouse oocytes are cell cycle dependent / K.T. Jones, J. Carroll, J.A. Merriman // Development. 1995. Vol. 121. №10. P. 3259–3266.
- 201. Jones R. et al. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma / R, Jones, T. Mann, R. Sherins // Fertility and sterility. − 1979. − Vol. 31. − №5. − P. 531–537.
- 202. Kahraman S. et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection
 / S. Kahraman, K. Yakin, E. Donmez // Human Reproduction. 2000. № 15. P. 2390–2393.
- 203. Kaji K. et al. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals / K. Kaji, A. Kudo // Reproduction. 2004. Vol. 127. № 4. P. 423–439.
- 204. Kaneda H. et al. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis / H. Kaneda, J. Hayashi, S. Takahama // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995. Vol 92. № 10. P. 4542–4546.
- 205. Kemisty B. et al. Expression and cellular distribution of zona pellucida glycoproteins in canine oocytes before and after in vitro

- maturation / B. Kempisty, S. Ciesiolka, K. Jopek // Zygote. 2015. Vol. 23. №6. P. 863–873.
- 206. Khalili M. et al. Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review / M.A. Khalili, A. Shahedi, S. Ashourzadeh // Journal of assisted reproduction and genetics. − 2017. − Vol. 34. − № 11. − P. 1413–1426.
- 207. Kiefer S.M. et al. Proteolytic processing of human zona pellicida proteins / S.M. Kiefer, P. Saling // Biology of reproduction. 2002- Vol. 66. №2. P. 407–414.
- 208. Kim S.M. et al. A Review of Mechanisms of Implantation / Su-Mi Kim; Jong-Soo Kim // Development & Reproduction. 2017. P. 351–359.
- 209. Kimura M. et al. Functional roles of mouse sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization / M. Kimura, E. Kim, W. Kang // Biology of Reproduction. 2009. Vol. 81. №5. P. 939–947.
- 210. Kimura Y. et al. Conserved Mode of Interaction between Yeast Bro1 Family V Domains and YP(X)nL Motif-Containing Target Proteins / Yoko Kimura, Mirai Tanigawa, Junko Kawawaki // Eukaryotic Cell. 2015. Vol. 14. № 10. P. 976–982.
- 211. Kirkegaard K. et al. Hatching of in vitro fertilized human embryos is influenced by fertilization method / K. Kirkegaard, J.J. Hindkjaer, H.J. Ingerslev // Fertility and Sterility. 2013. Vol. 100. P. 1277–1282.
- 212. Knez K. et al. Vpliv vakuol v glavi semenčice na dinamiko razvoja zarodkov = Influence of sperm head vacuoles on dynamics of embryo development: doktorsko delo / Katja Knez, Irma Virant-Klun: Thesis of dissertation. Ljubljana: [K. Knez], 2015.
- Ko C.-S. et al. Changes to the meiotic spindle and zona pellucida of mature mouse oocytes following different cryopreservation methods / C.-S.
 Ko, D.-C. Ding, Y.-N. Chu // Animal Reproduction Science. 2008. Vol. 105. №3-4. P. 272–282.

- 214. Korotchenko O.E. et al. Role of preimplantation genetic screening in effectiveness of programs of assisted reproductive technologies in women with recurrent miscarriage: a review / O.E. Korotchenko, N.V. Dolgushina, A.G. Syrkasheva // Problemy reproduktsii. − 2017. − Vol. 23. − № 2. − P. 50.
- 215. Kort D.H. et al. Human embryos commonly form abnormal nuclei during development: a mechanism of DNA damage, embryonic aneuploidy, and developmental arrest / Daniel H. Kort, Gloryn Chia, Nathan R. Treff // Human Reproduction. 2016. Vol. 31. №2. P. 312–323.
- 216. Kwon S. et al. Dynamic interaction of formin proteins and cytoskeleton in mouse oocytes during meiotic maturation / S. Kwon, H. Shin, H.J. Lim // Molecular Human Reproduction. 2011. Vol. 17. № 5. P. 317–327.
- 217. Lachaud C. et al. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa / C. Lachaund, J. Tesarik, M.L. Cacadas // Human Reproduction. 2004. Vol. 19. №3. P. 607–610.
- 218. Lai Y.M. et al. Coculture of human spermatozoa with reproductive tract cell monolayers can enhance sperm functions better than coculture with Vero cell monolayers / Y.M. Lai, F.H. Chang, C.L. Lee // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 1996. Vol. 13. №5. P. 417–422.
- 219. Lasiene A. et al. Morphological criteria of oocyte quality / A. Lasiene,
 A. Vitkus, A. Valanciute // Medicina (Kaunas, Lithuania). 2009. Vol. 45.
 № 7. P. 509–515.
- 220. Lazzaroni-Tealdi E. et al. Oocyte scoring enhances embryo-scoring in predicting pregnancy chances with IVF where it counts most / E. Lazzaroni-Tealdi, D.H. Barad, D.F. Albertini // PloS ONE. 2015. Vol. 10. №12. e0143632.
- 221. Leader, B. et al. Formin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the meiotic spindle in mouse oocytes / B. Leader, H. Lim, M. J. Carabatsos // Nature Cell Biology. 2002. Vol. 4. P. 921–928.

- 222. Lee G.S. et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca2+ and cAMP / G.S. Lee, N. Subramanian, A.I. Kim // Nature. Vol. 2012. № 492 (7427). P. 123–127.
- 223. Lefievre L. et al. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human / L. Lefievre, S.J. Conner, A. Salpekar // Human Reproduction. 2004. Vol. 19. № 7. P. 1580–1586.
- 224. Lehmann P. et al. Anti-Müllerian hormone (AMH): a reliable biomarker of oocyte quality in IVF / P. Lehmann, M.P. Velez, J. Saumet // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2014. Vol 31. №4. P. 493–498.
- 225. Levi M. et al. Morphological and molecular markers are correlated with maturation-competence of human oocytes / M. Levi, Y. Ghetler, A. Shulman // Human Reproduction. 2013. Vol. 28. №9. P. 2482–2489.
- 226. Levi M. et al. Regulation of division in mammalian oocytes: implications for polar body formation // Molecular human reproduction. − 2011. Vol. 17. № 5. P. 328–334.
- 227. Lewis S. et al. Effect of pentoxifylline on human sperm motility in normozoospermic individuals using computer-assisted analysis / S. Lewis, J. Moohan, W. Thompson // Fertility and Sterility. − 1993. − Vol. 59. − № 2. − P. 418.
- 228. Li P. et al. An antimicrobial peptid gene found in the male reproductive system of rats / P. Li, Y.C. Chan, B. He // Science. 2001. Vol. 291. №5509. P. 1783
- 229. Liu S. et al. Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation distribution / S. Liu, Y. Li, X. Gao // Fertility and Sterility. − 2010. − Vol. 93. − № 5. − P. 1550–1555.
- 230. Lucas H. et al. Conventional IVF versus ICSI in sibling oocytes: A French experience analysis for BLEFCO / H. Lukas, J. Lammers, J. Pfeffer

- // Gynecologie, obstetrique & fertilite. 2010. Vol. 38. № 9. P. 515–520.
- Madaschi C. et al. Zona pellucida birefringence score and meiotic spindle visualization in relation to embryo development and ICSI outcomes / C. Madaschi, T. Aoki, D. Ferreira // Reproductive BioMedicine Online. 2009. Vol. 18. № 5. P. 681–686.
- 232. Machaca K. Ca2+ signaling differentiation during oocyte maturation / Khaled Machaca // Journal of Cellular Physiology. − 2007. − Vol. 213. − № 2. − P. 331–340.
- 233. Magerkurth C. et al. Scanning electron microscopy analysis of the human zona pellucida: influence of maturity and fertilization on morphology and sperm binding pattern / C. Magerkurth, E. Topfer-Petersen, P. Schwartz // Human Reproduction. 1999. Vol. 14. № 4. P. 1057–1066.
- Malcuit C. et al. Calcium oscillations and mammalian egg activation /
 C. Malcuit, M. Kurokawa, R. A.Fissore // Journal of Cellular Physiology. –
 2006. Vol. 206. №3. P. 565–573.
- 235. Mangus O. et al. Effect of varying the abstinence period in the same individuals on sperm quality / O. Magnus, A. Tollesfsrud, T. Abyholm // Systems Biology in Reproductive Medicine. 1991. Vol, 26. № 3. P. 199–203.
- 236. Mann J.S. et al. Reorganization of the endoplasmic reticulum and development of Ca2+ release mechanisms during meiotic maturation of human oocytes / J.S. Mann, K.M. Lowther, L.M. Mehlmann // Biology of reproduction. − 2010. − Vol. 83. − № 4. − P. 578.
- Mannikko M. et al. Association between sequence variations in genes encoding human zona pellucida glycoproteins and fertilization failure in IVF
 / M. Mannikko, R.-M. Tormala, T. Tuuri // Human reproduction. 2005. Vol. 20. № 6. P. 1578–1585.
- 238. Mao J. et al. Regulation of oocyte mitochondrial DNA copy number by follicular fluid, EGF, and neuregulin 1 during in vitro maturation affects

- embryo development in pigs / J. Mao, K.M. Whitworth, L.D. Spate // Theriogenology. 2012. Vol. 78. № 4. P. 887–897.
- 239. Margulis L. The microbes' contribution to evolution // Biosystems. 1975. Vol. 7. № 2. P. 266–292.
- 240. Marin-Briggiler C.I. et al. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation related events / C.I. Marin-Briggiler, J.G. Tezon, P.V. Miranda // Fertility and Sterility. − 2002. − Vol. 77. − № 2. − P. 252–259.
- 241. Marshall K.L. et al. The effects of superovulation and reproductive aging on the epigenome of the oocyte and embryo / K.L. Marshall, R.M. Rivera // Molecular Reproduction and Development. − 2018. − Vol. 85. − №2. − P. 90–105.
- 242. Masala L. et al. Delay in maternal transcript degradation in ovine embryos derived from low competence oocytes / L. Masala, F. Ariu, L. Bogliolo // Molecular reproduction and development. – 2018. – Vol. 85. – № 5. – P. 427–439.
- 243. Mateizel I. et al. Deliveries of normal healthy babies from embryos originating from oocytes showing the presence of smooth endoplasmic reticulum aggregates / I. Mateizel, L. Van Landuyt, H. Tournaye // Human Reproduction. 2013. Vol. 28. № 8. P. 2111–2117.
- 244. May-Panloup P. et al. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency / P. May-Panloup, M.F. Chretien, C. Jacques // Human Reproduction. 2005. Vol. 20. № 3. P. 593–597.
- 245. McCoy R.C. et al. Common Variants Spanning PLK4 Are Associated With Mitotic-Origin Aneuploidy in Human Embryos / R.C. McCoy, Z. Demko, A. Ryan // Obstetrical & gynecological survey. 2015. Vol. 70. №7. P. 451–452.
- 246. Mehlmann L.M. et al. Reorganization of the Endoplasmic Reticulum during Meiotic Maturation of the Mouse Oocyte / L.M. Mehlmann, L.A.

- Jaffe, M. Terasaki // Developmental Biology. 1995. Vol. 170. №2. P. 607–615.
- 247. Meriano J.S. et al. Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles / J.S. Meriano, J. Alexis, S. Visram-Zaves // Human Reproduction. 2001. Vol. 16. P. 2118–2123.
- 248. Metwally M. et al. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence / Mostafa Metwally, Kee J. Ong, William L. Ledger // Fertility and sterility. − 2008. − Vol. 90. − №3. − P. 714–726.
- 249. Ming-Hui Liu et al. Ultrastructural Changes and Methylation of Human Oocytes Vitrified at the Germinal Vesicle Stage and Matured in vitro after Thawing / Ming-Hui Liu, Wen-Hui Zhou, Da-Peng Chu // Gynecologic and Obstetric Investigation. 2017. Vol. 82. №3. P. 252–261.
- 250. Mitchell V. et al. Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities / V. Michell, N. Rives, M. Albert // Human Reproduction. 2006. Vol. 21. № 8. P. 2065–2074.
- 251. Momozawa K. et al. Caffeine in fertilization medium is not essential for bovine IVF by fully capacitated spermatozoa / K. Momozawa, Y. Fukuda // The Journal of reproduction and development. 2003. Vol. 49. Part 6. P. 507–512.
- 252. Montag M. u.a. Gibt es Vorteile des assisted hatching?: Inwieweit ist mit Gefahren des assisted hatching für den sich entwickelnden Embryo zu rechnen? / M.H. Montag, H. van der Ven // Reproduktionsmedizin: Fortfuehrung von Fertilitaet. 2000. Vol. 16. № 1. P. 62–63.
- 253. Montag M. et al. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles / M. Montag, T.

- Schimming, M. Koster // Reproductive BioMedicine Online. 2008. Vol. $16. N_2 2. P. 239-244$.
- 254. Montag M.H. et al. Principles of IVF Laboratory Practice Optimizing Performance and Outcomes / Markus H. M. Montag, Dean E. Morbeck. Cambridge: Cambridge University Press, 2017.
- 255. Morales C. R. et al. Cytoplasmic localization during testicular biogenesis of the murine mRNA for Spam1 (PH-20), a protein involved in acrosomal exocytosis / C.R. Morales, H. Badran, M. El-Alfy // Molecular Reproduction and Development. 2004. Vol. 69. № 4. P. 475–482.
- Moreno R.D. et al. Golgi Apparatus Dynamics During Mouse Oocyte
 In Vitro Maturation: Effect of the Membrane Trafficking Inhibitor Brefeldin
 A 1 / R. D. Moreno, G. Schatten, J. Ramalho-Santos // Biology of
 Reproduction. 2002 Vol. 66. № 5. P. 1259–1266.
- 257. Morgan C. J. et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes / C.J. Morgan, M. Jean, F. Savagner // Molecular Human Reproduction. 2001. Vol. 7. № 5. P. 425–429.
- 258. Morin G. et al. SPAM1 isoforms from two tissue origins are differentially localized within ejaculated bull sperm membranes and have different roles during fertilization / G. Morin, R. Sullivan, I. Laflamme // Biology of Reproduction. 2010. Vol. 82. № 2. P. 271–281.
- 259. Mortimer D. et al. Influence of abstinence and ejaculation-to-analysis delay on semen analysis parameters of suspected infertile men / D. Mortimer, A. Templeton, E. Lenton // Archives of andrology. − 1982. − Vol. 8. − № 4. − P. 251–256.
- 260. Motiei M. et al. Evaluation of HSPA2 in fertile and infertile individuals / M. Motiei, M. Tavalaee, F. Rabiei // Andrologia. 2013. Vol. 45. № 1. P. 66–72.
- 261. Motta P.M. et al. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells / P.M. Motta, S.A. Nottola, S. Makabe, R. Heyn // Human Reproduction. 2000. Vol. 15. Suppl. 2. P. 129–147.

- 262. Murakoshi Y. et al. Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume / Y. Murakoshi, K. Sueoka, K. Takahashi // Journal of assisted reproduction and genetics. 2013. Vol. 30. № 10. P. 1367–1375.
- 263. Nagano M. et al. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies / Masashi Nagano, Seiji Katagiri, Yoshiyuki Takahashi // Zygote. − 2006. − Vol. 14. − №04. − P. 299–304.
- Nagaoka S.I. et al. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem / So I. Nagaoka, Terry J. Hassold, Patricia A. Hunt // Nature Reviews Genetics. 2012. Vol. 13. № 7. P. 493–504.
- 265. Nanassy L. et al. Paternal effects on early embryogenesis / L. Nanassy, D. Carrell // Journal of Clinical Embryology. 2008. Vol. 11. № 3. P. 9–28.
- 266. Nasr-Esfahani M.H. et al. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome / M.H. Nasr-Esfahani, S. Razavi, A.A. Vahdati // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2008. Vol. 25. № 5. P. 197–203.
- 267. Nassar A. et al. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility / A. Nassar, M. Mahony, M. Morshedi // Fertility and Sterility. 1999. Vol. 71. № 5. P. 919–923.
- Naumenko V. et al. Detection and quantification of human herpes viruses types 4-6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases / V. Naumenko, Y. Tyulenev, L. Kurilo // Andrology. 2014. Vol. 2. № 5. P. 687–694.
- 269. Navarro-Costa P. et al. Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm / P. Navarro-Costa, P. Nogueira, M. Caevalho // Human Reproduction. 2010. Vol. 25. № 10. P. 2647–2654.

- 270. Nayudu P.L. et al. An analysis of human oocytes and follicles from stimulated cycles: oocyte morphology and associated follicular fluid characteristics / P.L. Nayudu, A. Lopata, G.M. Jones // Human reproduction. 1989. Vol. 4. №5, P. 558–567.
- 271. Neyer A. et al. Sperm head vacuoles are not affected by in-vitro conditions, as analysed by a system of sperm-microcapture channels / A. Neyer, P. Vanderzwalmen, M. Bach // Reproductive BioMedicine Online. 2013. Vol. 26. № 4. P. 368–377.
- 272. Nixon B. et al. The biological significance of detergent-resistant membranes in spermatozoa / B. Nixon, R.J. Aitken // Journal of Reproductive Immunology. 2009. Vol. 83. №1-2. P. 8–13.
- Nixon B. et al. Galactosyltransferase function during mammalian fertilization / B. Nixon, Q. Lu, M.J. Wassler // Cells Tissues Organs. 2001.
 Vol. 168. № 1-2. P. 46–57.
- 274. Nixon B., Mitchell L.A., Anderson A.L. et al. Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes // Journal of Cellular Physiology. 2011. Vol 226. № 10. P. 2651–2665.
- 275. Nottola S.A. et al. Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations / S.A. Nottola, G.Maccharelli, G. Coticchio // Human Reproduction. − 2007. − Vol. 22. − № 4. − P. 1123–1133.
- 276. Oehninger S. Clinical management of male infertility in assisted reproduction: ICSI and beyond // International Journal of Andrology. 2011. Vol. 34. № 5. Pt. 2. e319–e329.
- 277. Oehninger S. et al. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa / S. Oehninger, P. Blackmore, M. Mahony // Journal of assisted reproduction and genetics. 1995. Vol. 12. № 1. P. 41–47.
- 278. Orgebin-Crust M.S. Sperm maturation in rabbit epididymis // Nature. $-1967. -25 \text{ nov.} N_{\odot} 216(5117). -P. 816-818.$

- 279. Ortega C. et al. Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options? / C. Ortega, G. Verheyen, D. Raick // Human Reproduction Update. 2011. Vol. 17. № 5. P. 684–692.
- 280. Osheroff J. E. et al. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation / J.E. Osheroff, P.E. Viskonti, J.P. Valenzuela // Molecular human reproduction. − 1999. Vol. 5. № 11. P. 1017–1026.
- Otsuki J. et al. Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality / J. Otsuki, Y. Nagai, K. Chiba // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2007. Vol. 24. № 7. P. 263–270.
- 282. Otsuki J. et al. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes / J. Otsuki, A. Okada, K. Morimoto // Human reproduction. 2004. Vol. 19. № 7. P. 1591–1597.
- 283. Ozawa M. et al. Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst / M. Ozawa, M. Sakatani, J. Yao // BMC developmental biology. 2012. Vol. 6. P. 12–33.
- 284. Pan X. et al. Nitric oxide regulates blastocyst hatching in mice / X.
 Pan, X. Wang, Z. Sun // International Journal of Clinical and Experimental
 Medicine. 2015. Vol. 8. №5. P. 6994–7001.
- 285. Pancha C.E. et al Cytokeratin filaments are present in golden hamster oocytes and early embryos / C.E. Plancha, M.C. Fonseca, J.F.D. Ferreira // Differentiation. 1989. Vol. 42. № 1. P. 1–9.
- 286. Pariz J.R. et al. Effects of caffeine supplementation in post-thaw human semen over different incubation periods / J.R. Pariz, J. Hallak // Andrologia. 2016. Vol. 48. № 9. P. 961–966.
- 287. Park Y.S. et al. Observation of sperm-head vacuoles and sperm morphology under light microscope / Y.S. Park, D.S. Ko, D.W. Park //

- Clinical and experimental reproductive medicine. 2014. Vol. 41. –№3. P. 132–136.
- 288. Parmegiani L. et al. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection / L. Parmegiani, G.E. Cognigni, W. Ciampaglia // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2010. Vol. 27. № 1. P. 13–16.
- 289. Parmegiani L. et al. Risks in injecting hyaluronic acid non-bound spermatozoa / L. Parmegiani, G.E. Cognigni, M. Filicori // Reproductive BioMedicine Online. 2010. Vol. 20. № 3. P. 437–438.
- 290. Parmegiani L. et al. Sperm selection: effect on sperm DNA quality / L. Parmegiani, G.E. Cognigni, M. Filicori // Advances in experimental medicine and biology. 2014. Vol. 791. P. 151–172.
- 291. Peer S. et al. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C? / S. Peer, F. Eltes, A. Berkovitz // Fertility and sterility. 2007. Vol. 88. № 6. P. 1589–94.
- 292. Pérez-Cerezales S. et al. Sperm selection by thermotaxis improves ICSI outcome in mice / S. Pérez-Cerezales, R. Laguna-Barraza, A.C.de Castro // Scientific reports. 2018. Vol. 8. № 1. P. 2902.
- 293. Petrella C. et al. Human sperm can survive at room temperature for weeks: Measured by motility and viability of sperm maintained under various conditions / C. Petrella, J. Hsien, E. Blake // Fertility and Sterility. 2003. Vol. 80. Suppl. 3. P. 210.
- 294. Pfender S. et al. Spire-type actin nucleators cooperate with Formin-2 to drive asymmetric oocyte division / S. Pfender, V. Kuznetsov, S. Pleiser // Current Biology. 2011. Vol. 21. №11. P. 955–960.
- 295. Plancha C.E. Cytokeratin dynamics during oocyte maturation in the hamster requires reaching of metaphase / C.E. Plancha // Differentiation. – 1996. – Vol. 60. – № 2. – P. 87.
- 296. Pökkylä R.-M. et al. Sequence variations in human ZP genes as potential modifiers of zona pellucida architecture / Reeta-Maria Pökkylä, Jouni Tapani Lakkakorpi, Sinikka Helena Nuojua-Huttune, Juha Samuli

- Tapanainen // Fertility and Sterility. 2011. Vol. 95. №8. P. 2669–2672.
- 297. Prinosilova P. et al. Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology / P. Prinosilova, T. Kruger, L. Sati // Reproductive BioMedicine Online. 2009. Vol. 18. № 2. P. 177–183.
- 298. Puscheck E.E. et al. The impact of male factor on recurrent pregnancy loss / E.E. Puscheck, R.S. Jeyendran // Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. 2007. Vol. 19. № 3. P. 222–228.
- 299. Qiu D. et al. Sirt2-BubR1 acetylation pathway mediates the effects of advanced maternal age on oocyte quality / D. Qiu, X. Hou, L. Han // Agning Cell. 2018. Vol. 17. №1. e12698.
- 300. Rama Raju G.A. et al. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging / G.A. Rama Raju, G.J. Prakash, K.M. Krishna // Reproductive BioMedicine Online. 2007. Vol. 14. № 2. P. 166–174
- 301. Ramalho-Santos S. et al. Mitochondrial functionality in reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells / S. Ramalho-Santos, S. Varum, P. Amaral // Human Reproduction Update. 2009. Vol. 15. № 5. P. 553–572.
- 302. Redgrove K. A. et al. Investigation of the mechanisms by which the molecular chaperone HSPA2 regulates the expression of sperm surface receptors involved in human sperm-oocyte recognition / K.A. Redgrove, A.L. Anderson, McLaughlin // Molecular human reproduction. − 2013. − Vol. 19. − №3. − P. 120–135.
- 303. Redgrove K. A. et al. The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition / K. A. Redgrove, B. Nixon, M.A. Baker // PLoS ONE. 2012. Vol 7. № 11. e50851.

- 304. Reitinger S. et al. Mouse testicular hyaluronidase-like proteins SPAM1 and HYAL5 but not HYALP1 degrade hyaluronan / S. Reitinger, G.T. Laschober, C. Fehrer // The biochemical journal. 2001. Vol. 401. Part 1. P. 79–85.
- 305. Reynier P. et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes / P. Reyner, P. May-Panloup, M-F. Chreitien // Molecular Human Reproduction. 2001. Vol.7. №5. P.425–429.
- 306. Richiani D. et al. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence / D. Richani, R.B. Gilchrist // Human Reproduction Update. 2018. Vol. 24. №1. P. 1–14.
- 307. Rienzi L. et al. Comprehensive protocol of traceability during IVF: the result of a multicentre failure mode and effect analysis / L. Rienzi, F. Bariani, M. Dalla Zorza // Human Reproduction. − 2017. − Vol. 32. − № 8 − P. 1612–1620.
- 308. Rienzi L. et al. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study / L.F. Rienzi, A. Cobo, A. Pantoffi // Human Reproduction. − 2012. − Vol. 27. − № 6. − P. 1606–1661.
- 309. Rienzi L. et al. Embryo development of fresh «versus» vitrified metaphase II oocytes after ICSI: A prospective randomized sibling-oocyte study / L. Rienzi, S. Romano, L. Albricci // Human Reproduction. 2010. Vol. 25. №1. P. 66–73.
- 310. Rienzi L. et al. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature / L. Rienzi, G, Vajta, F. Ubaldi // Human Reproduction. 2011. Vol. 17. № 1. P. 34–45.
- 311. Rienzi L. et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome / L. Rienzi, F. Ubaldi, M. Iacobelli // Fertility and Sterility. 2008. Vol. 90. № 5. P. 1692–1700.

- 312. Robker L. et al. Inflammatory pathways linking obesity and ovarian dysfunction / L. Robker, L. L.-Y. Wu, X. Yang // Journal of Reproductive Immunology. 2011. Vol. 88. № 2. P. 142–148.
- 313. Runft L.L., Jaffe L.A., Mehlmann L.M. Egg activation at fertilization: where it all begins / L.L. Runft, L.A. Jaffe, L.M. Mehlmann // Developmental Biology. 2002. Vol. 245. № 2. P. 237–254.
- 314. Sá R. et al. Ultrastructure of tubular smooth endoplasmic reticulum aggregates in human metaphase II oocytes and clinical implications / R. Sá, M. Cunha, J. Silva // Fertility and Sterility. 2011. Vol. 96. №1. P. 143–149.
- 315. Sabeur K. et al. The PH-20 protein in human spermatozoa / K. Sauber, G.N. Cherr, A.I Yudin // Journal of andrology. 1997. Vol. 18. №2. P.151–158.
- 316. Sakurai N. et al. Effects of downregulating TEAD4 transcripts by RNA interference on early development of bovine embryos / Nobuyuki Sakurai, Kazuki Takahashi, Natsuko Emura, Tsutomu Hashizume, Ken Sawai // The Journal of reproduction and development. − 2017. − Vol. 63. − № 2. − P. 135–142.
- 317. Saleh R.A. et al. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice / R.A. Saleh, A. Agarwal // Journal of andrology. 2002. Vol. 23. № 6. P. 737–752.
- 318. Sanchez M. et al. Preliminary clinical and FISH results on hyaluronic acid sperm selection to improve ICSI / M. Sanchez, B. Aran, J. Blanco // Human Reproduction. 2005. Vol. 20. Suppl. 1. i200.
- 319. Santella L. et al. Is the human oocyte plasma membrane polarized? / L. Santella, M. Alikani, B.E. Talansky // Human Reproduction. 1992. Vol. 7. № 7. P. 999–1003.
- 320. Santos T.A. Shourbagy E. John J.C.S. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome // Fertility and Sterility. 2006. Vol. 85. №3. P. 584–591.

- 321. Sathnanthan A.H. From oogonia to mature oocytes: Inactivation of the maternal centrosome in humans / A. H. Sathananthan // Microscopy Research and Technique. 2006. Vol. 69. № 6. P. 396–407.
- 322. Sathnanthan A.H. et al. Mechanics of human blastocyst hatching in vitro / A. H. Sathananthan, J. Menezes, S. Gunasheela // Reproductive biomedicine online. 2003. Vol. 7. № 2. P. 228–234.
- 323. Sathnanthan A.H . et al. Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis / A. H. Sathananthan, A.O. Trounson // Human Reproduction. 2000. Vol. 15. № 2. P. 148–159.
- 324. Sathnanthan A.H. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: Unique aspects of the human oocyte / A. H. Sathnanthan // Microscopy Research and Technique. 1994. Vol. 27. № 2. P. 145–164.
- 325. Sathnanthan A.H. Ultrastructure of the human egg / A. H. Sathananthan // Human cell. -1997. Vol. 10. \cancel{N} 21. P. 21–38.
- 326. Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization / G. Schatten // Developmental Biology. − 1994. − Vol. 165. − № 2. − P. 299–335.
- 327. Schmutzler A.G. et al. Oocyte morphology on day 0 correlates with aneuploidy as detected by polar body biopsy and FISH / Andreas G. Schmutzler, Bengi Acar-Perk; Jörg Weimer // Archives of Gynecology and Obstetrics. − 2014. − Vol. 289. − № 2. − P. 445–450.
- 328. Schuffner A. et al. Effect of different incubation conditions on phosphatidylserine externalization and motion parameters of purified fractions of highly motile human spermatozoa / A. Schuffner, M. Morshedi, D. Vaamode // Journal of andrology. − 2002. − Vol. 23. − № 2. − P. 194–201.

- 329. Schuh M. et al. A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes / M. Schuh, J. Ellenberg // Current Biology. 2008. Vol. 18. №24. P. 1986–1992.
- 330. Schwarz C.M. et al. Temperature-induced sperm nuclear vacuolisation is dependent on sperm preparation / C. Schwarz, M. Köster, K. van der Ven // Andrologia. 2012. Vol. 44. Suppl. 1. P. 126–129.
- 331. Segovia Y. et al. Ultrastructural characteristics of human oocytes vitrified before and after in vitro maturation / Yolanda Segovia, Noemí Victory, Irene Peinado // The Journal of reproduction and development. 2017. Vol. 63. № 4. P. 377–382.
- 332. Seli E. et al. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization / E. Seli, D.K. Gardner, W.B. Schoolcraft // Fertility and Sterility. − 2004. − Vol. 82. − № 2. − P. 378–383.
- 333. Seli E. et al. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART / E. Seli, D. Sakkas // Human Reproduction Update. 2005. Vol. 11. № 4. P. 337–349.
- 334. Selvaraj P. et al. Semen preparation techniques in intrauterine insemination: A comparison of non-temperature and temperature controlled centrifugation in cases of unexplained infertility / P. Selvaraj, K. Selvaraj, S. Kalaichelvi // Journal of human reproductive sciences. − 2013. − Vol. 6. − № 4. − P. 241–244.
- 335. Sen Roy S. et al. NF-κB signaling system is required for blastocyst hatching in the golden hamster: Mediated by the expression of hatching-promoting cathepsins / Shubhendu Sen Roy, Polani B. Seshagiri // Journal of Reproductive Health and Medicine. 2016. Vol. 2. P. 74–82.
- 336. Serhal P.F. et al. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection P.F. Serhal, D.M. Ranieri, A. Kinis // Human Reproduction. 1997. Vol. 12. № 6. P. 1267–1270.

- 337. Seshagiri P.B. et al. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching / P.B. Seshagiri, S. Sen Roy, G. Sireesha // Journal of reproductive immunology. 2009. Vol. 83. № 1–2. P. 79–84.
- 338. Severance A.L. et al. Meeting the meiotic challenge: Specializations in mammalian oocyte spindle formation / Ashley L. Severance; Keith E. Latham // Molecular Reproduction and Development. − 2018. − Vol. 85. − №3. − P. 178–187.
- 339. Shoubridge E.A. et al. Mitochondrial DNA and the Mammalian Oocyte / E.A. Shoubridge, T. Wai // Current Topics in Deveopmental biology. 2007. Vol. 77. P. 88–113.
- 340. Silla A.J. et al. Sperm motility activation in the critically endangered booroolong frog: the effect of medium osmolality and phosphodiesterase inhibitors / A.J. Silla, L.M. Keogh, P.G. Byrne // Reproduction, Fertility and Development. 2017. Vol. 29. № 11. P. 2277–2283.
- 341. Sireesha G.V.et al. Role of cathepsins in blastocyst hatching in the golden hamster / G.V. Sireesha, R.W. Mason, M. Hassanein et al. // Molecular human reproduction. 2008. Vol. 14. № 6. P. 337–346.
- 342. Soler C. et al. Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads / C. Soler, F. Petez-Sanchez, H. Schulze // International Journal of Andrology. 2000. Vol. 23. Part. 2. P. 77–84.
- 343. Sousa M. et al. Developmental changes in calcium content of ultrastructurally distinct subcelluar compartments of preimplantation human embryos / M. Sousa, A. Barros, J. Silva // Molecular Human Reproduction. 1997. Vol. 3. № 2. P. 83–90.
- 344. St. John J.S. et al. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: A journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells / J.S. St. John, J. Facucho-Oliveira, Y. Jiang // Human Reproduction Update. − 2010. − Vol. 16. − № 5. − P. 488–509.

- 345. Stetson I. et al. Four glycoproteins are expressed in the cat zona pellucida / I. Stetson, M. Avilés, C. Moros // Theriogenology. 2015. Vol. 83. №7. P. 1162–1173.
- 346. Stricker S.A. Comparative Biology of Calcium Signaling during Fertilization and Egg Activation in Animals / S.A. Stricker // Developmental biology. 1999. Vol. 211. №2. P. 157–176.
- 347. Suarez S.S. et al. Hyperactivated motility in sperm / S.S. Suarez, H.C. Ho // Reproduction in Domestic Animals. 2003. Vol. 38. № 2. P. 119 124.
- 348. Suarez S.S. et al. Sperm transport in the female reproductive tract / S.S. Suarez, A.A. Pacey // Human Reproduction Update. 2006. Vol. 12. № 1. P. 23 37.
- 349. Sun Q.Y. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs / Qing-Yuan Sun // Microscopy Research and Technique. 2003. Vol. 61. № 4. P. 342–348.
- 350. Sun Q.-Y. et al. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization / Q.-Y. Sun, H. Schatten // Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. -2006. Vol. 131. No 2. P. 193–205.
- 351. Sutovsky P. et al. Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance / P. Sutovsky, K. Van Leyen, T. McCauley // Reproductive Biomedicine Online. 2004. Vol. 8. №1. P. 24–33.
- 352. Swain J.E. et al. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization / J.E. Swain, T.B. Pool // Human Reproduction Update. 2008. Vol. 14. № 5. P. 431–446.
- 353. Syrkasheva A.G. et al. Cell and genetic predictors of human blastocyst hatching success in assisted reproduction / A.G. Syrkasheva, N.V.

- Dolgushina, A.Y. Romanov // Zygote. 2017. Vol. 25. №5. P. 631–636.
- 354. Tarozzi N. et al. Anomalies in sperm chromatin packaging: implications for assisted reproduction techniques / N. Tarozzi, M. Nadalini, A. Stronati // Reproductive Biomedicine Online. 2009. Vol. 18. P. 486–95.
- Tasdemir I. et al. Pregnancy after testicular sperm extraction and ICSI with totally immotile spermatozoa lacking dynein arms: a case report / I. Tasdemir, S. Kahraman, M. Tasdemir // Human Reproduction. 1997. Vol. 12. № 6. P. 1214–1217.
- 356. Tavalaee M. et al. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome / M. Tavalaee, S. Razavi, M. Nasr-Esfahani // Fertility and Sterility. 2009. Vol. 91. № 4. P. 1119–1126.
- Teixeira D.M. et al. EP27.02: Ultra-high magnification (IMSI) vs standard sperm selection (ICSI) for assisted reproduction / D.M. Teixeira,
 M. Barbosa, R.A. Ferriani // Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. –
 2017. Vol. 50. P. 384.
- 358. Ten J. et al. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality / J. Ten, J. Mendiola, J. de Juan // Reproductive Biomedicine Online. 2007. Vol. 14. P. 40–48.
- Tesarik J. et al. Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism /
 J. Tesarik, C. Mendoza // Human Reproduction Update. 1997. Vol 3. –
 № 2. P. 95–100.
- Tesarik J. et al. Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential / J. tesarik,
 C. Mendoza // Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1995 Vol. 80. № 4. P. 1438–1443.

- 361. Thijssen A. et al. Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa / A. Thijssen, E. Klerkx, C. Huyser // Reproductive BioMedicine Online. 2014. Vol. 28. № 4. P.436–442.
- 362. Thonneau P. et al. Occupational heat exposure and male fertility: a review / P. Thonneau, L. Bujan, L. Multigner // Human Reproduction. 1998. Vol. 13. № 8. P. 2122–2125.
- 363. Thurin A. et al. Predictors of ongoing implantation in IVF in a good prognosis group of patients / A. Thurin, T. Hardarson, J. Hausken // Human Reproduction. 2005. Vol. 20. № 7. P. 1876–1880.
- 364. Tosti E. et al. Gamete activation: basic knowledge and clinical applications / E. Tosti, Y. Menezo // Human Reproduction Update. 2016 Vol. 22. № 4. P. 420–439.
- 365. Tsai T.S. et al. The molecular characterisation of mitochondrial DNA deficient oocytes using a pig model / Te-Sha Tsai; Sonika Tyagi; Justin C St John // Human Reproduction. 2018. Vol. 33. № 5. P. 942 953.
- 366. Ubaldi F. et al. Morphological selection of gametes / F. Ubaldi, L. Rienzi // Placenta. 2008. Vol. 29. Suppl. B. P. 115–120.
- 367. Van Blerkom J. et al. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos / J. Van Blerkom, P. Davis, V. Mathwig // Human Reproduction. − 2002. − Vol. 17. − № 2. − P. 393–406.
- 368. Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence // Reproduction. 2004. № 128. P.269–280.
- 369. Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence // Mitochondrion. 2011. Vol. 11. №5. P. 797–813.
- 370. Van Blerkom J. et al. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo

- transfer / J. Van Blerkom, P. Davis, J. Lee // Human Reproduction. 1995. Vol. 10. P. 415–424.
- 371. Van Blerkom J. et al. Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization and preimplantation embryogenesis in vitro / J. Van Blerkom, H. Bell, D. Wepz // Jornal of electron microscopy technique. − 1990. − Vol. 16. − № 4. − P. 298–323.
- 372. Van Den Bergh M. et al. Pronuclear zygote score following intracytoplasmic injection of hyaluronan-bound spermatozoa: a prospective randomized study / M. Van Den Bergh, M. Fahy-Deshe, M.K. Hohl // Reproductive BioMedicine Online. 2009. Vol. 19. № 6. P. 796–801.
- 373. Van Steirteghem A.C. et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection / A.C. Van Steirteghem, Z. Nagy, H. Joris // Human Reproduction. 1999. Vol. 8. № 7. P. 1061–1066.
- 374. Veeck L.L. Oocyte assessment and biological performance / L.L. Veeck // Annals of the New York Academy of Sciences. 1988. Vol. 541. P. 259–274.
- 375. Veeck Gosden L. L. Atlas of the human oocyte and early conceptus / L. L. Veeck. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. 2 volumes.
- 376. Veeck Gosden, L. L. Techniques for Slow Cryopreservation of Embryos // Methods in molecular biology Clift on then Totowa. 2014. № 1154. P. 407–438.
- 377. Verheyen G. et al. Processing and selection of surgically-retrieved sperm for ICSI: a review / Greta Verheyen, Biljana Popovic-Todorovic, Herman Tournaye // Basic and Clinical Andrology. − 2017. − Vol. 27. − №1. − P. 10–12.
- 378. Verlhac M.-H. et al. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos / M.-H. Verlhac, C. Lefebvre, P. Guillaud // Current biology. 2000. Vol. 10. № 20. P. 1303–1306.
- 379. Virant-Klun I. et al. Human oocyte maturation in vitro is improved by co-culture with cumulus cells from mature oocytes / I. Virant-Klun, C.

- Bauer, A. Stahlberg // Reproductive biomedicine online. 2018. Vol. 36. №5. P. 508–523.
- 380. Virro M.R. et al. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles / M.R. Virro, K.L. Larson-Cook, D.P. Evenson // Fertility and Sterility. − 2004. − Vol. 81. − № 5. − P. 1289–1295.
- 381. Volarcik L. et al. The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: Evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary / L. Volarcik, J. Cheean, L. Goldfarb // Human Reproduction. − 1998. − Vol. 13. − № 1. − P. 154–160.
- 382. Von Horstein H.H. et al. Novel antimicrobial peptide of human epididymal duct origin / H.H. von Horstein, P. Derr, C. Kirchhoff // Biology of reproduction. 2002. Vol. 67. №3. P. 804–813.
- 383. Wai T. et al. The role of mitichondrial DNA copy number in mammalian fertility / T. Wai, E.A. Shoubridge, A. Ao // Biology of Reproduction. 2010. Vol. 83. № 1. P. 52–62.
- 384. Wakai T. et al. Ca2+ homeostasis and regulation of ER Ca2+ in mammalian oocytes/eggs / Takuya Wakai, Rafael A. Fissore // Cell Calcium. 2013. Vol. 53. № 1. P. 63–67.
- 385. Wallbutton S. et al. Vacuolated oocytes: fertilization and embryonic arrest following intra-cytoplasmic sperm injection in a patient exhibiting persistent oocyte macro vacuolization: Case report / S. Wallbutton, J. Kasraie // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. − 2010. − Vol 27. − № 4. − P. 183–188.
- 386. Wang E.-H. et al. Outcomes of vitrified-warmed cleavage-stage embryo hatching after in vitro laser-assisted zona pellucida thinning in patients / En-Hua Wang, An-Coang-Wang, Bao-Song-Wang // Biomedical Reports. − 2016. − Vol. 5. − № 3. − P. 376–382.

- 387. Weber K.L. et al. A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly / Kari L. Weber, Anna M. Sokac, Jonathan S. Berg // Nature. 2004. Vol. 431. №7006. P. 325–329.
- 388. Wei Y. et al. Generation of trophoblast-like cells from the amnion in vitro: A novel cellular model for trophoblast development / Y. Wei, X. Zhou, W. Huang // Placenta. 2017. Vol. 51. P. 28–37.
- 389. Whitaker M. Calcium at Fertilization and in Early Development / M. Whitaker // Physiological Reviews. 2006. Vol. 86. №1. P. 25–88.
- 390. Yi K. et al. Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes / K. Yi, J.R. Unruh, B.D. Slaughter // Nature Cell Biology. − 2011. − Vol. 13. − №10. − P. 1252–1258.
- 391. Yu Y. et al. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation / Y.Yu, R. Dummollard, A. Rossbach // Journal of cellular physiology. − 2010. − Vol. 224. − № 3. − P. 672.
- 392. Zhang Ch.-H. et al. GM130, a cis-Golgi protein, regulates meiotic spindle assembly and asymmetric division in mouse oocyte / Chun-Hui Zhang, Zhen-Bo Wang, Song Quan // Cell cycle. 2011. Vol. 10. №11. P. 1861–1870.
- 393. Zhang Sh.L. et al. STIM1 is a Ca2+ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca2+ store to the plasma membrane / Shenyuan L.Zhang, Ying Yu, Jack Roos // Nature. 2005. Vol. 437. №7060. P. 902–905.