

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва
2019

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения России.

Научный консультант:

Главный научный сотрудник Федерального государственного научного учреждения «Медико-генетический научный центр», доктор биологических наук, профессор **Курило Любовь Федоровна**

Официальные оппоненты:

Заведующая лабораторией биологических проблем репродукции животных Федерального научного центра животноводства - ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, доктор биологических наук **Лебедева Ирина Юрьевна**

Профессор кафедры гистологии и эмбриологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук **Шурыгина Оксана Викторовна**

Заведующий лабораторией функциональной гистохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской Академии наук, доктор биологических наук, профессор **Погорелов Александр Григорьевич**

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» (199034, Санкт-Петербург, Менделеева линия, д.3).

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 г. на заседании диссертационного совета Д 001.004.01 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://morfolhum.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета, доктор
медицинских наук**

Л.П. Михайлова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

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]. С 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 [Balaban et al., 2006; Ebner et al., 2006; Курило, 2012; Sakurai et al., 2017; Richiani et al., 2018; Сыркашева, 2018].

Наблюдаемые при культивировании *in vitro* типы аномалий постовуляторных ооцитов можно условно разделить на две группы: экстрацитоплазматические и цитоплазматические [Rienzi et al., 2017]. К 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 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 из-за 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 о 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 [Bosch et al., 2016; Краснопольская и др., 2017; Sanchez et al., 2017; Назаренко, 2018]. В экспериментальных работах на моделях животных показаны ультраструктурные особенности ооцитов разных стадий развития, их микроокружения – клетки кумулюса, тека-клетки, *corona radiata*, в зависимости от нарушений гормонального статуса. При этом в публикациях отсутствуют сведения о влиянии цитофизиологических и молекулярно-биологических изменений женских половых клеток на развитие эмбриона, на особенности его дробления и формирование бластоцисты, а также на его высвобождение из блестящей оболочки [Лебедева и др., 2010; Gilchrist et al., 2016; Zhang et al., 2017].

Цель исследования

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

Задачи исследования

Для успешного решения поставленной цели были определены следующие задачи:

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 цитоплазматическими 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 молекулярно-биологических 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 является максимально эффективной 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 гаметам 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 развитии эмбрионов человека, полученными генетическими и 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 этических-правовых 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 «Амбулаторно-поликлиническая 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 методов преимплантационного генетического скрининга для повышения частоты имплантации бластоцисты и рождения генетически здорового ребенка.
4. Гранулярность цитоплазмы является наиболее тяжелым морфологическим повреждением ооцита человека. Она связана со снижением числа копий мтДНК и нарушениями в ультраструктурной организации ооцита, что приводит к снижению частоты оплодотворения и появлению эмбрионов с генетическими 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2. Материалы и методы исследования

2.1 Сбор образцов и культивирование эмбрионов человека

Изучение различных форм патологии постовуляторных женских половых клеток были проведены в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения на базе Отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ. Использование в научных исследованиях половых клеток и эмбрионов человека было разрешено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ (протокол №13 от 10.12.15; протокол №10 от 20.10.2016). Ооцит-кумулюсные комплексы идентифицировали под контролем стереомикроскопа (Nikon, Япония) в фолликулярной жидкости и забирали стерильной микропипеткой. Всего было проанализировано 6134 ооцит-кумулюсных комплекса, которые отмывали от фолликулярной жидкости и крови в буферном растворе с HEPES (Gamete Buffer, COOK, Ирландия). Подсчитывали число ооцитов и помещали в 4-х луночные планшеты с бикарбонатной культуральной средой (Fertilization, COOK, Ирландия) для периода предварительной инкубации в течение 2-3 часов в условиях 6%CO₂, 5% O₂ и температуры 37,0°C. 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 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 I); фактически, в данную группу попадают женские 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 проводили по критериям, представленным на рисунке 1. Проанализировано 5137 зрелых постовуляторных ооцитов человека на стадии М II.

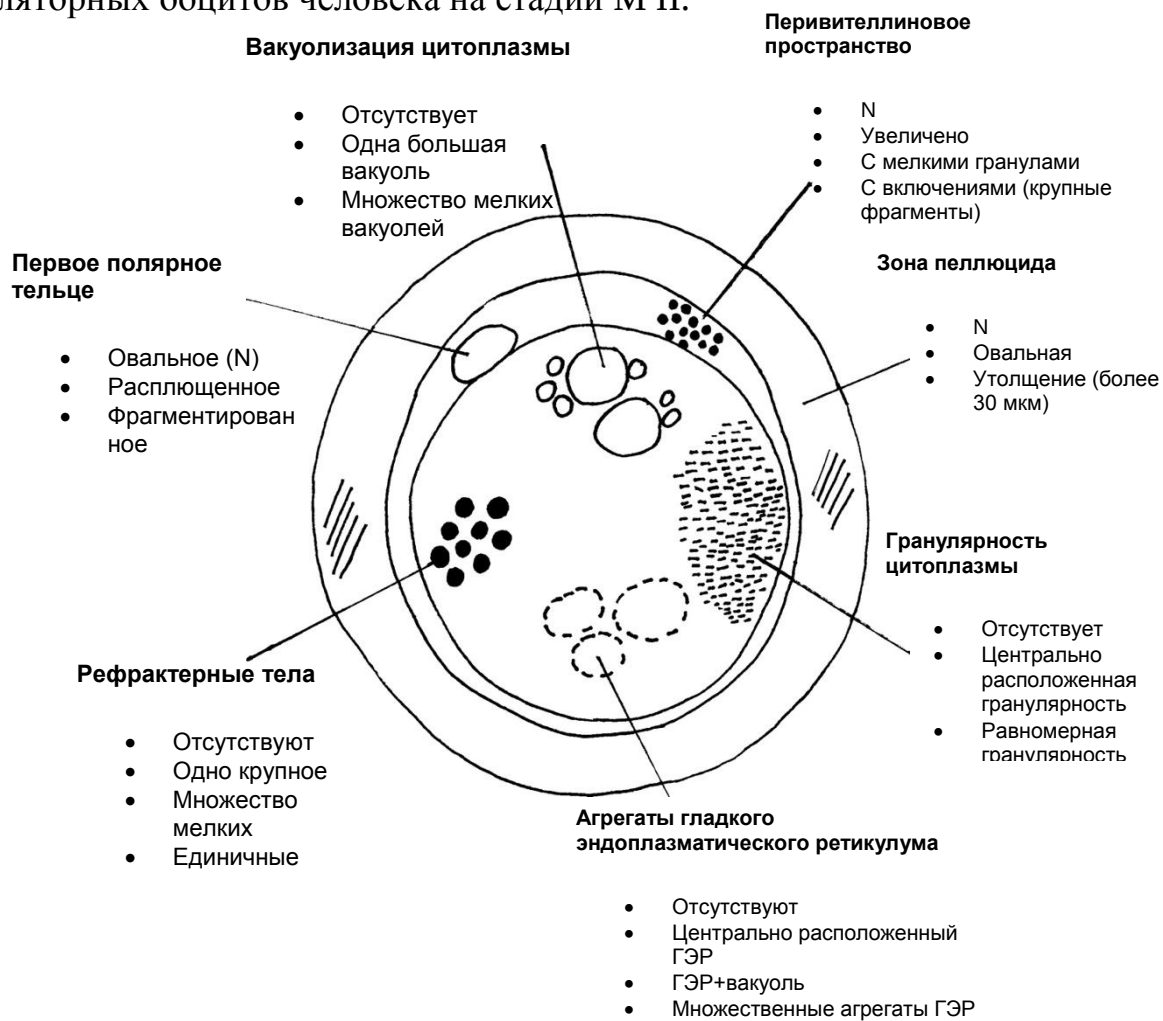


Рисунок 1. Морфологические особенности постовуляторных ооцитов человека (систематизация литературных и собственных данных).

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» МЗ РФ. Морфологическую оценку дробящихся эмбрионов проводили через 72 ч. после оплодотворения ооцитов. Оценивали количество имеющихся бластомеров, симметричность дробления, фрагментацию. На основании морфологических характеристик дробящиеся эмбрионы человека классифицировали на 4 группы (согласно классификации Европейской ассоциации репродукции 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: А — эмбрион отличного качества без ануклеарных (безъядерных) фрагментов; В — эмбрион хорошего качества с содержанием ануклеарных фрагментов до 20%; С — эмбрион удовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов от 21% до 50%; D — эмбрион неудовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов более 50%, остановка дробления.

Бластоцисты 5-6-х суток культивирования оценивали по международной классификации [Gardner et al., 1999]. Проводили оценку степени расширения (экспансии) 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) экспандированная бластоциста, объем полости больше, чем размер ранних эмбрионов, а блестящая оболочка истончена; (5) бластоциста, трофэктодерма которой начала выходить через блестящую оболочку; (6) бластоциста, полностью вышедшая из блестящей оболочки. **Оценка внутриклеточной массы:** А – плотно упакованная, много клеток. В – неплотно сгруппированная, немного клеток; С – единичные клетки. **Оценка трофэктодермы:** А – много клеток формируют компактное скопление эпителия; В – немногочисленные клетки образуют неплотный эпителий; С – единичные клетки.

2.2 Изучение числа копий митохондриальной ДНК в ооцитах с различными морфологическими нарушениями

Подсчет количества мтДНК в ооцитах проводили в лаборатории цитологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ. Ооциты, не оплодотворившиеся после проведения ИКСИ, в которых не наблюдали признаки дробления через 40 ч. после оплодотворения, отбирали для исследования числа копий мтДНК. В асептических условиях с

использованием стереомикроскопа (Nikon, Япония) ооциты отмывали в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS), а затем помещали в индивидуальные пробирки.

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) (10мМ EDTA, 1% SDS, 50мМ Tris-HCl, pH 7,5) в течение 5 минут. После этого осуществляли осаждение ДНК изопропанолом в присутствии дрожжевой тРНК (Yeast tRNA, Ambion) в качестве со-осадителя 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: CCACATCTACCATCACCTC; 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 (М-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, соответствующем флуорохрому зонда (R6G). Полученные 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» МЗ РФ. Процедура выполнения преимплантационного генетического скрининга состояла из трех этапов: биопсия бластомера, фиксация исследуемых клеток на предметном стекле, а затем молекулярно-цитогенетическая диагностика единичных клеток.

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 COOK (Австралия). Подготовку ядра для гибридизации *in situ* выполняли согласно протоколу, рекомендуемому фирмой-производителем. Выделение ядра из бластомера проходило с использованием 10 мкл гипотонического раствора, помещенного на предметное стекло. 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 этапов согласно инструкции [Долгушина Н.В. и др, 2015].

2.4 Электронно-микроскопическое исследование ооцитов

Электронно-микроскопический анализ ооцитов выполняли на базе Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН (руководитель лаборатории Поляков В.Ю.). Отобранные ооциты фиксировали при температуре +4°C в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (pH=7,2) с добавлением 1,5% сахарозы. После отмывки от фиксирующей смеси материал дофиксировали 1,0% раствором четырёхокси 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 сетки, после чего контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу (использована классическая методика, описанная ранее; Shafei et al., 2012). 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) как описано ранее (Ибрагимова Э. и др., 2018). Выделение РНК проводили с использованием реактивов ДНК-Технология (Россия) по описанной в инструкции методике. Последовательность прямых и обратных праймеров для ПЦР были подобраны в программе Oligo6 с учетом структуры генов. Синтез комплементарной ДНК осуществляли обратной транскриптазой AMV по методике производителя (ДНК-Технология, Россия). В качестве матрицы использовали 70 пг выделенной РНК. Пробы инкубировали 30 мин при температуре 40°C с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C. В процессе реакции по матрице РНК синтезировалась комплементарная ДНК. Пробы хранили в морозильник при температуре -20°C. Реакцию амплификации (гены CTSL2, GATA3, CGB, HLAG, B2M) в

режиме реального времени проводили в объеме 12 мкл на детектирующем амплификаторе ДТ-38. Режим: 80°C-5с, 94°C-15 с, 64°C -16с, 30-45 циклов. Реакцию проводили на детектирующем амплификаторе ДТ-96 НК. Для расчета уровня экспрессии использовали значения пороговых циклов (Cp/Ct). Обработку результатов РТ-ПЦР проводили по формуле: $E=e^{-\Delta\Delta C_t}$ (где E – изменение содержания исследуемой мРНК, C_t – пороговый цикл, e=эффективность реакции РТ-ПЦР). Эффективность реакции РТ-ПЦР рассчитывали отдельно для каждой пары праймеров. Экспрессию соответствующих генов выражали в единицах, нормированных на экспрессию B2M (микроглобулин бета-2, компонент лёгкой цепи главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС I), представленный на всех ядросодержащих клетках организма человека, кроме эритроцитов). Специфичность реакции оценивали при помощи построения кривой 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 χ^2 , для вычисления которого прибегали к построению таблиц сопряженности, а также точный критерий Фишера для небольших выборок. Перед 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 в группах применяли методы 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 $p<0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

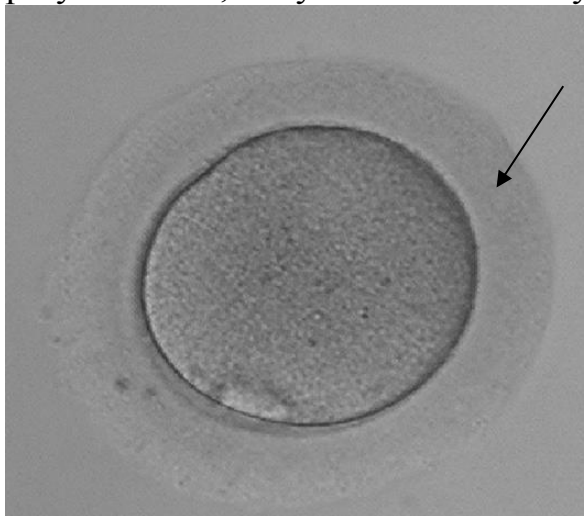
Для анализа частоты встречаемости различных форм патологии ооцитов и параметров раннего эмбрионального развития было проведено проспективное когортное исследование. Частоту оплодотворения ооцитов рассчитывали как число зигот к числу зрелых ооцитов МII, которые подвергали оплодотворению. Долю эмбрионов 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 проанализировано 6134 ооцит-кумулюсных комплекса (ОКК). 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 структуры 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 1. Экстрацитоплазматические и цитоплазматические морфологические нарушения женских половых клеток представлены на микрофотографиях (рисунок 2).

Таблица 1. Частота выявления различных форм патологии морфологии женских половых клеток

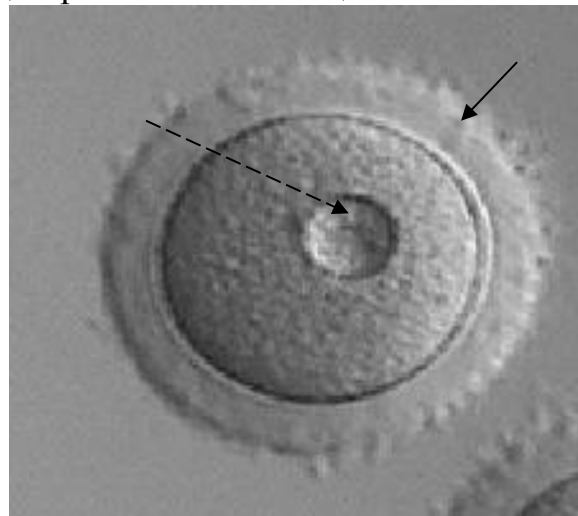
Выявленные формы патологии женских половых клеток	n	%
Нормальная морфология	1472	28,7%
Цитоплазматические аномалии	1324	25,8%
Экстрацитоплазматические аномалии	2111	41,1%
Сочетанная патология	230	4,5%
Всего	5137	100%

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%) — истончена блестящая оболочка. Структура патологии экстрацитоплазматических структур указана в таблице 2. 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 [Balaban et al., 2006; Ebner et al., 2012]. Результаты этих исследований не совпадают с результатами, полученными на популяции российских женщин.



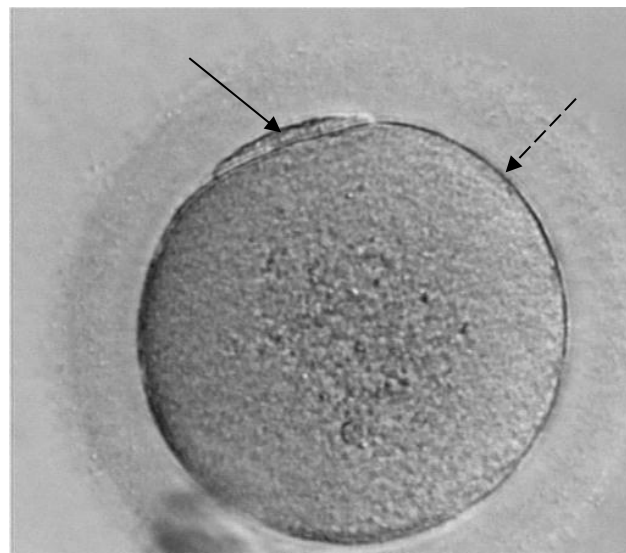
2.1. Нарушение структуры зоны пеллюцида зрелого ооцита. Стрелкой показана блестящая оболочка, имеющая слоистую структуру, не характерную для нормальной пористой структуры зоны пеллюцида. Относительный размер (толщина) оболочки увеличен. Цитоплазма ооцита мелкозернистая, перивителлиновое пространство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



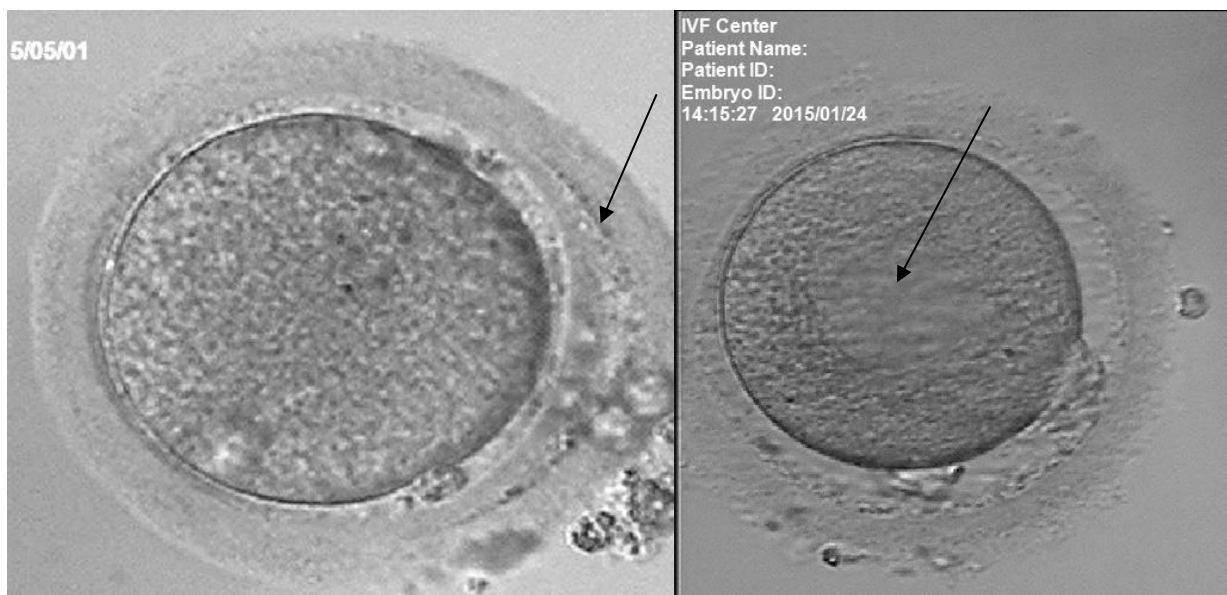
2.2. Нарушение структуры зоны пеллюцида ооцитов (стрелка), блестящая оболочка представляет собой неоднородные выросты. В центральной части цитоплазмы одного из ооцитов видна вакуоль больших размеров, составляющая по диаметру четверть диаметра ооцита (пунктирная стрелка), что согласно полученным в настоящей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



2.3. Резко увеличенное полярное тельце ооцита, после оплодотворения пронуклеусы в цитоплазме ооцита отсутствуют. Ув.450

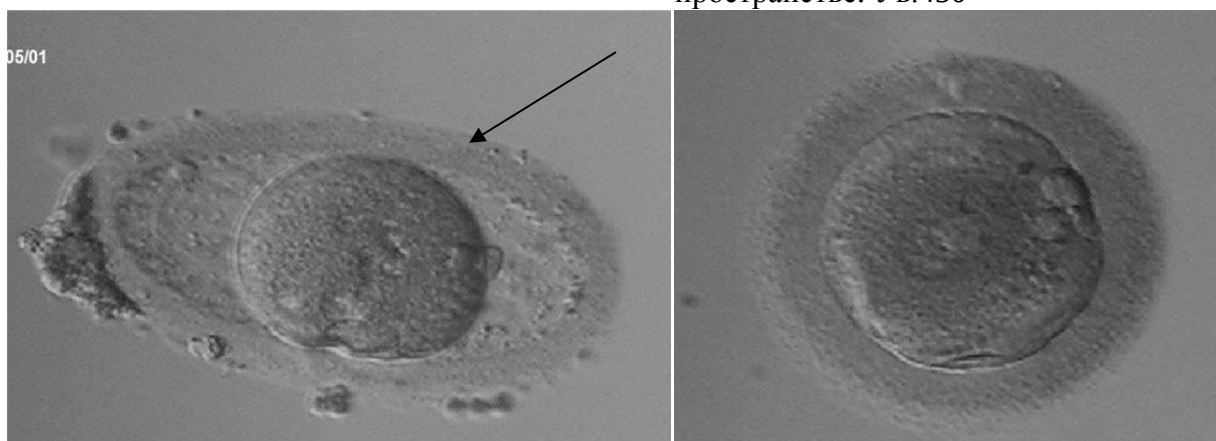


2.4. «Расплющенное» первое полярное тельце (незрелое) ооцит человека, отсутствие перивителлинового пространства (пунктирная стрелка). Ув.450.



2.5. Нарушение структуры зоны пеллюцида (стрелка), дебрис в перивителлиновом пространстве. Ув.500

2.6. Появление агрегатов ГЭР (стрелка) в цитоплазме ооцита, дебрис в перивителлиновом пространстве (ооцит после инъекции), отсутствие смыкания оолеммы, цитоплазматическое содержимое оказывается в перивителлиновом пространстве. Ув.450

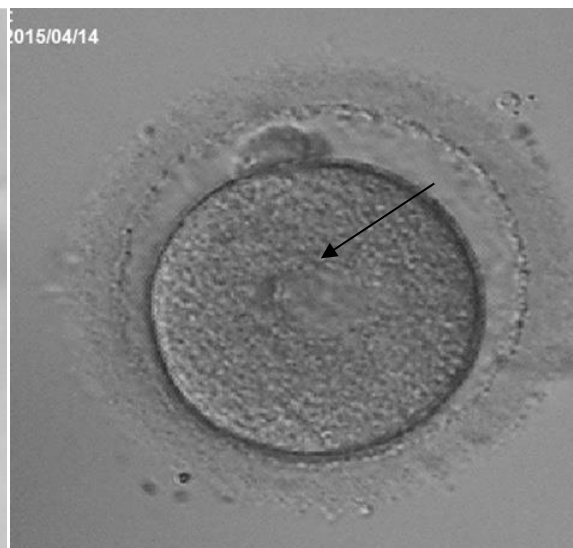


2.7. Нарушение формы (овальная) зоны пеллюцида ооцита. Ув.300

2.8. Изменение цвета зоны пеллюцида (темная) зиготы. Ув.400



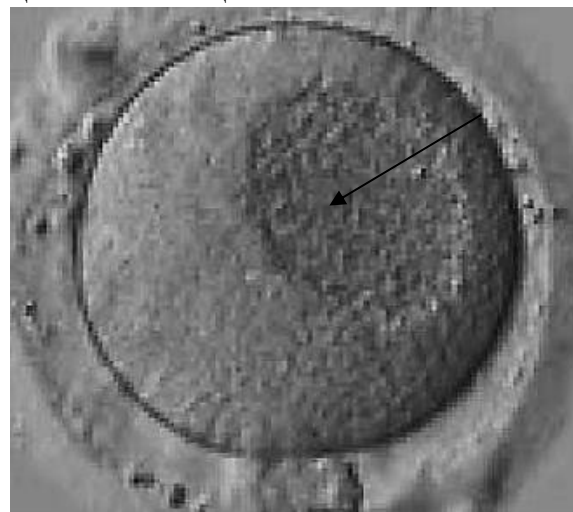
2.9. Нарушение структуры зоны пеллюцида (деформация). Ув.400



2.10 Появление агрегатов ГЭР в цитоплазме ооцита. Ув.400



2.11. Появление рефрактерного тела в цитоплазме зрелого ооцита. Ув.400



2.12. Гранулярность цитоплазмы ооцита (стрелка). Ув.550

Рисунок 2. Микрофотографии морфологических особенностей зрелых ооцитов человека

Таблица 2. Частота выявления различных форм патологии экстрацитоплазматических структур ооцита

Выявленная морфология ооцита	п	%
Дебрис в перивителлиновом пространстве	1220	57,8%
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 3).

Таблица 3. Частота выявления различных форм патологии цитоплазмы ооцита

Выявленная морфология ооцита	n	%
Вакуолизация цитоплазмы	158	11,9%
Центрально выраженная гранулярность	341	25,8%
Агрегаты гладкого эндоплазматического ретикулума	199	15,0%
Рефрактерные тельца	626	47,3%

Частота нормального оплодотворения ооцитов существенно различалась между группами (таблица 4). В группе морфологически нормальных ооцитов частота формирования зигот 2PN2PB (2 пронуклеуса и 2 полярных тельца) 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% женских половых 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 4. Показатели нормального оплодотворения (2PN2PB) ооцитов с различной морфологией

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

* p-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 5). Проведенный анализ параметров оплодотворения показал, что ооциты с нарушениями цитоплазмы имеют самую низкую частоту нормального оплодотворения.

Таблица 5. Показатели различных типов нарушения оплодотворения ооцитов в сравниваемых группах

Группа	1PN, 3PN и более	p^*	Дегенерация	p^*	OPN	p^*
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%)	$p<0,01$
Экстрацитоплазматические аномалии ооцитов	28 (1,3%)	НД	13 (6,3%)	0,001	140 (6,6%)	$p<0,01$

* p -уровень для сравнения двух групп согласно критерию Хи-квадрат с поправкой Йейтса; НД – данные статистически недостоверны.

Был проведен анализ параметров оплодотворения внутри данной группы. 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 (рисунок 3).

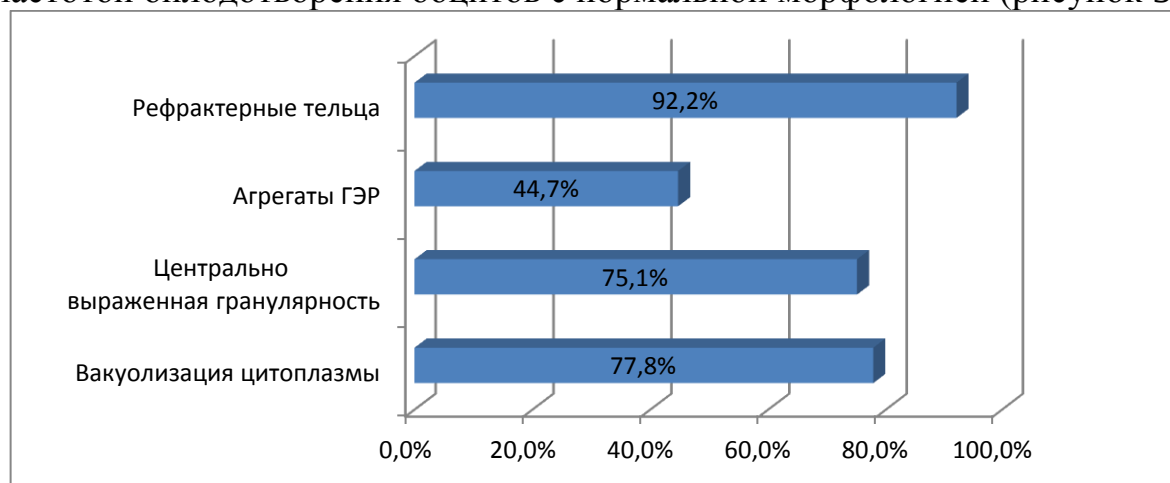


Рисунок 3. Частота нормального оплодотворения внутри группы ооцитов с различными типами нарушений морфологии цитоплазмы

Для поиска причин крайне низкой частоты оплодотворения ооцитов с агрегатами ГЭР в цитоплазме был проведен анализ техники интрацитоплазматической инъекции сперматозоида. Обычно при дегенерации ооцита с агрегатами ГЭР в цитоплазме происходит лизис цитоплазмы, оолема не смыкается, внутриклеточное содержимое оказывается в перивителлиновом пространстве. Согласно классической процедуре выполнения интрацитоплазматической инъекции, описанной в литературе, сперматозоид следует «оставлять» в центральной части цитоплазмы. Однако в ооцитах с агрегатами ГЭР оплодотворение именно в центральной части часто приводило к дегенерации женской клетки.

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 6. 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 малой выборки.

Таблица 6. Показатели частоты оплодотворения ооцитов с агрегатами гладкого эндоплазматического ретикулума классической и модифицированной методикой ИКСИ

Ооциты с агрегатами ГЭР	n	2PN 2PB	%	1,3PN и более	%	Дегенерация	%	OP N	%
Классическая тактика ИКСИ	40	16	40,0%	5	12,5%	16	40,0%	3	7,5%
Оплодотворение в неповрежденной части цитоплазмы	37	25	67,6%	3	8,1%	5	13,5%	4	10,8%
p*			0,1		0,2		0,04		0,6

* p-уровень для сравнения двух групп согласно критерию Хи-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 8. 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.

Таблица 7. 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%

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 (А, В и С) на 3-и сутки культивирования, а также доли эмбрионов, остановившихся в развитии на раннем этапе культивирования. Результаты показаны в таблице 8. Эмбрионов класса А было получено 268 (46,6%) в группе цитоплазматическими аномалиями, 219 (52,6%) в группе экстрацитоплазматических и 365 (65,7%) в группе морфологически нормальных ооцитов ($p < 0,001$). Соответственно по группам было получено 214 (37,2%), 150 (36,1%) и 152 (27,3%) эмбрионов класса В ($p < 0,001$); 66 (11,5%), 43 (10,3%) и 29 (5,2%) эмбрионов класса С ($p < 0,001$).

Таблица 8. Характеристика ранних дробящихся эмбрионов при различных морфологических особенностях ооцитов

	n	A	%	B	%	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%
Экстрацитоплазматические аномалии ооцитов	416	219	52,6%	150	36,1%	43	10,3%	4	1,0%
p^*		$p < 0,001$							

* p -уровень для сравнения групп согласно критерию Хи-квадрат с поправкой Йейтса

Остановка дробления в первые 72 часа 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 4). 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. Анализ эмбриологического этапа при различных типах 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.

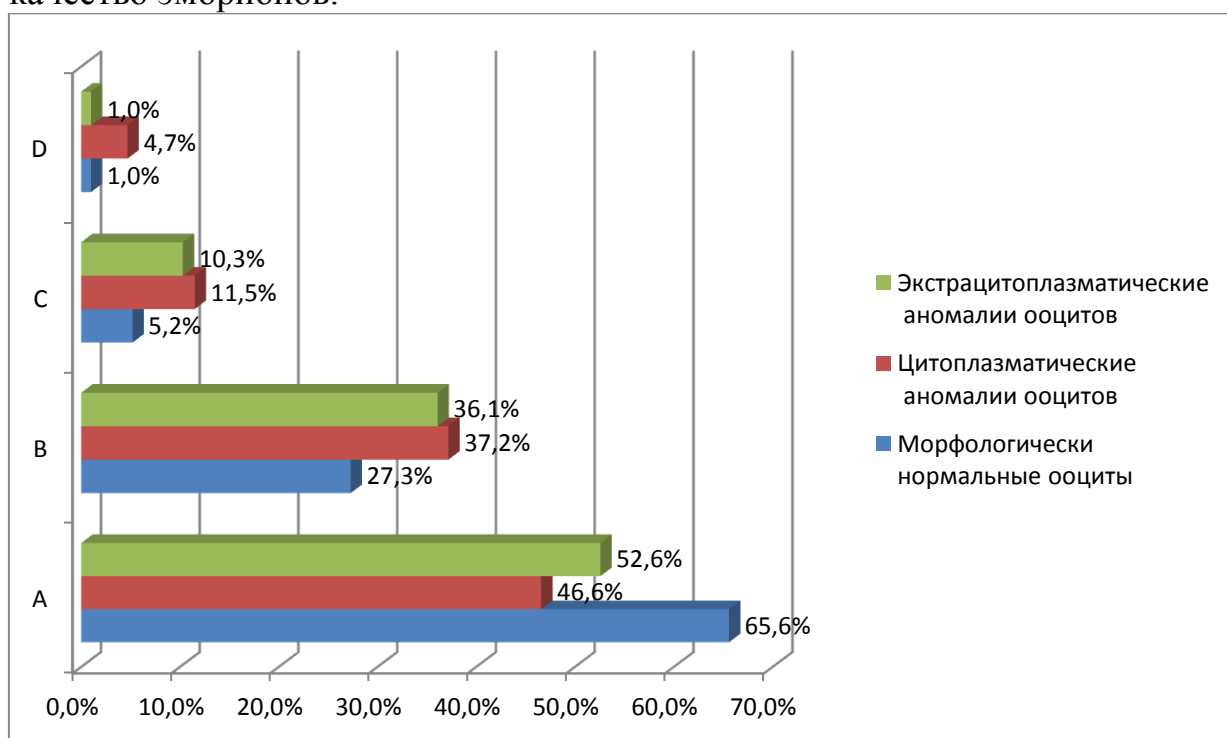


Рисунок 4. Характеристика ранних преимплантационных эмбрионов в группах сравнения. Эмбрионы классов A, B, C, и D

Полученные данные о параметрах оплодотворения и раннего эмбриогенеза в сравниваемых группах согласуются с данными зарубежных исследователей [Rienzi L et al., 2017]. Первичная морфологическая оценка ооцитов до оплодотворения является важным этапом, прогнозирующим развитие эмбриона человека в условиях *in vitro*. Особенно это касается ооцитов с цитоплазматическими типами нарушений, которые имели

значительно более низкую частоту оплодотворения и низкое качество полученных эмбрионов. Также именно в этой группе было больше всего эмбрионов, прекративших деление на ранних этапах культивирования.

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 типами морфологических аномалий. Для выяснения причин низкой частоты оплодотворения и низкого качества эмбрионов при видимых изменениях структур женских половых клеток был выполнен второй этап. Для обоснования полученных результатов была выдвинута гипотеза о нарушении митохондрий в ооцитах с видимыми морфологическими аномалиями как причины неполного созревания клетки. Для проверки гипотезы отобрали 343 ооцита, не оплодотворившихся в программах экстракорпорального оплодотворения. Ооциты с цитоплазматическими аномалиями составили группу ЦП (n=126), с экстрацитоплазматическими — группу ЭЦП (n=108), ооциты с нормальной морфологией — группу N (n=109). Структура цитоплазматических и экстрацитоплазматических форм патологии изученных ооцитов представлена на таблице 9. 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.

Таблица 9. Частота встречаемости различных типов аномалий ооцитов в изучаемых группах

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

В группе ЦП медиана мтДНК с интерквартильным размахом составила 1'300'000 (263'500 – 2'325'000) копий, в группе эЦП – 2'000'000 (1'350'000 – 4'150'000) копий, в группе N – 2'500'000 (1'400'000 – 4'000'000) копий ($p < 0,0001$). Распределение числа копий мтДНК ооцитов в группе ЦП статистически значимо отличалось от группы эЦП и группы N ($p < 0,0001$), при этом значимых различий между группами эЦП и N не было. Среди ооцитов с цитоплазматическими аномалиями минимальное число копий было выявлено у ооцитов с агрегатами ГЭР (медиана=505'000, диапазон=105'000–1'600'000 копий), максимальное – у ооцитов с рефрактерными тельцами (медиана=2'350'000, диапазон=1'600'000–3'300'000 копий) (таблица 10). Среди ооцитов с эЦП достоверно значимой разницы в числе копий мтДНК у ооцитов разной морфологии выявлено не было ($p=0,1211$).

Таблица 10. Число копий мтДНК в ооцитах с различными типами цитоплазматических аномалий

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

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. Экспериментальную группу составили эмбрионы, полученные из ооцитов с аномалиями: группу ЦП — с цитоплазматическими нарушениями ооцитов, группу эЦП — с экстрацитоплазматическими, группу N — эмбрионы из ооцитов нормальной морфологии. В результате 84 циклов ЭКО было получено 643 ооцит-кумулюсных комплекса (ОКК). В группе эЦП было получено 220 ОКК, ЦП — в группе N было получено 242 ОКК ($p=0,1833$). 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%)). Всего в

изученных группах было получено 529 эмбрионов: 140 в группе ЦП, 173 в группе эЦП и 216 в группе N (таблица 11).

Таблица 11. Морфологическая характеристика эмбрионов человека на стадии дробления на 3 сутки культивирования в группах сравнения

Параметры эмбриогенеза	Группа ЦП	Группа эЦП	Группа N
Число полученных эмбрионов	140	173	216
Число эмбрионов хорошего качества (суммарно А и В)	124 (88,6%)	148 (85,6%)	190 (88,0%)
Число эмбрионов плохого качества (суммарно С и D)	16 (11,4%)	25 (14,4%)	26 (12,0%)

После проведения морфологической оценки всем эмбрионам, имеющим более 6 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). В результате проведенного цитогенетического анализа бластомеров было показано, что максимальное число эмбрионов с анеупloidией 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 анеупloidных эмбрионов по группам ооцитов показано в таблице 12.

Кроме того, было 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%). Рассчитанное отношение шансов (ОШ) получения эмбрионов с анеупloidией при наличии каких-либо морфологических нарушений ооцитов составило 1,7 (95% ДИ=1,05; 2,7). ОШ получения эмбрионов с анеупloidией при наличии цитоплазматических аномалий по сравнению с нормальными ооцитами составило 3,6 (95% ДИ=1,8; 7,2). ОШ получения эмбрионов с анеупloidией при наличии экстрацитоплазматических нарушений по сравнению с нормальными ооцитами составило 1,3 (95% ДИ=0,7; 2,1). Среди ооцитов с ЦП было 62 ооцитов с центральной гранулярностью, 4 ооцита с вакуолями, 23 ооцита с агрегатами ГЭР, 9 ооцитов с рефрактерными тельцами. Среди ооцитов с экстрацитоплазматическими аномалиями было 59 ооцитов с дебрисом в перивителлиновом пространстве, 48 ооцитов имели расширенное перивителлиновое пространство и 29 ооцитов с утолщением зоны пеллюцида. Число анеупloidных эмбрионов, полученных из ооцитов с различными типами морфологических нарушений, представлено в таблице 13.

Таблица 12. Характеристика генетического статуса эмбрионов в группах сравнения

Морфологические особенности изучаемых ооцитов	Эмбрионы с анеуплоидией		Эуплоидные эмбрионы		Проанализировано эмбрионов
	п	%	п	%	
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 Хи-квадрат с поправкой Йейтса, $p < 0,001$

Таблица 13. Доля эмбрионов с анеуплоидией, полученных из ооцитов с различными типами морфологически нарушений по сравнению с морфологически нормальными ооцитами

Морфологические особенности изучаемых ооцитов		Всего	Эмбрионы с анеуплоидией		Эуплоидные эмбрионы		<i>p</i> *
			п	%	п	%	
Цитоплазматические аномалии ооцитов	Центрально выраженная гранулярность	62	43	69,4%	19	30,6%	<0,001
	Вакуолизация цитоплазмы	4	4	100%	0	0,0%	<0,001
	Агрегаты ГЭР	23	15	65,2%	8	34,8%	<0,01
	Рефрактерные тельца	9	5	55,6%	4	44,4%	НД
Экстрацитоплазматические аномалии ооцитов	Дебрис в перивителлиновом пространстве	59	27	45,8%	32	54,2%	<0,05
	Увеличенное перивителлиновое пространство	48	5	31,3%	33	68,8%	НД
	Утолщение зоны пеллюцида	29	7	24,1%	22	75,9%	НД
Морфологически нормальные ооциты		144	45	31,3%	99	68,8%	референс

* *p*-уровень для сравнения групп согласно критерию Хи-квадрат с поправкой Йейтса, $p < 0,001$. Сравнение проводили с группой эмбрионов, полученных из морфологически нормальных ооцитов; НД – данные статистически недостоверны.

Максимальную долю эмбрионов с анеуплоидией наблюдали у эмбрионов, полученных из ооцитов с вакуолями (100%), с центральной выраженной гранулярностью (69,4%) и агрегатами ГЭР (65,2%). Учитывая малое количество наблюдений ооцитов с вакуолями, данные нельзя считать достоверными. Таким образом, максимальное число эмбрионов с анеуплоидией было получено из ооцитов с агрегатами ГЭР и центральной гранулярностью.

Полученные данные о частоте анеуплоидии в ядрах бластомеров эмбрионов на стадии деления дробления согласуются с исследованием 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 высокую частоту анеуплоидии [Kahraman et al., 2000; Schmultzer et al., 2014]. Однако настоящее исследование выявило риск анеуплоидии и при других морфологических изменениях цитоплазмы ооцитов, в частности при появлении агрегатов ГЭР. Таким образом, ооциты с морфологическими аномалиями, в первую очередь с цитоплазматическими, составляют группу риска по развитию эмбрионов с анеуплоидиями. Основываясь на полученных 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.

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. Предположили, что гранулярность является таким внутриклеточным поражением, которое приводит к нарушению расхождения хромосом при делении клеток эмбриона. Проанализировали 7 постовуляторных ооцитов одной женщины. При трансвагинальной пункции фолликулов получено 19 ооцитов, из которых 10 находились на стадии М II, 7 — М I, 2 — зародышевого пузырька. Все полученные ооциты при их оценке на световом уровне (x100) после очищения от клеток кумулюса с помощью энзимной денудации (гиалуронидаза, COOK, Ирландия) имели выраженную центральную гранулярность. Было проведено электронно-микроскопическое изучение ооцитов, которое выявило деструктивные изменения цитоплазматических компонентов в области гранулярности:

кластеризация органелл, набухание цистерн ГЭР, исчезновение митохондрий и их вакуолизацию (рисунок 5).

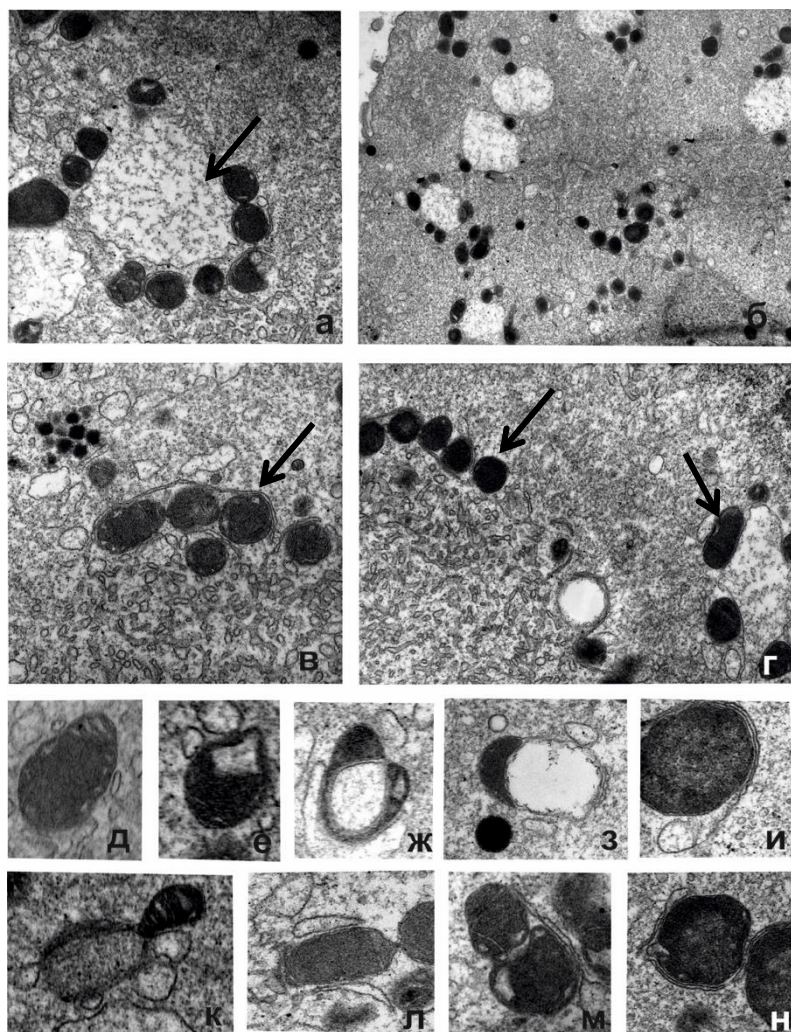


Рисунок 5. Электронно-микроскопическое исследование ооцитов с выявленной грубозернистой деструкцией цитоплазмы. а— комплекс ГЭР + митохондрии внутри цитоплазмы ооцита; б — общий вид гранулярности цитоплазмы с немногочисленными комплексами ГЭР; в,з— митохондрии с темным матриксом; д-н— митохондрии, окружающие ГЭР. Виден просветленный матрикс или сильно разряженная область внутри органелл, кристы митохондрий не обнаруживаются. Ув. 20000 — а,в,г; 10600 — б; 60000 — д-н).

В кортикальной области на электронно-микроскопических микрофотографиях ооцита можно было различить диффузно расположенные кортикальные гранулы. Так как клетка находилась на стадии профазы I первого мейотического деления, такое распределение гранул допустимо. Зона пеллюцида имела нормальную плотную фибриллярную структуру и содержала немногочисленные цитомембраны, происходящие из окончаний фолликулярных клеток. Перивителиновое пространство обычной структуры, без присутствия дебрисных масс. Поверхность ооцита была представлена небольшими микровиллиями, их число было снижено. В области, прилежащей к оолемме, не пораженной гранулярностью, были видны комплексы ГЭР+митохондрии, ГЭР представляет собой выраженные лакуны. Распределенные по всей площади цитоплазмы большие и маленькие везикулы ГЭР окружены митохондриями. В области гранулярности комплексы ГЭР+митохондрии имеют набухший вид и окружены меньшим числом митохондрий. На рисунке 6 показано высокое разрешение комплекса ГЭР+митохондрии с

гранулярным содержимым внутри везикула гладкого эндоплазматического ретикулума. Большинство митохондрий овальные, присутствуют митохондрии средней плотности с несколькими кристами. Однако в основном, органеллы представляют собой «расплющенные» структуры с затемненным матриксом. Мы предполагаем, что митохондрии не функциональны. Однако данных в подтверждение такой гипотезы недостаточно. Также на ультраструктурном уровне были обнаружены 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.

3.5. Изучение влияния морфологических особенностей ооцитов на процесс выхода эмбрионов из блестящей оболочки в условиях *in vitro*

Для проведения анализа влияния морфологических особенностей ооцитов и процессом выхода эмбрионов человека из блестящей оболочки было изучено 225 эмбрионов на стадии бластоцисты. 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 14. Большая часть ооцитов, из которых были получены эмбрионы, были морфологически нормальные. Их количество составляло 114. Доля цитоплазматических аномалий составила 18,2% (n=41), 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 (отношение шансов=5,62; 95% ДИ=1,234; 0,256).

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 15.

Таблица 14. Частота выхода эмбриона на стадии бластоцисты из блестящей оболочки в условиях *in vitro* в зависимости от морфологических особенностей ооцита

Морфологические особенности ооцитов	Хетчинг +	Хетчинг -	Частота естественного хетчинга	р
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

Данные представлены как числа и %, χ^2 -тест при сравнении с группой N; НД – данные статистически недостоверны.

Таблица 15. Частота спонтанного хетчинга эмбриона на стадии бластоцисты из блестящей оболочки в группе ооцитов с экстрацитоплазматическими аномалиями

Морфологические особенности ооцитов сравниваемых групп		Хетчинг +	Хетчинг -	Частота естественного хетчинга	р*
эЦП	Дебрис в перивителлиновом пространстве	10	6	62,5%	НД
	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%	

* χ^2 -тест при сравнении с группой N; НД – данные статистически недостоверны.

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. В 1996 году трофэктодермальные отростки бластоцисты человека были описаны Gonzales D.S et al. с использованием морфокинетического наблюдения как пальцеобразные цитоплазматические выросты трофэктодермы. В группе бластоцист, не совершивших хетчинг, частота образования трофэктодермальных отростков составила 31,2% (41 из 131 бластоцист), т.е. лишь треть таких бластоцист смогла образовать

трофэктодермальные отростки. 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 [Garside et al., 1997]. Толщина зоны пеллюцида эмбрионов 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, находится в связи с числом бластомеров, процентом фрагментации, то есть с морфологической оценкой качества эмбриона человека.

Для изучения 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 16). 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 внутриклеточная масса категории С — больше в группе Хетчинг+ по сравнению с группой без хетчинга (55,5% и 21,3% соответственно) ($p=0,0017$).

Таблица 16. Характеристики бластоцист с наличием и отсутствием спонтанного хетчинга

Показатели	Хетчинг+ (n=36)	Хетчинг- (n=47)	<i>p</i> *
Качество клеток внутренней клеточной массы*			
• А	10 (27,8%)	14 (29,8%)	p<0,001
• В	6 (16,7%)	23 (48,9%)	
• С	20 (55,5%)	10 (21,3%)	
Качество клеток трофобласта*			
• А	17 (47,2%)	11 (23,4%)	p<0,001
• В	15 (41,7%)	15 (31,9%)	
• С	4 (11,1%)	21 (44,7%)	

*Данные представлены как числа и %, χ^2 -тест; сравнение проводили между группами Хетчинг+ и Хетчинг-

Трофэктодермальный слой в равном числе случаев был оценен на категории А, В или С. При этом клетки трофобласта категории А были выявлены у 47,2% бластоцист группы эмбрионов, совершивших спонтанный хетчинг, и лишь у 23,4% бластоцист без хетчинга, тогда как трофобласт категории С был выявлен у 44,7% бластоцист этой группы и у 11,1% бластоцист в группе Хетчинг+ ($p=0,0030$).

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. 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 17).

Таблица 17. Зависимость экспрессии эмбриональных генетических факторов и способности бластоцисты к выходу из блестящей оболочки в условиях *in vitro*

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

*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни. Сравнение попарное между группами.

Таблица 18. Зависимость экспрессии эмбриональных генетических факторов от качества бластоцисты

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)
p-уровень*	<0,05		
Качество клеток внутренней клеточной массы			
Класс А (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)
Класс С (n=30)	4,19 (3,85-4,58)	4,50 (4,26-4,75)	2,01 (1,36-3,37)
p-уровень*	<0,05	<0,05	0,0918
Качество клеток трофэктодермы			
Класс А (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 С (n=25)	3,88 (3,63-4,17)	4,42 (4,13-4,60)	1,41 (0,00-2,23)
p-уровень*	<0,05	<0,05	НД

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, *тест Крускала-Уоллиса; НД – данные статистически недостоверны.

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 А (таблица 18). 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.

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

Как показали полученные данные, спонтанный хетчинг зависит от качества клеток трофэктодермы. Ретроспективно была набрана группа 300 бластоцист с качеством трофэктодермы класса В и ниже для оценки их имплантационного потенциала. Критерии включения: степень экспансии 3 и выше, класс внутренней клеточной массы А, класс трофэктодермы — В и С. Эмбрионы разделили 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 19.

Таблица 19. Частота имплантации эмбрионов на стадии бластоцисты с клетками трофэктодермы класса В и ниже с применением рассечения/удаления блестящей оболочки

Группа	n	Число эмбрионов с имплантацией в полости матки	Число эмбрионов без имплантации
Трофобласт класса В и ниже +частичное рассечение блестящей оболочки	100	22 (22%)*	78
Трофобласт класса В и ниже +полное удаление блестящей оболочки	100	30 (30%)*	70
Трофобласт класса В и ниже +блестящая оболочка без изменений	100	17 (17%)	83

*Данные представлены как числа и %, χ^2 -тест; попарное сравнение групп; * $p < 0,01$

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 полном удалении зоны пеллюцида — 30 ($p < 0,01$). При анализе разницы между группами с разными видами вспомогательного хетчинга была обнаружена достоверная разница ($p < 0,047$). Полное удаление зоны пеллюцида способствует имплантации эмбриона на стадии бластоцисты с качеством клеток трофобласта класса В и ниже в полости матки. Можно говорить о том, что даже малоклеточная трофэктодерма способна имплантироваться в эндометрий при непосредственном контакте клеток друг с другом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установленные в работе закономерности влияния цитофизиологических и молекулярно-биологических особенностей постовуляторных ооцитов на преимплантационное развитие эмбрионов человека способствуют пониманию фундаментальных механизмов регуляции созревания женской половой клетки, формирования ее способности к оплодотворению и влияния на последующее 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 о значимости структурных и функциональных изменений гамет для развития эмбриона от стадии зиготы до процесса высвобождения бластоцисты из блестящей оболочки обосновывают необходимость морфологической оценки ооцитов 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.
5. 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 *СGB* 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук

1. Долгушина Н.В., Ибрагимова Э.О., Романов А.Ю., Бурменская О.В., Макарова Н.П., Шафеи Р.А., Сыркашева А.Г. Предикторы эффективности спонтанного хетчинга бластоцист человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология. 2018. № 2. С. 88–95.
2. Долгушина Н.В., Ибрагимова Э.О., Романов А.Ю., Макарова Н.П., Довгань А.А., Сыркашева А.Г., Калинина Е.А. Роль проназного хетчинга в эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология. 2018. № 3. С. 70–74.
3. Шафеи Р.А., Сыркашева А.Г., Романов А.Ю., Макарова Н.П., Долгушина Н.В., Семёнова М.Л. Хетчинг бластоцисты человека // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 1. С. 8-20.
4. Сыркашева А.Г., Красный А.М., Майорова Т.Д., Макарова Н.П., Долгушина Н.В. Изучение числа копий митохондриальной ДНК в ооцитах человека с различными морфологическими аномалиями // Молекулярная медицина. 2016. Т. 14. № 5. С. 37-41.

5. Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В., **Макарова Н.П.**, Агаршева М.В., Ковальская Е.В. Исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с дисморфизмами ооцитов // Акушерство и гинекология. 2015. № 7. С. 56-62.
6. Горшкова А.Г., Долгушина Н.В., **Макарова Н.П.**, Ковальская Е.В., Калинина Е.А. Факторы риска развития дисморфизмов ооцитов в программах вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология. 2015. № 5. С. 66-73.
7. Ковальская Е.В., **Макарова Н.П.**, Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В., Курило Л.Ф. Механизм формирования агрегатов гладкого эндоплазматического ретикулума в цитоплазме ооцитов в циклах вспомогательных репродуктивных технологий и его клиническое значение // Цитология. 2015. Т. 57. № 2. С. 129-134.
8. Горшкова А.Г., **Макарова Н.П.**, Долгушина Н.В. Дисморфизмы ооцитов в циклах вспомогательных репродуктивных // Акушерство и гинекология. 2014. № 6. С. 27-32.
9. **Макарова Н.П.**, Казарян Л.М., Петрова Е.В., Кулакова Е.В., Курило Л.Ф., Баранова Г.Б., Поляков В.Ю., Калинина Е.А. Ультроструктурная патология ооцитов в циклах экстракорпорального оплодотворения как причина женского бесплодия // Акушерство и гинекология. 2014. № 3. С. 69-73.
10. **Макарова Н.П.**, Казарян Л.М., Калинина Е.А., Баранова Г.Б., Поляков В.Ю. Грубозернистая деструкция цитоплазмы ооцитов в цикле экстракорпорального оплодотворения: ультроструктурный анализ // Акушерство и гинекология. 2012. № 8-2. С. 103-106.
11. Syrkasheva A.G., Dolgushina N.V., Romanov A.Yu., Burmenskaya O.V., **Makarova N.P.**, Ibragimova E.O., Kalinina E.A., Sukhikh G.T. Cell and genetic predictors of human blastocyst hatching success in assisted reproduction // Zygote. 2017. T.9. P.1-6.
12. Dolgushina N.V., Syrkasheva A.G., **Makarova N.P.**, Kovalskaya E.V., Kalinina E.A., Sukhikh G.T. Correlation between oocyte morphology and the embryo aneuploidy rate in IVF cycles // Gynecological Endocrinology. 2015. T. 31. P. 61-64.

Статьи в сборниках и материалы конференций

13. Романов А.Ю., Ибрагимова Э.О., Долгушина Н.В., Сыркашева А.Г., **Макарова Н.П.** Роль качества гамет в эффективности самостоятельного хетчинга бластоцист человека в программах ВРТ // В сборнике: XI Международный конгресс по репродуктивной медицине. 2017. С. 415-416.

14. Сыркашева А.Г., Бурменская О.В., Долгушина Н.В., Романов А.Ю., Ибрагимова Э.О., **Макарова Н.П.**, Калинина Е.А., Трофимов Д.Ю. Молекулярно-генетические предикторы эффективности хетчинга бластоцист человека в программе ВРТ // В сборнике: Репродуктивные технологии сегодня завтра. Материалы XXVI международной конференции РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня завтра". 2016. С. 121-122.
15. Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В., Довгань А.А., **Макарова Н.П.**, Калинина Е.А. Генетические причины неудач ЭКО у женщин с морфологическими аномалиями ооцитов // В сборнике: Репродуктивные технологии сегодня завтра Материалы XXVI международной конференции РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня завтра". 2016. С. 161-163.
16. Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В., **Макарова Н.П.**, Ковальская Е.В. Факторы риска развития экстрацитоплазматических дисморфизмов ооцитов в программах вспомогательных репродуктивных технологий // В сборнике: Материалы IX Международного конгресса по репродуктивной медицине. Materials of Congress. 2015. С. 143-144.
17. Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В., **Макарова Н.П.**, Ковальская Е.В. Факторы риска развития цитоплазматических дисморфизмов ооцитов в программах вспомогательных репродуктивных технологий // В книге: Амбулаторно-поликлиническая помощь: от менархе до менопаузы. XXI Всероссийский конгресс с международным участием: сборник тезисов. 2015. С. 155-157.
18. Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В., **Макарова Н.П.**, Ковальская Е.В. Применение преимплантационного генетического скрининга у пациенток с дисморфизмами ооцитов // В сборнике: Материалы IX Международного конгресса по репродуктивной медицине. 2015. С. 197-198.
19. Горшкова А.Г., **Макарова Н.П.**, Ковальская Е.В., Долгушина Н.В. Влияние морфологии ооцитов на эмбриологические характеристики программ интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов // В сборнике: Мать и дитя. Материалы XV Всероссийского научного форума, 2014. С. 465-466.
20. Горшкова А.Г., **Макарова Н.П.**, Ковальская Е.В., Долгушина Н.В. Реализация программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с агрегатами гладкого эндоплазматического ретикулума в цитоплазме ооцитов // В сборнике: Мать и дитя. Материалы XV Всероссийского научного форума, 2014. С. 466-467.
21. **Макарова Н.П.**, Ковальская Е.В., Горшкова А.Г., Долгушина Н.В., Калинина Е.А. ПГД у пациенток с дисморфизмами ооцитов // В

- сборнике: Репродуктивные технологии сегодня и завтра. Материалы XXIV международной конференции. 2014. С. 89-90.
22. **Макарова Н.П.**, Петрова Е.В., Казарян Л.М., Алиева К.У., Калинина Е.А. Потенциал развития ооцитов с дебрисом в перивителлиновом пространстве // В сборнике: Репродуктивные технологии сегодня и завтра. материалы XXIII международной конференции РАРЧ. Российская Ассоциация репродукции Человека. 2013. С. 66-67.
23. **Калинина Е.А.**, **Макарова Н.П.** Патология цитоплазмы ооцитов в циклах ИКСИ // В сборнике: Репродуктивные технологии сегодня и завтра. Материалы XXII Международной конференции Российской ассоциации репродукции человека. 2012. С. 100-101.
24. **Макарова Н.П.**, Казарян Л.М., Калинина Е.А., Поляков В.Ю., Баранова Г.Б. Ультроструктурный анализ ооцитов с центрально расположенной гранулярностью, полученных в протоколе ИКСИ: клинический случай // В сборнике: «Мать и дитя», 2012. С. 469-470.