

ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМИ ОЦІНКИ ЗИГОТ У ПРОГНОЗУВАННІ МОРФОЛОГІЇ І ПЛОЇДНОСТІ РАНИХ ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ

І.Є. ІЛЬІН^{1,1}, О.Д. НІКІТІН^{2,2}, Ю.В. ГОНТАР^{1,3}, Н.О. БУДЕРАЦЬКА^{1,4}, О.Ю. ВЕРЛІНСЬКИЙ^{1,5}

¹ ТОВ «Медичний центр ІГР», пр. Перемоги, 121Б, оф.228, м. Київ, 03115,

² Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

E-mail: igor_iljin@hotmail.com¹, nikitin@bigmir.net², genetics-j@yandex.ru³, nataly_igr@ukr.net⁴, igrcclinic@gmail.com⁵

Ефективність запліднення in vitro і перенесення ембріонів в організм людини є низькою, так як близько 50 % ембріонів, що пересаджують у порожнину матки, досягають свого подальшого розвитку. Тому постала проблема раннього встановлення потенціалу майбутнього ембріону, що передувє відбору морфологічно та хромосомно якісних бластоцист. Через 16–18 год після мікроманіпуляцій ICSI оцінювали якість запліднення по наявності пронуклеусів за Z-оцінюванням. При цьому досліджувався розмір і розміщення пронуклеусів відносно центру клітини, кількості ядерців і їх розподілу. Найкращий розвиток і, відповідно, найбільший потенціал для імплантації мали ембріони, що розвивались з зиготи категорії Z1; зиготи Z2 та Z3 також формували бластоцисти якості AA на 5 добу. Жодна із запліднених яйцеклітин, що сформували зиготу категорії Z4, не дали розвитку життєздатного ембріона. Встановлено відмінність у здатності формувати бластоцисти морфологічної якості AA категоріями зигот Z1, Z2, Z3 від категорії Z4, а також між категоріями Z1 та Z3. Виявлено, що найбільша кількість ембріонів, в яких кількість досліджуваних хромосом відповідала нормі, утворилась із зигот категорії Z1 та Z2, також було виявлено значну відмінність за кількістю ембріонів, в яких не було виявлено анеуплоїдії, сформованих із зигот категорій Z1, Z2, Z3, від зигот типу Z4.

Ключові слова: зигота, якість ембріонів, бластоцисти, допоміжні репродуктивні технології.

Вступ. Проблема безпліддя поширена у всіх країнах світу, що постійно стимулює науковців до покращення методів запліднення in vitro. При цьому ефективність запліднення in vitro і перенесення ембріонів в організм людини є низьким, так як лише 50 % ембріонів, що підлягають трансферу у свіжих циклах, досягають свого подальшого розвитку [1, 2].

Існують різноманітні підходи для відбору життєздатних ембріонів перед їх переносом до порожнини матки. До них відносяться

морфологічні критерії оцінки за 20, 28, 44, 68, 120 годин після запліднення. В основному, селекція раних ембріонів заснована на морфології, ступені фрагментації, розвитку до 8-клітинної стадії та якості бластоцисти на п'яту добу розвитку [3, 4]. Але, незважаючи на це, залишається проблема раннього виявлення потенціалу майбутнього ембріону, що передувє відбору морфологічно та хромосомно якісних бластоцист, котрі зможуть імплантуватись з більшою вірогідністю [5, 6].

Найпоширенішою системою зиготної оцінки у практичному застосуванні є Z-оцінювання, запропоноване Скоттом [7, 8], яке було основане на емпіричних спостереженнях і базувалося на характеристиках зиготної морфології та результатах з настання вагітності. Дана класифікація морфології зигот успішно використовується у репродуктивних центрах різних країн світу в програмах запліднення in vitro як спосіб оцінки якості майбутнього ембріона та прогнозування його придатності для ембріотрансферу [9, 10]. Саме ця класифікація раніше за інші дає змогу спрогнозувати потенціал ембріона, що необхідно враховувати у разі кріоконсервації зигот [11].

Отже, у щоденній практиці ембріологічної лабораторії важливо розуміти, починаючи зі стадії зиготи, чи відповідатиме майбутній ембріон показнику високої якості на стадії бластоцисти. Такий прогноз дозволить коректніше готувати пацієнтку для переносу ембріона в порожнину матки або відмінити дану процедуру, посиляючись на результати зиготної оцінки при формуванні нежиттєздатних категорій зигот. Даний підхід дозволить зменшити матеріальний та емоційний збиток, який переживають пацієнти при лікуванні безпліддя методами запліднення in vitro.

Метою досліджень було визначення залежності між якісними характеристиками зигот та

© І.Є. ІЛЬІН, О.Д. НІКІТІН, Ю.В. ГОНТАР,
Н.О. БУДЕРАЦЬКА, О.Ю. ВЕРЛІНСЬКИЙ, 2019

розвитком подальшого ембріону, його морфологічною якістю та хромосомним статусом у групах донорів ооцитів та пацієнтів, що проходили лікування безпліддя методами запліднення *in vitro*.

Об'єкт і методи дослідження. Пацієнти. Збір первинної інформації, лабораторні маніпуляції та дослідження проводилися на базі ТОВ «Медичний центр ІГР» (м. Київ) з вересня 2016 по березень 2017 рр. При виконанні роботи були зібрані дані про 43 жінки, з яких 17 були донорами ооцитів, а інші 26 – пацієнтки, які звернулися до медичного центру через первинне безпліддя, тобто не зачали дитину протягом одного року у природньому циклі, та проходили лікування із застосуванням допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Чоловіки ($n = 17$), статеві клітини яких використовували для запліднення донорських яйцеклітин, мали нормозооспермію. Серед чоловіків ($n = 26$), сперматозоїдами яких запліднювали ооцити пацієнток, 3 мали поодинокі сперматозоїди в еякуляті, 4 – олігозооспермію, 19 чоловіків – нормозооспермію. Середній вік жінок склав $30,6 \pm 4,1$ років в інтервалі 25–44 роки, при цьому середній вік пацієнток відповідав $33,2 \pm 3,5$ (26–44 роки), донорів – $28,2 \pm 3,0$ років (25–33 роки). Середній вік чоловіків дорівнював $41,7 \pm 8,8$ років в інтервалі 27–56 років, при чому середній вік чоловіків пацієнток склав $43,2 \pm 10,6$ (27–55 років), а чоловіків, гамети яких використовували для запліднення донорських ооцитів, – $42,4 \pm 7,8$ (34–56 років).

Було проаналізовано 443 яйцеклітини та отримані з них 352 зиготи. При цьому 214 ооцитів були отримані від пацієнток, а 229 – від донорів ооцитів. Кожну яйцеклітину запліднювали одним морфологічно якісним сперматозоїдом, який вводили у цитоплазму жіночої гамети, тобто виконувалася інтраплазматична ін'єкція сперматозоїда (ICSI).

Надалі досліджувалась морфологічна якість ембріонів ($n = 324$) на третю й п'яту добу після запліднення ооцитів, із них преімплантаційний генетичний скринінг пройшли 176 ембріонів.

Проведені дослідження повністю відповідають законодавству України і принципам Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Союзу Європи щодо прав людини і біомеди-

цини. Кожна пацієнтка підписувала інформовану згоду на участь у дослідженні.

Підготовка сперматозоїдів та ооцитів до запліднення. Зразки сперми збиралися шляхом мастурбації після трьох днів абстиненції, надалі еякуляти залишали розріджуватись протягом 20 хв при кімнатній температурі до обробки. По закінченню часу еякулят відмивали у поживному середовищі SupraSperm («Origio», Данія), за допомогою центрифугування протягом 20 хв при 2000 обертах на хвилину вилучали тільки рухому фракцію сперматозоїдів, які надалі і використовували для запліднення ооцитів [12, 13].

Ооцити отримували шляхом трансвагінальної пункції фолікулів через 36 год після введення 10000 МО людського хоріонічного гонадотропіну («Хоріомон», IBSA, Швейцарія). Мікроманіпуляції ICSI проводили через 4–5 год після трансвагінальної пункції фолікулів для свіжих ооцитів, або через 2 год після розморожування – для вітрифікованих жіночих гамет [14–16]. Запліднені яйцеклітини поміщали у краплі поживного середовища Global total («Global», США) під шаром олії та культивували впродовж 5–6 діб у інкубаторах Planer («Origio», Данія) із концентрацією CO_2 на рівні 5,0 %.

Оцінка зиготи та якісних характеристик ембріонів. Через 16–18 год після мікроманіпуляцій ICSI оцінювали якість запліднення за наявністю пронуклеусів відповідно до Z-критеріїв за Скоттом. При цьому досліджувався розмір і розміщення пронуклеусів відносно центру клітини, кількість ядерців і їх локалізація. Розподіл зигот на категорії проводився за наступними критеріями: категорія Z1 – пронуклеуси і ядерця мали однаковий розмір та кількість, вони розташовувались поляризовано; категорія Z2 – пронуклеуси і ядерця мали однаковий розмір, кількість ядерців однакова, ядерця розміщувались рівномірно по всій площині пронуклеусів; категорія Z3 – пронуклеуси мали однаковий розмір, але різну кількість ядерців, різного розміру, розміщувались нерівномірно; категорія Z4 – пронуклеуси розміщувались поза центром цитоплазми, були не з'єднані між собою та відрізнялися за розміром [7, 8]. Візуалізація даного оцінювання представлена на рисунку.



Морфологія зигот відповідно до Z-оцінювання за Скоттом, мікроскоп NikonTiEclipse (Японія). 36. 10 × 40

На п'яту добу після запліднення ооцитів, через 114–118 год, проводилася систематизація наявних ембріонів, що не зупинилися у розвитку, за їх морфологічними характеристиками. При цьому виконувалася оцінка внутрішньоклітинної маси та трофектодерми відповідно до критеріїв якості бластоцисти за Гарднером [17].

Передімплантаційний генетичний тест на анеуплоїдії ранніх ембріонів. Матеріал для преімплантаційного генетичного тесту на анеуплоїдії (ПГТ-А) було отримано на третю або п'яту після запліднення ооцитів шляхом аспірації однієї клітини (бластомера) ембріона або відсікання 4–5 клітин трофектодерми.

ПГТ-А проводився із застосуванням методу FISH (флуоресцентна in situ гібридизація) та використанням центромерних та локус-специфічних флуоресцентних ДНК-зондів для хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X, Y («Abbott», США).

Статистичний аналіз. Перевірку розподілу кількісних даних на відповідність закону нормального розподілу проводили методами Шапіро-Уїлка та Колмогорова-Смірнова. Порівняння середніх арифметичних виконували методами Стюдента. Статистичні гіпотези перевірялися за допомогою критеріїв t , χ^2 за рівнів значимості $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ [18].

Результати дослідження та їх обговорення. Серед 443 досліджених ооцитів 229 клітин було отримано від донорів ооцитів, що склали контрольну групу, а 214 жіночих гамет — від пацієнток, що проходили лікування методами допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) через первинне безпліддя. Середній вік донорів та пацієнток відрізнявся ($t_{\text{емп}} = 16,1$, $p < 0,01$) та склав $28,2 \pm 3,0$ та $33,2 \pm 3,5$ років відповідно, хоча середній вік чоловіків був співставним.

Первинна оцінка запліднення через 18 год після проведення процедури ICSI показала, що

Таблиця 1. Розподіл характеристик розвитку, якості та хромосомного статусу ембріонів в залежності від категорій зигот в обох групах

Характеристика	Загальна кількість ооцитів, n	Середній вік, жінок $\bar{X} \pm S_x$	Кількість ембріонів на 3 добу, n , %	Середня кількість бластомерів ембріонів на 3 добу, $\bar{X} \pm S_x$	Кількість		Число ембріонів з нормальною кількістю досліджених хромосом, n , %
					ембріонів на 5 добу (бластоцисти), n , %	бластоцист якості AA, n , %	
Z1	42	$30,3 \pm 3,5$	42 (100)	$7,8 \pm 1,2^*$	29 (69,1)	29 (69,1)	12/27** (44,4)
Z2	176	$30,1 \pm 3,8$	170 (96,6)	$7,8 \pm 1,8^*$	123 (69,9)	123 (69,9)	44/93** (47,3)
Z3	124	$30,4 \pm 4,2$	115 (92,8)	$7,6 \pm 1,7^*$	77 (62,1)	77 (62,1)	21/53 (39,6)
Z4	10	$30,9 \pm 4,6$	8 (80,0)	$5,8 \pm 2,0^*$	2 (20,0)	2 (20,0)	1/3** (33,3)

Примітки: Z1, Z2, Z3, Z4 — позначення категорій зигот, n — кількість; * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

352 яйцеклітини (79,5 %) запліднилися нормально, тобто мали два сформовані пронуклеуса, придатних для Z — оцінювання. Аномально-го запліднення зазнав 91 ооцит (20,5 %), при цьому спостерігалися наступні варіанти: 44 зиготи (48,4 %) не мали жодного сформованого пронуклеуса, 22 зиготи (24,2 %) мали один пронуклеус, деградували після процедури ICSI 13 клітин (14,3 %), три пронуклеуси сформувалося після запліднення 8 жіночих гамет (8,8 %), зазнали вакуолізації 4 зиготи (4,3 %).

Для подальшого дослідження дані були згруповані за кількісними показниками в залежності від кожної з категорій Z оцінювання зигот (табл. 1). При цьому між категоріями зигот не було виявлено статистично значимої різниці за середнім віком жінок та кількістю ембріонів на третю добу розвитку після запліднення. Але спостерігалась відмінність категорій Z1, Z2, Z3 від категорії Z4 за кількістю бластомерів на стадії дроблення ембріонів ($t_{\text{емп}} = 2,9$, $p < 0,01$). Різниця також виявлена і при формуванні бластоцист на п'яту добу розвитку ембріона (69,1; 69,9; 62,1 порівняно з 20,0 %, $p < 0,005$).

Між категоріями Z1 та Z3 встановлено статистично значиму відмінність у кількості морфологічно якісних бластоцист AA (69,0 порівняно з 54,5 %, $p < 0,05$), аналогічно й за кількістю отриманих ембріонів, що мали нормальну кількість досліджуваних хромосом, між категоріями Z1 та Z4 (44,4 порівняно з 33,3 %, $p < 0,05$), Z2 та Z4 (47,3 порівняно з 33,3 %, $p < 0,05$). Отримані дані є корисними для

практичної роботи з ембріонами, так як на первинному етапі розвитку зиготи можливо спрогнозувати подальший стан ембріона. Аналогічну точку зору висловили вчені Стенфордського університету. Вони повідомили, що пронуклеарні характеристики зиготи можуть передбачати формування бластоцисти у людини та миші протягом декількох годин після запліднення з точністю близько 90 %, специфічністю 95 % та чутливістю до 75 %. При цьому дослідники виявили значні відмінності між транскриптами життєздатних і нежиттєздатних зигот, особливо в експресії генів, важливих для дозрівання ооцитів. [19]

Тому, зважаючи на отримані нами залежності при аналізі даних у загальній дослідницькій групі, стало важливим вивчення якості зиготи з динамікою розвитку ембріонів, їх кількісних та якісних характеристик кожної групи окремо (табл. 2, 3).

За категоріями зигот у табл. 2 згруповані дані про отримані ембріони та їх якість серед пацієнтів, що проходили лікування безпліддя із застосуванням ДРТ. Середній вік пацієнок у кожній категорії не мав статистичних відмінностей. Було виявлено статистичну відмінність за кількістю бластомерів ембріонів, отриманих від зигот типу Z1, Z2, Z3 відносно зигот типу Z4 ($t_{\text{емп}} = 2,1$, $p < 0,05$). При формуванні бластоцист на п'яту добу розвитку також спостерігалась значна різниця між кількістю ембріонів, що формувались із зигот типу Z1, Z2, Z3 в порівнянні із зиготами типу Z4 (60,8, 59,7, 57,6 проти 33,3 %, $p < 0,005$). З іншої сторо-

Таблиця 2. Розподіл характеристик розвитку, якості та хромосомного статусу ембріонів в залежності від категорій зигот у групі пацієнок

Характеристика	Загальна кількість ооцитів, <i>n</i>	Середній вік, $\bar{X} \pm S_x$	Кількість ембріонів на 3 добу, <i>n</i> , %	Середня кількість бластомерів ембріонів на 3 добу, $\bar{X} \pm S_x$	Кількість		Число ембріонів з нормальною кількістю досліджених хромосом, <i>n</i> , %
					ембріонів на 5 добу (бластоцисти), <i>n</i> , %	бластоцист якості AA, <i>n</i> , %	
Z1	23	32,1 ± 3,5	23 (100)	7,9 ± 1,2*	14** (60,8)	10/14** (71,4)	6/14* (42,9)
Z2	72	32,8 ± 3,8	69 (95,8)	7,8 ± 1,7*	43** (59,7)	24/43** (55,8)	10/34* (29,4)
Z3	59	33,6 ± 4,2	53 (89,8)	7,3 ± 1,7*	34** (57,6)	16/34** (47,1)	7/22* (31,8)
Z4	6	34,3 ± 5,0	6 (100)	5,8 ± 1,7*	2** (33,3)	0 (0)	0/2 (0)

Примітки: Z1, Z2, Z3, Z4 — позначення категорій зигот, *n* — кількість; * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

ни, вивчаючи кількість якісних бластоцист АА, було виявлено наступні відмінності: між Z1 та Z2 (71,4 порівняно з 55,8%, $p < 0,025$), між Z1 та Z3 (71,4 порівняно з 47,1 %, $p < 0,005$). Аналогічна тенденція спостерігалася і при порівнянні ембріонів з нормальною кількістю досліджуваних хромосом, що сформовані від різних типів зигот, а саме статистично значима різниця була встановлена між категоріями зигот Z1 та Z2 (42,9 порівняно з 29,4 %, $p < 0,05$), граничне значення отримано між Z1 та Z3 (42,9 порівняно з 31,8 %, $p = 0,05$). Отже, якість зигот має взаємозв'язок із подальшим розвитком ембріону та його морфологічною та генетичною якістю.

Співставні данні були опубліковані італійськими вченими, спостереження яких підтверджують, що певні моделі пронуклеарної морфології зигот пацієток пов'язані із більшою часткою еуплоїдності та спроможності до імплантації майбутніх ембріонів. Тим самим дослідники підтверджують релевантність цієї системи підрахунку для прогнозування життєздатності зигот [20].

Так як донори ооцитів вважаються контролем для пацієнтів, що отримують лікування безпліддя із застосуванням ДРТ, то аналогічні розрахунки було виконано і для групи донорів ооцитів (табл. 3).

Як і при дослідженні групи пацієнтів, донорські зиготи та отримані з них ембріони були згруповані з урахуванням зиготної оцінки. Аналогічно групі пацієнтів, не було виявлено статистично значимої різниці у категоріях

за середнім віком донорів. Також збереглась відмінність категорій Z1, Z2, Z3 від категорії Z4 за кількістю ранніх ембріонів на третю добу розвитку (100, 97,1, 95,4 порівняно з 50,0 %, $p < 0,005$) та кількістю бластомерів ембріонів на стадії дроблення ($t_{\text{емп}} = 2,3$, $p < 0,05$). Серед ембріонів, що відповідали стадії розвитку бластоцисти на п'яту добу, були виявлені відмінності між категоріями Z1 та Z3 (78,9 порівняно з 66,2 %, $p < 0,05$), але за кількістю морфологічно якісних бластоцист різницю встановлено не було. При цьому серед ембріонів, в яких не детектовано анеуплоїдії, було визначене граничне значення між Z2 та Z3 (57,6 порівняно з 45,2 %, $p = 0,05$), та значну відмінність Z1, Z2, Z3 від категорії Z4 (46,2, 57,6, 45,2 % порівняно з 25,0, $p < 0,05$).

Таким чином, отримані результати дослідження вказують на інформативність та прогностичну значущість оцінювання зигот через 16–18 год після запліднення ооцитів. Чимало наукових робіт підтверджують отримані нами результати [4, 5, 10, 19, 20]. Так, за висновками ретроспективного дослідження було встановлено, що морфологія зиготи суттєво співвідноситься із здатністю до дроблення та якістю ембріона, із стадією бластоцисти та хромосомним статусом ембріона у великій частці досліджень, які оцінювали конкретний результат (15/25 (60 %), 15/20 (75 %), 7/8 (87,5 %), 6/6 (100 %), відповідно). З іншого боку, дослідники наголошують, що лише невелика частка статей показала статистично значущий взаємозв'язок між імплантацією,

Таблиця 3. Розподіл характеристик розвитку, якості та хромосомного статусу ембріонів в залежності від категорій зигот у групі донорів ооцитів

Характеристика	Загальна кількість ооцитів, n	Середній вік, $\bar{X} \pm S_x$	Кількість ембріонів на 3 добу, n , %	Середня кількість бластомерів ембріонів на 3 добу, $\bar{X} \pm S_x$	Кількість		Число ембріонів з нормальною кількістю досліджених хромосом, n , %
					ембріонів на 5 добу (бластоцисти), n , %	бластоцист якості АА, n , %	
Z1	19	29,4±3,3	19** (100)	7,7±1,2*	15** (78,9)	10/15 (66,7)	6/13** (46,2)
Z2	104	28,3±3,7	101** (97,1)	7,9±1,6*	80 (76,9)	51/80 (63,8)	34/59** (57,6)
Z3	65	27,6±4,1	62** (95,4)	7,8±1,8*	43** (66,2)	26/43 (60,5)	14/31** (45,2)
Z4	4	30,3±4,6	2** (50,0)	5,5±3,5*	0 (0)	0 (0)	1** (25,0)

Примітки: Z1, Z2, Z3, Z4 – позначення категорій зигот, n – кількість; * $p < 0,005$, ** $p < 0,05$.

вагітністю та рівнем народжуваності відповідно до оцінки морфології зиготи (12/23 (52,2 %), 12/25 (48 %), 1/4 (25 %), відповідно). [11].

Також класифікацію за якістю зигот дослідники використовують не тільки для прогнозування розвитку ембріонів із наявних ооцитів, а при аналізі попередніх результатів в програмах запліднення *in vitro* дані про якість зигот враховують під час вибору типу протоколу для стимуляції супероуляції з метою отримання більш якісних ооцитів [21].

Висновки. Важливість морфологічної оцінки якості зигот в наш час є недооціненою. В результаті виконаного дослідження було визначено залежність між якісними характеристиками зиготи та розвитком подальшого ембріону, його морфологією та хромосомним статусом у групах донорів ооцитів та пацієнтів. Виявлено, що найбільший потенціал для імплантації мали ембріони, утворені із зигот категорії Z1; хоча зиготи Z2 та Z3 також здатні формувати бластоцисти якості AA. В той же час, жодна із запліднених яйцеклітин, що сформували зиготу категорії Z4, не дали розвитку життєздатного ембріона. Важливо відмітити, що встановлено взаємозв'язок стану зигот не тільки з морфологічною якістю майбутнього ембріона, а й з хромосомним набором, так як найбільша кількість ембріонів з нормальною кількістю досліджуваних хромосом утворилась із зигот категорії Z1 та Z2. Наведені відмінності були виявлені як у групі пацієнток, що проходили лікування безпліддя із застосуванням ДРТ, так і серед донорів ооцитів. Таким чином, схильність до формування певних типів зигот має генетичну основу та не залежить від вікових показників жінок та впливу зовнішніх факторів.

PRONUCLEAR SCORING APPLICATION IN PREDICTING THE MORPHOLOGY AND PLOIDY OF EARLY HUMAN EMBRYOS

I.E. Ilyin, O.D. Nikitin, J.V. Gontar, N.O. Buderatska, O.Yu. Verlinsky

LLC «Medical Center IGR», 121B Peremohy square, office 228, Kyiv, 03115, Bogomolets National Medical University

E-mail: igrclinic@gmail.com

The efficiency of *in vitro* fertilization and embryos transfer in humans is low: less than 50 % of transplanted embryos

reach their potential development. Therefore, there is a problem of early determination of the embryo potential, which precedes the selection of high morphological and chromosomal qualities at the stage of a blastocyst. In 16–18 hours after ICSI micromanipulation, the fertility quality was evaluated for the presence of pronuclei using Z-evaluation. We examined the size and placement of pronuclei relative to the cell center, the number of nucleoli and their distribution. The best development and therefore the greatest potential for implantation were detected in embryos that developed from zygote Z1. Zygotes Z2 and Z3 also formed blastocysts of AA quality on the fifth day. None of the fertilized egg cells that formed zygote Z4 developed into an embryo. We found out that the highest number of embryos with a normal quantity of studied chromosomes was formed from zygotes of Z1 and Z2 categories, and a significant difference was found between the numbers of embryos, in which aneuploidy has not been identified, formed from zygotes of Z1, Z2, Z3 categories, compared to zygotes of type Z4.

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ ОЦЕНКИ ЗИГОТЫ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ МОРФОЛОГИИ И ПЛОИДНОСТИ РАННИХ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

Ильин И.Е., Никитин О.Д., Гонтарь Ю.В., Будерацкая Н.А., Верлинский О.Ю.

Эффективность искусственного оплодотворения и переноса эмбрионов в организм человека является низким, около 50 % эмбрионов достигают своего потенциального развития. Поэтому возникла проблема раннего исследования и отбора морфологически и хромосомно качественных эмбрионов на стадии бластоцисты. Через 16–18 часов после микроманипуляций ICSI оценивали качество оплодотворения по наличию пронуклеусов за Z-оценкой. При этом исследовались размер и размещение пронуклеусов относительно центра клетки, количества ядрышек и их распределение. Лучшее развитие и, соответственно, наибольший потенциал для имплантации имели эмбрионы, которые развивались из зигот категории Z1; зиготы Z2 и Z3 также формировали бластоцисты на 5 сутки качества AA. Ни одна из оплодотворенных яйцеклеток, сформированных из зиготы категории Z4, не дала развития жизнеспособного эмбриона. Установлено отличие в способности формировать бластоцисты морфологического качества AA категориями зигот Z1, Z2, Z3 от категории Z4, а также между категориями Z1 и Z3. Выведено, что наибольшее количество эмбрионов с нормальным количеством исследованных хромосом образовалось из зигот категории Z1 и Z2, также было обнаружено

значительное различие по количеству эмбрионов, в которых не были выявлены анеуплоидии, сформированных из зигот категорий Z1, Z2, Z3, от зиготы типа Z4.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Jones, G.M., Trounson, A.O., Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits, *Hum Reprod.*, 1999, vol. 14, no. 6, pp. 1405–8. PMID:10357946.
2. Wade J.J., MacLachlan V., and Kovacs G., The success rate of IVF has significantly improved over the last decade, *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*, 2015, vol. 55, no. 5, pp. 473–6. doi: 10.1111/ajo.12356.
3. Lan, K.C., Hua, F.J., Lin, Y.C., Kung, F.T., Hsieh, C.H., Huang, H.W., Tan, P.H., and Chang, S.Y., The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5, *Hum. Reprod.*, 2003, vol. 18, no. 6, pp. 1299–306. doi: 10.1093/humrep/deg239.
4. Zamora, R.B., Sanchez, R.V., Perez, J.G., Diaz, R.R., Quintana, D.B., and Bethencourt, J.C., Human zygote morphological indicators of higher rate of arrest at the first cleavage stage, *Zygote*, 2011, vol. 19, no. 4, pp. 339–44. doi:10.1017/S0967199410000407.
5. Aydin, S., Cinar, O., Demir, B., Korkmaz, C., Ozde-girmenci, O., Dilbaz, S., and Goktolga, U., Is pronuclear scoring a really good predictor for ICSI cycles? *Gynecol. Endocrinol.*, 2011, vol. 27, no. 10, pp. 742–7. doi: 10.3109/09513590.2010.509829.
6. Papale, L., Fiorentino, A., Montag, M., and Tomasi, G., The zygote, *Hum. Reprod.*, 2012, vol. 27, no. 1, pp. i22–49. doi:10.1093/humrep/des205.
7. Scott, L., Smith, S., The successful use of pronuclear embryo transfers the day after oocyte retrieval, *Hum. Reprod.*, 1998, vol. 13, no. 1, pp. 1003–13.
8. Scott, L., The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos, *Hum. Reprod. Upd.*, 2003, vol. 9, no. 3, pp. 237–49. doi: 10.1093/humupd/dmg023.
9. Azzarello, A., Hoest, T., and Mikkelsen, A.L., The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture *Hum. Reprod.*, 2012, vol. 27, no. 9, pp. 2649–57. doi: 10.1093/humrep/des210.
10. Braga, D.P., Setti, A.S., Figueira, R.de C., Iaconelli, A.Jr., and Borges, E.Jr., The combination of pronuclear and blastocyst morphology: a strong prognostic tool for implantation potential, *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2013, vol. 30, no. 10, pp. 1327–32. doi: 10.1007/s10815-013-0073-3.
11. Nicoli, A., Palomba, S., Capodanno, F., Fini, M., Falbo, A., and La Sala, G.B., Pronuclear morphology evaluation for fresh in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles: a systematic review, *J. Ovarian Res.*, 2013, vol. 6, no. 1, pp. 64. doi: 10.1186/1757-2215-6-64.
12. Palermo, G.D., Cohen, J., Alikani, M., Adler, A., and Rosenwaks, Z., Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection (ICSI), *Reprod. Fertil. Dev.*, 1995, vol. 7, no. 2, pp. 211–7. PMID:7480839.
13. Palermo, G.D., Cohen, J., Alikani, M., Adler, A., and Rosenwaks, Z., Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility, *Fertil. Steril.*, 1995, vol. 63, pp. 1231–40. PMID:7750593.
14. Palermo, G.D., Colombero, L.T., Schattman, G.L., Davis, O.K., and Rosenwaks, Z., Evolution of pregnancies and initial follow-up of newborns delivered after intracytoplasmic sperm injection, *JAMA*, 1996, vol. 276, no. 23, pp. 1893–7. PMID: 8968015.
15. Palermo, G.D., Cohen, J., and Rosenwaks, Z., Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure, *Fertil. Steril.*, 1996, vol. 65, pp. 899–908. PMID:8612845.
16. Veeck, L.L., The morphological assessment of human oocytes and early concepts. CRC Press: Boca Raton., 1990, pp. 353–69.
17. Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., and Schoolcraft, W.B., Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer, *Fertil. Steril.*, 2000, vol. 73. PMID:10856474.
18. Atramentova, L.O., Utevskaia, A.M., Statistical methods in biology, Kh.:KhNU, 2007, 288 p.
19. Yanez, L.Z., Han, J., Behr, B.B., Reijo Pera, R.A., and Camarillo, D.B., Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization, *Nat. Com.*, 2016, vol. 7, no. 10809. doi: 10.1038/ncomms10809.
20. Gianaroli, L., Magli, M.C., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Borghi, E., and Ermini, B., Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement, *Hum. Reprod.*, 2007, vol. 22, no. 1, pp. 241–9. doi: 10.1093/humrep/del334.
21. Grow, D., Kawwass, J.F., Kulkarni, A.D., Durant, T., Jamieson, D.J., and Macaluso, M., GnRH agonist and GnRH antagonist protocols: comparison of outcomes among good-prognosis patients using national surveillance data, *Hum. Reprod.*, 2014, vol. 29, no. 3, pp. 299–304. doi: https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.05.007.

Надійшла в редакцію 16.03.18
Після доопрацювання 16.04.18
Прийнята до друку 18.05.19