

УДК 57.089.32

<sup>1</sup>С.Б. Байкошкарова\*, <sup>2</sup>М.К. Отарбаев,  
<sup>2</sup>Т.М. Шалахметова, <sup>1</sup>Г.А. Акбердиева,  
<sup>2</sup>Ж.Б. Сабырбек

<sup>1</sup>Клиника репродукции человека «Экомед»,  
Республика Казахстан, г. Алматы  
<sup>2</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби,  
Республика Казахстан, г. Алматы  
\*E-mail: ecomed\_marat@mail.ru

**Исследование качественных показателей  
ооцитов человека как критерия успешной реализации  
витрификации в программах вспомогательных  
репродуктивных технологий**

В настоящее время основной задачей репродуктологии является рациональное использование человеческих гамет и эмбрионов. В программах ВРТ часто можно наблюдать появление ооцитов с различными повреждениями. Эти повреждения ооцитов можно условно разделить на две группы: экстрацитоплазматические и интрацитоплазматические. К экстрацитоплазматическим патологиям относят нарушение строения и формы зоны пеллюцида, дебрис в перивителлиновом пространстве и его резкое увеличение, аномалии первого полярного тела (увеличение в размере, дегенерация, мультифрагментация), а также нарушение симметрии оолецма ооцита. К интрацитоплазматическим аномалиям ооцита, относят гранулярность цитоплазмы клетки, агрегаты гладкого эндоплазматического ретикулаума, рефрактерные тела, вакуоли, нарушение вязкости цитоплазмы. В статье рассматриваются критерии оценки качества ооцитов в криоциклах, а также прогноз успешной реализации криоконсервации методом витрификации в зависимости от качественных показателей клеток.

**Ключевые слова:** вспомогательные репродуктивные технологии, витрификация, качество ооцитов, дисморфизмы, экстракорпоральное оплодотворение.

S.B. Baikoshkarova, M.K. Otarbayev, T.M. Shalakhmetova,  
G.A. Akberdieva, Zh.B. Sabyrbek

**Qualitative research human oocytes, as a criterion  
of the success vitrification in programs  
of the assisted reproductive technologies**

Currently, the main task of reproduction is the rational use of human gametes and embryos. In ART programs can often observe the appearance of oocytes with various damages. These lesions oocytes can be divided into two groups: extracytoplasmic and intracytoplasmic. To extracytoplasmic pathologies include violation of the structure and shape of the zona pellucida, debris in perivitelline space and areas increase, the first polar body abnormalities (increase in size, degeneration, multifragmentation), and violation of the symmetry of oocyte oolemm. To intracytoplasmic anomalies oocyte cytoplasm include granularity, smooth endoplasmic reticulum aggregates, refractory bodies, vacuoles, violation viscosity of the cytoplasm. This article discusses criteria for evaluating oocyte quality in cryocycles and forecast the success of cryopreservation by vitrification, depending on the quality indicators cells.

**Key words:** assisted reproductive technology, vitrification, oocyte quality, dysmorphism, in vitro fertilization.

С.Б. Байқошқарова, М.Қ. Отарбаев, Т.М. Шалахметова,

Ғ.А. Ақбердиева, Ж.Б. Сабырбек

**Қосалқы репродуктивтік технологиялардың бағдарламаларында  
витрификация жүргізудің оңтайлы белгісі ретінде  
адамның ооциттерінің сапалық көрсеткіштерін зерттеу**

Қазіргі кезде адамның гаметалары мен эмбриондарын рационалды пайдалану репродуктологияның негізгі мақсаты болып табылады. ҚРТ бағдарламаларында жиі әртүрлі бұзылыстары бар ооциттерді байқауға болады. Ооциттердің мұндай бұзылыстарын шартты түрде екі топқа бөлуге болады: экстрацитоплазматикалық және интрацитоплазматикалық. Экстрацитоплазматикалық патологияларға пеллюцид аймағының пішіні мен құрылымының өзгеруін, перивителлиндік кеңістіктің үлкеюі және онда дебрисің пайда болуын, бірінші серік денешігінің аномалияларын (көлемінің үлкеюі, дегенерация, мультифрагментация), және ооциттердің оолема симметриясының бұзылыстарын жатқызады. Ооциттердің интрацитоплазматикалық аномалияларына цитоплазманың түйіршіктенуі, тегіс эндоплазматикалық ретикулумның агрегациясы, рефрактерлік денешіктер, вакуольдер, цитоплазма тұтқырлығының бұзылыстары жатады. Мақалада криоциклдарда ооциттердің сапасын бағалау критерийлері және олардың сапасына қатысты витрификация әдісімен сәтті криоконсервация жүргізудің болжамы қарастырылған.

**Түйін сөздер:** қосалқы репродуктивтік технологиялар, витрификация, ооциттердің сапасы, дисморфизм, денеден тыс ұрықтандыру.

В настоящее время основной задачей репродуктологии является рациональное использование человеческих гамет и эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Целенаправленно эту проблему можно преодолеть двумя путями. Первое – ограничить выход биоматериала, используя мягкие/минимальные протоколы стимуляции суперовуляции или обходясь без стимуляции в натуральных циклах, где выход гамет является минимальным соответственно эмбрионов тоже. Однако этот путь имеет свои недостатки (сравнительно более низкая результативность, селективный отбор пациентов, недостаточность биоматериала в программах предимплантационной генетической диагностики, несовершенство индивидуализации протоколов и др.). В этой связи в последние десятилетия бурно начали развиваться технологии криоконсервации гамет и эмбрионов [1, 2]. Прогрессивное развитие этой области криобиологии привело к появлению методов витрификации. С помощью витрификации удалось добиться успешной заморозки и разморозки, таких «капризных», хрупких объектов, как человеческие ооциты. Так, в феврале 1997 г. Итальянская клиника сообщила о рождении здоровой девочки после интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) в замороженный и размороженный ооцит [3, 4]. Технология криоконсервации дает не только возможность рационального использования биоматериала, но и в случае витрификации ооцитов открывает перспективу сохранения репродуктивного по-

тениала на неопределенный промежуток времени, при риске утраты овариальной функции как в случае злокачественных новообразований, так и в силу определенных социальных причин [5,6]. Однако она имеет свои ограничения в виду того, что успешность реализации витрификации зависит от качественных показателей ооцитов [7]. Качество ооцита является важным прогностическим фактором, так как ядерная и цитоплазматическая зрелость клетки напрямую связаны с эффективностью не только витрификации, но и в целом программ ВРТ [8].

Ооцит человека с «идеальными» параметрами имеет светлую умеренно гранулярную цитоплазму, небольшое перивителлиновое пространство, интактное первое полярное тело, круглую и бесцветную зону пеллюцида (ЗР). Все встречающиеся в клинической практике аномалии ооцита можно условно разделить на две группы: экстрацитоплазматические и цитоплазматические. К экстрацитоплазматическим аномалиям относят нарушение строения и формы зоны пеллюцида, дебрис в перивителлиновом пространстве и его резкое увеличение, аномалии первого полярного тела (увеличение в размере, дегенерация, мультифрагментация), а также нарушение симметрии оолемы ооцита. К интрацитоплазматическим аномалиям, определяемым на световом уровне при оценке ооцита, относят гранулярность цитоплазмы клетки, агрегаты ГЭР, рефрактерные тела, вакуоли, нарушение вязкости цитоплазмы [8-14].

Основываясь на вышеизложенном, целью наших исследований было изучение влияния

морфологических показателей ооцитов человека на успешную выживаемость и частоту оплодотворения в циклах криоконсерваций ооцитов путем витрификации.

### Материалы и методы

Описанные в данной статье исследования были проведены в частном медицинском центре (Экомед, г. Алматы, Казахстан). Все участвующие пары подписали письменное информированное согласие на криоконсервацию и культивирование яйцеклеток и эмбрионов. Нами был проведен ретроспективный анализ 60 циклов криоконсервации ооцитов у 60 супружеских пар прошедших различные программы ВРТ в период 2011-2012 года. Возраст женщин варьировал в пределах от 22 до 38 лет. Стимуляцию суперовуляции у женщин проводили по схеме гонадотропинами, контролировали развитие фолликулов с помощью ультразвукового исследования. При достижении доминантными фолликулами размера 18-20 мм вводили триггер овуляции – хорионический гонадотропин (ХГ) в дозе 5-10 тыс.МЕ. Преовуляторные ооциты получали посредством трансвагинальной пункции фолликулов через 35-36 часов после инъекции ХГ.

Оценка морфологических показателей ооцитов производилась через 3,5-4,0 часа после трансвагинальной пункции, путем энзиматического очищения в растворе гиалуронидазы ооцит/кумулюсных комплексов. По выявленным морфологическим аномалиям ооциты были разделены на следующие группы и подгруппы:

Морфологические нормальные ооциты;

Экстрацитоплазматические аномалии:

Ооциты с аномалиями формы (аномалии зоны пеллюцида, аномалии перивителинового пространства);

Ооциты с аномалиями полярных телец;

Ооциты с дебрисом.

Интрацитоплазматические аномалии:

Ооциты с вакуолизацией;

Ооциты с гранулированной и окрашенной цитоплазмой;

Ооциты с агрегацией ЭР и рефрактерными телами.

Смешанные аномалии (экстрацитоплазматические и интрацитоплазматические).

Витрификация и размораживание ооцитов производилась по технологии доктора М. Куваемы с использованием растворов фирмы CryoTech.

### Результаты и обсуждение

Ооциты человека особенно чувствительны к повреждениям при замораживании и размораживании вследствие их размеров (самая большая клетка человеческого тела), сложного строения и особенностей клеточного цикла (незавершенный мейоз).

В практике эмбриолога оценить полученные ооциты затруднительно и возможно лишь после энзиматического удаления клеток кумулюса и *zona radiata*. На световом уровне (максимальное увеличение 400) по выбросу первого полярного тела определяют мейотическое состояние ооцитов (GV, MI, MII), а также можно различить некоторые цитоплазматические аномалии – гранулярность цитоплазмы, вакуолизацию, агрегацию гладкого эндоплазматического ретикулума (ЭР), рефрактерные тела. Каждая из таких аномалий по-своему влияет на выживаемость ооцитов в криоциклах. Технология витрификации доктора М. Куваемы [15], является успешно используемой и наиболее бережной по отношению к ооцитам, однако, она тоже имеет свои ограничения зависящие от качества гамет до замораживания, которые определенным образом влияют на их криотолерантность и интактность внутриклеточных структур после размораживания.

В таблице №1 приведены общие данные наших исследований. Количество и соотношение зрелых, незрелых и дегенеративных ооцитов было нормальным, а значит все манипуляции направленные на получение ооцитов (гормональная стимуляция, аспирация фолликулов, поиск ооцитов) в циклах ВРТ проводились правильно.

Считается, что нужно замораживать только зрелые ооциты на стадии MII. Однако, мы замораживали и ооциты на стадии MI. Частота выживаемости ооцитов составила 96%, при этом, как и ожидалось зрелые ооциты лучше поддавались витрификации, чем незрелые. Но даже при этом из 16 незрелых ооцитов на стадии MI выжило 9 и к нашему удивлению 4 из них самостоятельно дозрели до стадии MII после размораживания, что указывает на сохранность такой хрупкой структуры, как веретено деления ооцитов.

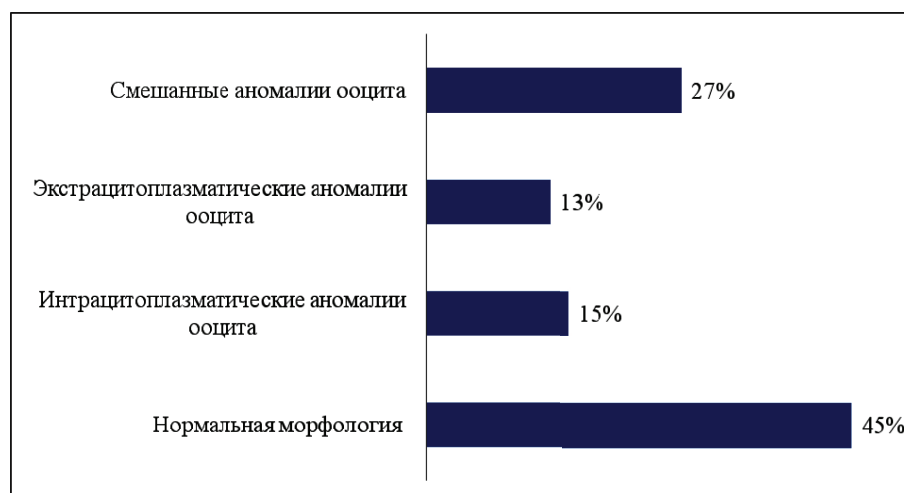
Морфологическая оценка проводилась только у зрелых ооцитов. Результаты выявленных морфологических аномалий показаны на рисунке 1. Как видно на рисунке 1, частота ооцитов с нормальной морфологией составила 45%.

**Таблица 1** – Общая характеристика данных, полученных в циклах криоконсерваций ооцитов в рамках программ ВРТ

| Показатели  | Абсолютное число |
|---|------------------|
| Количество циклов                                 | 60               |
| Количество ооцитов                                | 598              |
| Количество зрелых                                 | 564              |
| Количество незрелых                               | 26               |
| Количество дегенеративных                         | 18               |
| Количество витрифицированных ооцитов              | 570              |
| Количество интактных ооцитов после размораживания | 541              |
| Количество зрелых ооцитов на ИКСИ                 | 536              |

В проведенных нами исследованиях среди ооцитов с аномальной морфологией встречались интрацитоплазматические аномалии 15%, с небольшой разницей экстрацитоплазматические аномалии 13% и сочетанная патология была выявлена у 27%. Эти данные показывают, что каждый второй ооцит имел какую-либо аномалию. Эти изменения мы отнесли к специфическим аномалиям ооцитов в силу их периодических появлений у различных женщин, разного возраста и региона проживания.

Среди дисморфизмов ооцитов, объединенных в группу экстрацитоплазматических аномалий были отмечены: ооциты с аномалиями формы, ооциты с аномалиями полярных телец и ооциты с дебрисом. А в группе интрацитоплазматических аномалий ооцитов были отмечены: ооциты с вакуолизацией, ооциты с гранулированной и окрашенной цитоплазмой, а также ооциты с агрегацией ЭР и рефрактерными телами. Частота встречаемости этих аномалий показана на рисунке 2.

**Рисунок 1** – Общая частота различных аномалий ооцитов в циклах криоконсерваций ооцитов в рамках программ ВРТ

Для удобства расчетов распределение дисморфизмов сделали в сумме общей встречаемости той или иной группы аномалий. Как видно из рисунка 2, в группе экстрацитоплазматических аномалий распределение дисморфизмов было

сравнительно одинаковым в отличие от группы интрацитоплазматических аномалий, где преобладали ооциты с гранулированной цитоплазмой. Это очень интересное явление, если брать во внимание, что в группе смешанных аномалий

частота ооцитов с гранулированной цитоплазмой практически была равна нулю (0,41%), а остальные нарушения встречались в привычных пределах. Возможно, появление этого дисморфизма у ооцитов блокирует появление других морфологических отклонений, либо в сочетании

с другими аномалиями оно приводит к наиболее серьезным повреждением клеток, которое заставляет ооциты дегенерировать в процессе оогенеза и в результате их элиминации общая частота ооцитов с гранулированной цитоплазмой снижается в группе смешанных аномалий.



Рисунок 2 – Частота различных дисморфизмов внутри группы

Итоговым критерием наших исследований было сопоставление морфологических характеристик ооцитов с частотой выживаемости после криоконсервации и нормальным оплодотворением после процедуры ИКСИ.

На рисунке 3 показана частота выживаемости ооцитов после криоконсервации и размораживания. Видна положительная корреляция между морфологическими показателями ооцитов и их криотолерантностью. Чем лучше морфология ооцитов, тем лучше их выживаемость после криоконсерваций. Различные дисморфизмы ооцитов по разному оказывали влияние на криотолерантность ооцитов. Если сравнивать интрацитоплазматические и экстрацитоплазматические аномалии ооцитов, первые оказались более криолабильными в силу своих особенностей. Нарушения цитоскелета клеток в случае экстрацитоплазматических аномалий возможно менее критичны при замораживании, по сравнению с нарушениями метаболизма, представленными при интрацитоплазматических абберациях ооцитов. Необходимо также учитывать особенность соотношения проникающих и непроникающих криопротекторов, используемых

для витрификации ооцитов. Которые, главным образом, направлены на стабилизацию цитоскелета как самого уязвимого звена криоконсервации ооцитов. Данные, полученные в ходе наших исследований, подтверждают эффективность использования, сочетания проникающих и непроникающих криопротекторов. Самой неблагоприятной аномалией ооцитов оказалось появление агрегации ЭР и рефрактерных тел. Однако, даже при этой аномалии частота выживаемости ооцитов составила 87%.

На последнем этапе для подтверждения интактности не только морфологических, но и физиологических, биохимических и генетических структур мы провели исследование частоты нормального оплодотворения ооцитов после процедуры ИКСИ. Как видно на рисунке 4, самая низкая частота нормального оплодотворения, как и ожидалось, была в группе интрацитоплазматических аномалий ооцитов, но общая частота нормального оплодотворения ооцитов составила почти 76%, что является высоким показателем не только успешной криоконсервации но и сохранности внутриклеточных структур ооцитов.

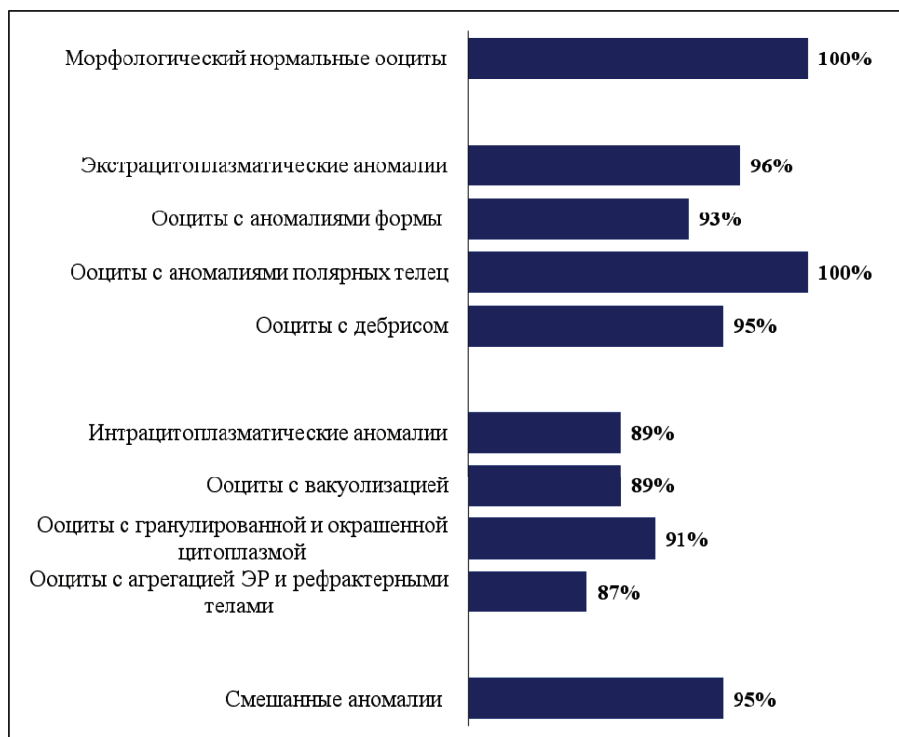


Рисунок 3 – Частота выживаемости ооцитов после криоконсервации

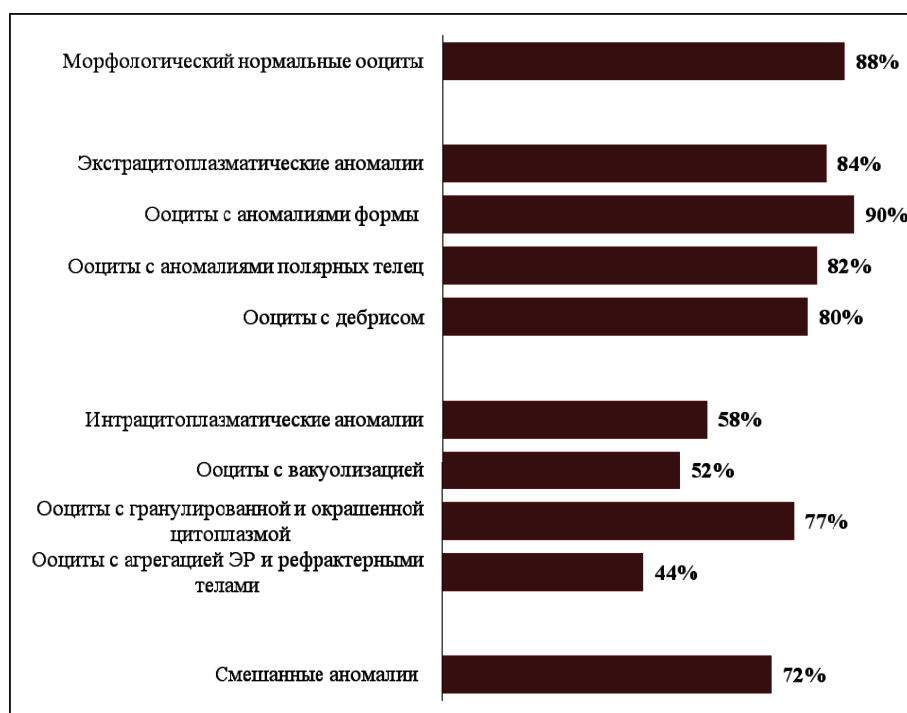


Рисунок 4 – Частота нормального оплодотворения после процедуры ИКСИ



## Выводы

В результате проведенных нами исследований были сделаны следующие выводы:

Выявлена положительная корреляция между морфологическими показателями ооцитов и их криотолерантностью. Чем лучше морфология ооцитов, тем лучше их выживаемость после криоконсерваций.

Различные дисморфизмы ооцитов по разному оказывали влияние на криотолерантность ооцитов. Если сравнивать интрацитоплазматические и экстрацитоплазматические аномалии ооцитов, первые оказались более криолабильными в силу своих особенностей.

Самой неблагоприятной аномалией ооцитов оказалось появление агрегации ЭР и рефрактерных тел.

Высокие показатели нормальной фертилизации ооцитов являются подтверждением не только успешной криоконсервации, но и сохранности внутриклеточных структур ооцитов после размораживания.

Изучение аномалий ооцитов человека в криоциклах имеет значение не только в селекции гамет, но и в понимании роли, а также взаимодействии внутриклеточных структур клеток для нормального завершения процессов оогенеза, оплодотворения и дробления эмбрионов.

## Литература

- 1 Bernard A., Fuller B.J. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives // *Human Reproduction Update*. – 1996. – № 3. – P. 193-207.
- 2 Mandelbaum J., Junca A.M., Plachot M. et al. Cryopreservation of human embryos and oocytes // *Human Reproduction*. – 1988. – № 1. – P. 117-119.
- 3 Porcu E., Fabbri R., Seracchioli R. et al. C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes // *Fertility and Sterility*. – 1990. – № 68. – P. 724-726.
- 4 Nawroth F., Kissing K. Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of cryopreserved human oocytes // *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. – 1998. – № 77. – P. 462-463.
- 5 Noyes N., Labella P.A., Grifo J., Knopman J. Oocyte cryopreservation: a feasible fertility preservation option for reproductive age cancer survivors // *J. Ass. Reprod. Genet*. – 2010. – № 27. – P. 495-499.
- 6 Manipalviratn S., Decherney A. Clinical application of human oocyte cryopreservation // *Rev. Recent. Clin. Trials*. – 2008. – № 3. – P. 104-110.
- 7 Mandelbaum J., Anastasiou O., Levy R. et al. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. – 2004. – № 113. – P. 17-23.
- 8 Макарова Н.П., Калинина Е.А. Критерии оценки качества ооцита в циклах ИКСИ: взгляд клинического эмбриолога // *Гинекология*. – 2012. – № 14. – С. 24-28.
- 9 Курило Л. Закономерности овариогенеза и оогенеза млекопитающих. Хронология и динамика развития гонад, гамет и фолликулов человека и млекопитающих животных. LAP Lambert Academic Publishing; 2012. 292 с.
- 10 Rienzi L., Vajta G., Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature // *Human Reproduction*. – 2011. – № 17. – P. 34-45.
- 11 Hinduja I., Kumar A., Kumar T.C. Ultrastructure of the cortex in the human egg // *Human Reproduction*. – 1989. – № 5. – P. 66-70.
- 12 Balaban B., Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2006. – № 12. – P. 608-615.
- 13 Ebner T et al. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2008. – № 16. – P. 801-807.
- 14 Wells D., Hiller S.G. Polar bodies: their biological mystery and clinical meaning // *Molecular Human Reproduction*. – 2011. – № 17. – P. 273-274.
- 15 Kuwayama M., Vajta G., Kato O., Leibo S.P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2005. – № 11. – P. 300-308.

## References

- 1 Bernard A., Fuller B.J. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives // *Human Reproduction Update*. – 1996. – № 3. – P. 193-207.
- 2 Mandelbaum J., Junca A.M., Plachot M. et al. Cryopreservation of human embryos and oocytes // *Human Reproduction*. – 1988. – № 1. – P. 117-119.
- 3 Porcu E., Fabbri R., Seracchioli R. et al. C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes // *Fertility and Sterility*. – 1990. – № 68. – P. 724-726.

- 4 Nawroth F., Kissing K. Pregnancy after intracytoplasmatic sperm injection (ICSI) of cryopreserved human oocytes // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 1998. – № 77. – P. 462-463.
- 5 Noyes N., Labella P.A., Grifo J., Knopman J. Oocyte cryopreservation: a feasible fertility preservation option for reproductive age cancer survivors // *J. Ass. Reprod. Genet.* – 2010. – № 27. – P. 495-499.
- 6 Manipalviratn S., Decherney A. Clinical application of human oocyte cryopreservation // *Rev. Recent. Clin. Trials.* – 2008. – № 3. – P. 104-110.
- 7 Mandelbaum J., Anastasiou O., Levy R. et al. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2004. – № 113. – P. 17-23.
- 8 Makarova N.P., Kalinina E.A. Kriterii ocenki kachestva oocita v ciklah ICSI: vzgljad klinicheskogo jembriologa // *Ginekologija.* – 2012. – № 14. – С. 24-28.
- 9 Kurilo L. Zakonomernosti ovariogeneza i oogeneza mlekopitajushhh. Hronologija i dinamika razvitija gonad, gamet i follikulov cheloveka i mlekopitajushhh zhivotnyh. LAP Lambert Academic Publishing; 2012. - 292 p.
- 10 Rienzi L., Vajta G., Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature // *Human Reproduction.* – 2011. – № 17. – P. 34-45.
- 11 Hinduja I., Kumar A., Kumar T.C. Ultrastructure of the cortex in the human egg // *Human Reproduction.* – 1989. – № 5. – P. 66-70.
- 12 Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation // *Reproductive Biomedicine Online.* – 2006. – № 12. – P. 608-615.
- 13 Ebner T et al. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum // *Reproductive Biomedicine Online.* – 2008. – № 16. – P. 801-807.
- 14 Wells D., Hiller S.G. Polar bodies: their biological mystery and clinical meaning // *Molecular Human Reproduction.* – 2011. – № 17. – P. 273-274.
- 15 Kuwayama M., Vajta G., Kato O., Leibo S.P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes // *Reproductive Biomedicine Online.* – 2005. – № 11. – P. 300-308.