

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет имени
К.И. Сатпаева

Институт Химических и биологических технологий

Кафедра химической и биохимической инженерии

Музыченко И.А

«Перенос пронуклеусов и донорство ооплазмы как решение проблемы с
митохондриальными мутациями»

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Специальность 6М070100 – Биотехнология

Алматы 2020

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет имени
К.И. Сатпаева

Институт Химических и биологических технологий

Кафедра химической и биохимической инженерии

Музыченко Ирина Александровна

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание академической степени магистра

Название диссертации: «Перенос пронуклеусов и донорство ооплазмы как решение проблемы с митохондриальными мутациями»
Направление подготовки: 6M070100 – «Биотехнология»

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор кафедры «ПЭиБ»
_____ Г.В.Курбанова
«__» _____ 2020 г.

Рецензент
доктор биологических наук,
профессор кафедры «ПЭиБ»
_____ Г.В.Курбанова
«__» _____ 2020 г.

Нормоконтроль,
доктор биологических наук,
профессор кафедры «ПЭиБ»
_____ Г.В.Курбанова
«__» _____ 2020г.

ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ
Заведующий кафедрой химической
и биохимической инженерии
Елигбаева Г Ж

«__» _____ 2020 г.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет имени
К.И. Сатпаева

Институт инженерии высоких технологий

Кафедра «Промышленная экология и биотехнология»

6M070100 – Биотехнология

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой
химической и биохимической
инженерии
Елигбаева Г Ж
« ___ » _____ 2020.

ЗАДАНИЕ

на выполнение магистерской диссертации

Обучающемуся Музыченко Ирине Александровне

Тема: «Перенос пронуклеусов и донорство ооплазмы как решение проблемы с митохондриальными мутациями».

Утверждена приказом руководителя университета №1226-М от «31» октября 2018 г.

Срок сдачи законченной диссертации « ___ » _____ 2020 г.

Исходные данные к магистерской диссертации:

а) Методики применяемые в лаборатории эмбриологии

б) трансвагинальная пункция

в) оценка ОКК и ооцитов

г) Проведение процедур ЭКО и ИКСИ

б) Роль митохондрий в эмбриогенезе

в) Донация ооплазмы

Перечень подлежащих разработке в магистерской диссертации вопросов:

а) основная часть;

б) материалы и методы исследований;

в) результаты исследований и их обсуждение;

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

Рисунок 1 - Схематическое представление процедуры пронуклеарного переноса (PNT) с эмбрионами стадии зиготы

Рисунок 2 - Индивидуальные шаги в передаче веретена деления (ST)

Рисунок 3 - Передача полярного тела 1 (PBI)

Рисунок 4 - Регуляция функции гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы.

Алматы 2020

Рисунок 5 – Кломифена цитрат и гонадотропины
Рисунок 6 - Длинный протокол с аГн - РГ (депо)
Рисунок 7 – « Короткий» протокол с аГн-РГ
Рисунок 8 - Лаборатория ИРМ
Таблица 1- Перечень оборудования в лаборатории ИРМ
Рисунок 9 – Основное оборудование эмбриологической лаборатории
Рисунок 10- Микроманипуляционная система с инвертированным микроскопом
Рисунок 1 - Схематическое представление процедуры пронуклеарного переноса (PNT) с эмбрионами стадии зиготы
Рисунок 2 - Индивидуальные шаги в передаче веретена деления (ST)
Рисунок 3 - Передача полярного тела 1 (PBI)
Рисунок 4 - Регуляция функции гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы.
Рисунок 5 – Кломифена цитрат и гонадотропины
Рисунок 6 - Длинный протокол с аГн - РГ (депо)
Рисунок 7 – « Короткий» протокол с аГн-РГ
Рисунок 8 - Лаборатория ИРМ
Таблица 1- Перечень оборудования в лаборатории ИРМ
Рисунок 9 – Основное оборудование эмбриологической лаборатории
Рисунок 10- Микроманипуляционная система с инвертированным микроскопом
Рисунок 11 – Чашка для промывки ооцитов.
Рисунок 12 - Чашки для ТВПФ
Рисунок – 13 Чашка для ПЭ
Рисунок 14 - Четырехлуночный планшет с ICSI Cumulase
Рисунок 15 - Чашки с центральной лункой или каплями, для культивирования эмбрионов после процедуры ICSI
Рисунок 16 - Чашки для культивирования эмбрионов 1 дня развития.
Рисунок 17 – Ооцит кумулюсный комплекс
Рисунок 18 - ооцит-кумулюсный комплекс в чашке
Рисунок 19 - ооцит-кумулюсные комплексы различной степени зрелости
Рисунок 20 – Денудация ооцита
Рисунок 21- Микроскопический контроль стадии зрелости ооцита
Рисунок 22– Схема морфологически правильного ооцита
Рисунок 23 – развитие эмбриона от 2 бластамерного до 10ти бластамерного
Рисунок 24 - Фрагментация эмбрионов
Рисунок 25 - Множественная вакуолизация
Таблица 2 - Оценка качества эмбрионов по бальной системе (3сутки)
Рисунок 26 – Развитие эмбриона
Рисунок 27 – Эмбрион пятых суток.
Рисунок 28 - Раскрытие полости
Рисунок 29 - Оценка эмбрионов 5-го дня
Таблица 3 - Успешный эмбриологический протокол
Таблица 4 – Расчет показателей лаборатории ВРТ
Рисунок 30 – Количество проведенных программ с 1997 по 2019г.Рисунок 31 – Структура бесплодия
Рисунок 32 – Причины ПЭ

Рисунок 33 – Возрастная категория женщин
Таблица 4 – ЧНБ% в зависимости от возраста.
Рисунок 34 - % нормального оплодотворения
Рисунок 35 - ЧНБ%В возрастной категории до 34 лет
Рисунок 36 - %Потерь (выкидыши, замершие беременности итд)
Рисунок 37 - Критерий take home baby
Рисунок 38 - ЧНБ%От 35 до 40 лет (315 программ из них 164 –IVF и ICSI -151
Рисунок 39 - %Потерь (выкидыши, замершие беременности итд)
Рисунок 40 - Критерий take home baby
Рисунок 41 - Удаление из зиготы пронуклеусы
Рисунок 42– Удаленный один пронуклеос
Рисунок 43– развития эмбриона с пересаженными пронуклеосами.
Таблица 5 - Выбор перспективного эмбриона
Рисунок 44– Деление эмбриона не давший беременности
Рисунок 45 – Деление эмбриона давшего беременность
Таблица 6 - Выбор зуплоидного эмбриона

Рекомендуемая основная литература:

1. Пекарева В.А., Под ред., Т.А.Кодылевой, О.В. Руководство п о клинической эмбриологии М К И ДК Шурыгиной – Самара, 2010. – 306с.:
2. Приказ №67 от 26 февраля 2003г. «О применение ВРТ в терапии женского и мужского бесплодия»
3. Чен, П. Т. К. Секреты репродуктивной медицины : вопр. и ответы, раскрывающие секреты репродуктивной пер. с англ. под общ. ред. В.И. Кулакова. - Москва : МЕДпресс-информ, 2006. - 448 с.
4. Владислав К. М Руководство по вспомогательным репродуктивным технологиям для врачей иэмбриологов.: Издательство медицинских книг, 2011. - 216 с.

ГРАФИК
подготовки магистерской диссертации

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю и консультантам	Примечание

Подписи

Консультантов и нормоконтролера на законченную магистерскую диссертацию с указанием относящихся к ним разделов диссертации

Наименование разделов	Консультанты И.О.Ф. (ученая степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Экономическая часть			
Программное обеспечение			
Нормоконтролер			

Научный руководитель _____ Г.В. Курбанова

Задание принял к исполнению магистрант _____ И.А Музыченко

Дата «___» _____ 2020 г.

АННОТАЦИЯ

Целью исследования является разработка методики переноса пронуклеусов. Работа выполнена в рамках лаборатории ЭКО Института Репродуктивной Медицины.

Было исследовано что с возрастом происходит увеличение количества делеций мтДНК описано в кучевых клетках, которые окружают и метаболически поддерживают ооциты, а цитоплазматические недостатки в целом и митохондриальная дисфункция, в частности, могут способствовать нестабильности ядерного генома в старых ооцитах, что приводит к анеуплоидии эмбрионов. Например, аномалии веретена деления которые были связаны с недостаточными источниками энергии или смещениями в окислительно-восстановительной регуляции.

Продолжение исследований даст клиницистам информацию, которая будет необходима, чтобы продемонстрировать, применимость к определенным категориям бесплодных женщин, процедуры донации ооплазмы, что докажет эффективность устранения митохондриальных дефектов, которые предположительно возникают в ооците реципиента и связаны с гибелью на стадии дробления эмбриона

Ключевые слова: ЭКО, ВРТ, эмбрион, бластоциста, митохондрии, ооциты, пронуклеусы.

ANNOTATION

The aim of the study is to develop a methodology for pronucleus transfer. This work was carried out in the framework of the IVF laboratory of the Institute of Reproductive Medicine.

It was investigated that an increase in the number of mtDNA deletions is described with age, described in cumulus cells that surround and metabolize oocytes, and cytoplasmic deficiencies in general and mitochondrial dysfunction, in particular, can contribute to instability of the nuclear genome in old oocytes, which leads to embryo aneuploidy. For example, anomalies of the fission spindle that were associated with insufficient energy sources or biases in redox regulation.

Continuing the research will give clinicians the information that will be necessary to demonstrate applicability to certain categories of infertile women, ooplasmic donation procedures, which will prove the effectiveness of eliminating mitochondrial defects that are suspected to occur in the recipient's oocyte and are associated with death at the stage of embryo fragmentation.

Key words: IVF, ART, embryo, blastocyst, mitochondria, oocytes, pronuclei.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
- ИКСИ (ICSI) – интрацитоплазматическое внедрение сперматозоида в цитоплазму
- ЭКО (IVF) – экстракорпоральное оплодотворение
- ПГД – преимплантационная генетическая диагностика
- ПЭ – перенос эмбрионов
- СПКЯ – синдром поликистозных яичников
- ТВП – трансвагинальная пункция
- ФСГ – фолликулостимулирующий гормон
- ЧНБ – частота наступления беременности
- ВХ- вспомогательный хетчинг
- GV Germinal Vesicul - зародышевый пузырек
- HTF Human Tubal Fluid - жидкость маточной трубы человека, название среды для оплодотворения и отмывки
- HTF+ HEPES Название среды для промывки фолликулов , забора ооцитов,
- MI Ооцит на стадии метафазы 1-го мейотического деления
- MII Ооцит на стадии метафазы 11-го мейотического деления
- PB Polar Body- полярное тело
- PBS Phosphate Buffer Saline - фосфатный буфер
- PN Пронуклеус
- PVP Поливинилпирролидон
- 1 PB Первое полярное тело, характерно для зрелого ооцита MII, результат первого редукционного деления мейоза - из тетраплоидного набора сформировался диплоидный набор в ооците и диплоидный набор выделен с 1-полярным телом .
- 2 PB Второе полярное тело выделяется в результате активизации ооцита при оплодотворении - со 2-полярным телом , имеющим гаплоидный набор хромосом, ооцит из диплоидного становится гаплоидным
- Sperm Wash Среда для отмывки спермы
- zona pellucida Блестящая оболочка, прилегающая к мембране ооцита
- Бластомер Одна из клеток эмбриона на стадии дробления (до стадии бластоциста включительно)
- Гиалуронидаза Фермент, расщепляющий гиалуроновую кислоту

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	11
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	13
1.1 Энергетические процессы в митохондриях	
1.2 Роль митохондрий в оогенезе и эмбриогенезе	
1.3 Успехи в донация ооплазмы в мире	16
1.4 Менструальный цикл	20
1.5 Схемы стимуляции функции яичников	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1 Объекты исследования и методы исследования	25
2.2 Лабораторное оборудование	
2.3 Подготовка лаборатории ВРТ к работе. Подготовка рабочего места.	27
2.4 Подготовка сред и чашек.	28
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1 Проведения трансвагинальной пункции	32
3.2 Оценка ооцит кумулюсных комплексов	34
3.3 Денудация ооцитов перед ИКСИ	36
3.4 Оценка ооцитов	
3.5 Подготовка спермы. Центрифугирование в градиенте плотности	37
3.6 Метод ИКСИ	38
3.7 Оценка морфологии пронуклеусов	41
3.8 Алгоритм культивирования эмбрионов	
3.9 Методика оценки качества эмбрионов	42
3.10 Индикаторы работы эмбриологии.	47
3.11 Анализ ВРТ программ .	48
3.12 Сравнение программ ICSI и IVF	51
3.13 Донация ооплазмы	53
3.14 Реагенты и оборудывание	54
3.15 Приготовление реагентов	55
3.16 Процедура изоляции пронуклеосов	
3.17 Ожидаемые результаты	
3.18 Выбор перспективного эмбриона на подсадку при помощи технологии Time Lapse	56
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	63
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	64

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения, 1 из 3,500-6000 человек имеют либо болезнь мтДНК, либо подвержены риску развития расстройств, основанных на мтДНК. В настоящее время нет никаких лекарств для устранения митохондриальных заболеваний, а доступные методы лечения, только облегчают симптомы и замедляют прогрессирование заболевания.[1]

Митохондрии представляют собой клеточные органеллы, которые необходимы для производства энергии. Новые данные демонстрируют их роль в развитии ооцитов и эмбриогенезе. В этом обзоре мы рассмотрим недавние исследования на животных и клинические исследования роли митохондрий в фертильности. Неудачные программы ВРТ в основном связаны со старением ооцитов и увеличением анеуплоидии. Как наиболее многочисленная органелла в ооците, митохондрии были определены как ключевые игроки в процессе старения ооцитов, на которые сильно влияет дисфункция митохондрий [2]. При увеличении репродуктивного возраста, повышается дисфункция яичников, что в результате влияет на митохондрии в ооцитах, которые снижают качество ооцитов и его потенциал к оплодотворению и дальнейшему развитию эмбриона[3]. Наследственные по материнской линии митохондриальные (мт) мутации ДНК могут вызывать фатальные (когда не происходит развитие эмбриона либо вообще не происходит оплодотворения) или заболевания у детей с различными синдромами[4], при этом тяжесть заболевания зависит от специфической мутации гена и соотношения мутантной и мтДНК дикого типа (гетероплазма) в каждой клетке и ткани [5].

Практическая значимость. В связи с этим изучение влияния митохондрий на оогенез, на эмбриогенез может внести большой вклад для дальнейших разработок в борьбе с Мт-заболеваниями, а так же увеличением шансов на успешную программу ВРТ для женщин старшего репродуктивного возраста (37 лет и старше), с множественными неудачными попытками (2 и более) не связанный с мужским фактором. В частности, метод переноса пронуклеосов, как новый способ в ВРТ который будет препятствовать передаче митохондриальных заболеваний, вызванных мутации в митохондриальной ДНК (мтДНК)[6]. Если факторы, ответственные за старение ооцитов, ограничены цитоплазмой, а не ядром сама стратегия ядерного переноса может оказаться полезной для преодоления этой форм репродуктивного старения, и позволяют женщинам старшего репродуктивного возраста иметь своих биологических детей[7].

Цель: Разработка методики и изучение возможности применения донации ооплазмы в клинической деятельности.

Для достижения цели работы были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) На основе данных, имеющихся в литературе изучить роль митохондрий в оогенезе и эмбриогенезе.
- 2) Провести все стадии эмбриогенеза согласно эмбриологическому протоколу включающему :
 - a. Оценку ооцит кумулюсных комплексов
 - b. Оценку ооцитов
 - c. Оценку морфологии пронуклеусов
 - d. Подготовку эякулята
 - e. Процедуру ЭКО
 - f. Денудацию ооцитов перед ИКСИ
 - g. Процедуру ИКСИ
 - h. Оценку эмбрионов
- 3) Разработать методику донации ооплазмы

1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Энергетические процессы в митохондриях

Митохондрия является местом катаболизма. Восстановленные коферменты (NADH₂ и FADH₂) из цикла Кребса и окисление жирных кислот доставляют электроны в дыхательную цепь. Митохондриальное окислительное фосфорилирование (ОХРНОС) зависит от активности пяти мультиэнзимных комплексов; Комплексы I – IV составляют цепь переноса электронов, а комплекс V, то есть АТФ-синтаза, продуцирует АТФ, необходимый для энергетических потребностей клетки. Митохондрии генерируют большую часть эндогенных активных форм кислорода (АФК), токсичного побочного продукта ОХРНОС [8]

Передача материнского митохондриального генома потомству имеет большое значение. Митохондрии наследуются по материнской линии, а отцовские митохондрии, при оплодотворении, разрушаются протеолизом.

В митохондриальном геноме всего 37 генов, которые на располагаются как на тяжелой (H-цепи, где преимущество в содержании гуанина) цепи, так и на легкой (L-цепи, где содержится больше цитозина). 13 из которых кодируют синтез субъединиц ферментных комплексов дыхательной цепи, еще 22 гена кодируют синтез транспортных РНК (тРНК), а оставшиеся 2 кодируют синтез рибосомальных РНК (рРНК). [9]

Каждая митохондрия содержит от 2 до 10 копий мтДНК, и поскольку клетки имеют многочисленные митохондрии, клетка может содержать несколько тысяч копий мтДНК. Мутации в мтДНК происходят с десятикратной или более высокой скоростью, чем в ядерной ДНК, возможно, из-за высокой концентрации свободных радикалов кислорода, отсутствия гистонов и ограниченных механизмов репарации мтДНК. [10]

1.2 Роль митохондрий в оогенезе и эмбриогенезе

Рассмотрение вопроса было направлено на метаболическую способность генерировать митохондриями АТФ. Тем не менее, становится все более очевидным, что митохондрии также являются регуляторными агентами в других процессах, вовлеченных в формирование компетентности в развитии, включая гомеостаз кальция и апоптоз [11].

У плода женского пола первичные половые клетки становятся незрелыми ооцитами, называемыми оогония (единственное число: оогониум), которые размножаются и производят первичные ооциты. Количество первичных ооцитов в яичнике плода падает с двух миллионов при рождении до примерно 300 000 в период полового созревания, и каждая клетка содержит приблизительно 6000 митохондрий. Зрелый ооцит содержит от 100 000 до 600 000 митохондрий, каждая из которых содержит одну молекулу мтДНК. После оплодотворения и примерно на шестой день

эмбрионального развития, когда начинается репликация мтДНК, количество молекул мтДНК быстро увеличивается [12]

Митохондрии представляют собой динамические структуры: они движутся внутри клетки и подвергаются слиянию (две митохондрии объединяются в одну митохондрию) и делению (одна митохондрия делится на две митохондрии)[13]. Они агрегируют вокруг веретена во время первого мейотического деления, мигрируют в кору ооцита в контакте с веретеном деления и затем асимметрично распределяются, при этом почти все митохондрии остаются в ооците. Это важно, потому что полярное тело дегенерирует, а митохондрии в ооците являются важными поставщиками энергии для развивающегося эмбриона. Во время второго мейотического деления митохондрии агрегируют вокруг веретена и затем рассеиваются в цитоплазме [14].

МтДНК ооцитов увеличивается до той стадии, которая непосредственно предшествует оплодотворению, что совпадает с овуляцией. У здоровых эмбрионов накопленная мтДНК распределяется поровну между всеми клетками во время эмбриогенеза. Таким образом, количество копий мтДНК на клетку постепенно уменьшается, тогда как клеточные потребности в АТФ, по-видимому, возрастают. Это может быть особенно актуально, так как репликация мтДНК возобновится только на стадии бластоцисты. Это дает возможность предполагать, что как раз на 4ый день культивирования эмбрионы особо уязвимы и подвержены различным внешним воздействиям, предположительно это может быть связано с нехваткой к этому моменту АТФ. Таким образом, поглощение пирувата высоко в зрелом ооците, падает сразу после оплодотворения, а затем достигает пика, а затем снова снижается на стадии морулы [15].

Время начального дробления эмбрионов распределение митохондрий между бластомерами может быть неравным. Всякий раз, когда это происходит, клетки, получающие меньше мтДНК, проявляют пониженную биоэнергетическую способность и, следовательно, бластомеры лизируются и погибают.

Недавние исследования предложили количественное определение мтДНК в клетках кумулюса, гранулезы и трофэктодермы для прогнозирования качества и жизнеспособности эмбрионов[16] пришли к выводу, что содержание мтДНК в клетках кумулюса коррелирует с количеством, обнаруженным в ооците для каждого комплекса кумулюса и ооцитов. Следовательно, они предположили, что митохондриальные характеристики таких клеток могут служить маркерами компетентности ооцитов.

Изменения в уровне метаболизма ооцитов могут происходить во время роста фолликулов, так как развивается заполненный жидкостью антральный отдел и значительно увеличивается скорость перифолликулярного кровотока, что может увеличить внутри фолликулярную концентрацию растворенного кислорода, доступного для ооцита в течение преовуляторного периода

Клеточный гомеостаз Ca^{2+} является результатом потоков Ca^{2+} через плазматическую мембрану и внутриклеточные органеллы. Наблюдается связь между митохондриальным дыханием и уровнем внутриклеточного Ca^{2+} в ооцитах МП и недавно оплодотворенных яйцеклетках [17].

Гормон прогестерон, выделяемый клетками, окружающими яйцеклетку, вызывает резкое повышение концентрации ионов Ca^{2+} в клетке сперматозоида. Ca^{2+} активирует движения сперматозоида, увеличивает чувствительность акросомы и ускоряет акросомную реакцию. Клеточный гомеостаз Ca^{2+} является результатом потоков Ca^{2+} через плазматическую мембрану и внутриклеточные органеллы. В каждой яйцеклетке, непрерывная эндоплазматическая сеть, играет главную роль при движении Ca^{2+} , запускаемых сперматозоидами. Кальций также является основным мультисайтовым активатором окислительного фосфорилирования в митохондриях. Кальций активирует дегидрогеназы цикла Кребса и цепь переноса электронов и оказывает прямое воздействие на АТФ-синтазу F₀-F₁ [18].

В мире проводились исследования, при которых наблюдалась ранняя остановка дробления у гомозиготных эмбрионов определенных мутантных линий мышей была, это связано с необычно высокими уровнями митохондриального окислительного фосфорилирования и, соответственно, высокими уровнями цитоплазматической АТФ. Ситуация, когда количество АТФ превышает нужного для клетки, она может стать токсичной, это связано с повышенными уровнями образования свободных радикалов, которые могут вызвать необратимое повреждение ядра и мтДНК, приводящее к цитоплазматическому разрушению, нарушению митохондрий и, в конечном итоге, смерти от дегенеративных или апоптических процессов.

Митофусин-2 (Mfn2) является митохондриальным белком, который контролирует слияние и присоединение митохондрий, однако последнее исследование предполагает, что небольшая часть Mfn2 присутствует в эндоплазматической сети (ER)

[19-20] Различные исследования сообщают, что Mfn2 играет положительную роль в эмбриональном развитии [19]. Если в зиготах отсутствует Mfn2, образование бластоцисты нарушается. Низкая экспрессия *Mfn2 in vitro* ослабляет скорость образования бластоцисты и скорость дробления у мышинных эмбрионов и вызывает митохондриальную дисфункцию, что подтверждается уровнями АТФ и мтДНК и потенциалом митохондриальной мембраны. Дефицит Mfn2 вызывает апоптоз. Эти данные показывают, что Mfn2 может влиять на развитие предимплантационных эмбрионов [22].

В контексте настоящего обзора апоптоз рассмотрен в качестве основного режима женской фолликулярной атрезии половых клеток. Есть данные, что в целом показатели атрезийных ооцитов у разных видов может быть обратно связана с митохондриальными мутациями, так что атрезия может быть даже средством скрининга aberrантных митохондриальных геномов. В человеческих ооцитах мутированная или удаленная мтДНК во время процесса ЭКО оценивается до 50%.

1.3 Успехи в донация ооплазмы в мире

Ярко выраженные наследственные синдромы, обусловленные мутациями генов, ответственных за митохондриальные белки (синдром Барта, синдром Кернса-Сейра, синдром Пирсона, синдром MELAS, синдром MERRF и другие).

Вторичные митохондриальные заболевания, включающие нарушение клеточного энергообмена как важное звено формирования патогенеза (болезни соединительной ткани, синдром хронической усталости, гликогеноз, кардиомиопатия, мигрень, печёночная недостаточность, панцитопения, а также гипопаратиреоз, диабет, рахит и другие). В одном из исследования группы ученых эмбриологов трансверсия T414G была обнаружена в высокой (до 50%) геномов мтДНК у лиц старше 65 лет, но отсутствовали у молодых людей. Специфичные к ооциту мутации в контрольной области митохондриального генома, один из которых преобладает в ооцитах у женщин старшего репродуктивного возраста. Эта мутация представляет трансляция одной пары оснований тимина (Т) в гуанин (G) в базовой паре 414 (T414G) в митохондриальном геноме. У женщин старше 37 лет частота этой мутации составляла 4% по сравнению с 40% в ооцитах женщин старше 37 лет.[24]

Bottleneck теория гласит что ожидаемая частота и процент мутированной мтДНК в человека должен быть низким или возможно, отсутствует по сравнению с ооцитом и что большой процент ооциты с высокими мутантными нагрузками мтДНК просто умирают или не развиваются в эмбрионы, если они были оплодотворены.[25]

Активные митохондрии у нескольких видов подвергаются пространственному перераспределению в созревающий ооцит и недавно оплодотворенный эмбрион. Подробные исследования с ооцитами хомяков и ранних эмбрионов выявляют картину миграции митохондрий в перинуклеарной области, которая сохраняется на ранних стадиях дробления. Происходит неравномерное распределение митохондрий.

Метод цитоплазматической замены — метод ЭКО, особенностью которого является пересадка цитоплазмы из клеток женщины-донора в яйцеклетку матери. В результате будущий ребёнок получает набор мтДНК из третьего источника.[26]

В Соединенных Штатах в 1996 году эмбриолог Жак Коэн и другие в Институте репродуктивной медицины и науки, Медицинский центр Сен Барнабас в Ливингстоне, Нью-Джерси, впервые использовали цитоплазматический перенос в процедуре репродукции человека. В 1997 году первый ребенок родился с использованием этой процедуры (Эмма Отт). В 2001 году Коэн и другие сообщили, что 10 его детей, близнецов четверо в его клинике в Нью-Джерси и еще шесть детей в Израиле родились

с использованием его техники. Используя модификации его процедуры, ребенок родился в Медицинской школе Восточной Вирджинии, пятеро детей в клинике бесплодия женщин Ли в Тайчжун, Тайвань, близнецы в Неаполе, Италия и близнецы в Индии. В Мексике в апреле 2016 года появился на свет ребенок, операцию проводил в Мексике американский хирург Джон Чан (John Zhang). Место было выбрано в силу того, что законы США пока запрещают применение методики. В Украине появился первый в мире ребенок, который родился после пронуклеарного переноса ядер. Об этом сообщил директор киевской репродуктивной клиники "Надія" Валерий Зукин. Всего, по состоянию на 2016 год, было зарегистрировано около 50 детей во всем мире с использованием цитоплазматического переноса.[27]

Передача пронуклеуса (PNT)

Стадия зиготы у млекопитающих характеризуется наличием двух пронуклеусов (PN), каждая из которых хорошо видна и содержит гаплоидный хромосомный комплект ядерной ДНК из спермы или ооцита (рис. 1). Перенос обоих от одной зиготы к другой был впервые выполнен в начале 1980-х годов, демонстрируя, что манипулируемые мышинные зиготы могут развиваться в живых потомков [28]. Совсем недавно PNT в мыши был использован для моделирования MRT [29].

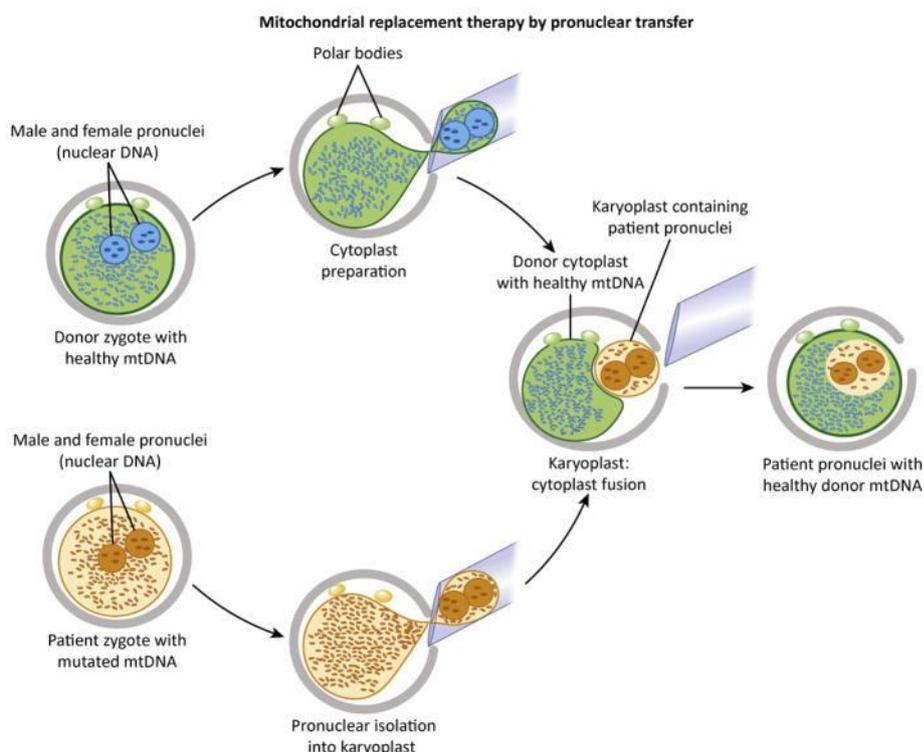


Рисунок 1 - Схематическое представление процедуры пронуклеарного переноса (PNT) с эмбрионами стадии зиготы

В 2009 году ST была впервые внедрена у обезьяны-резуса, демонстрируя, что МРТ можно было выполнить на неоплодотворенной стадии ооцита где эффективность и безопасность были продемонстрированы живыми рожденьями, нормальными кривыми роста потомства и низкими уровнями переноса мтДНК [30-31].

Веретено деление из обоих ооцитов выводятся в кариопласты. Кариопласты из ооцитов пациентов затем сливаются с донорскими цитопластами и оплодотворяются спермой партнера.

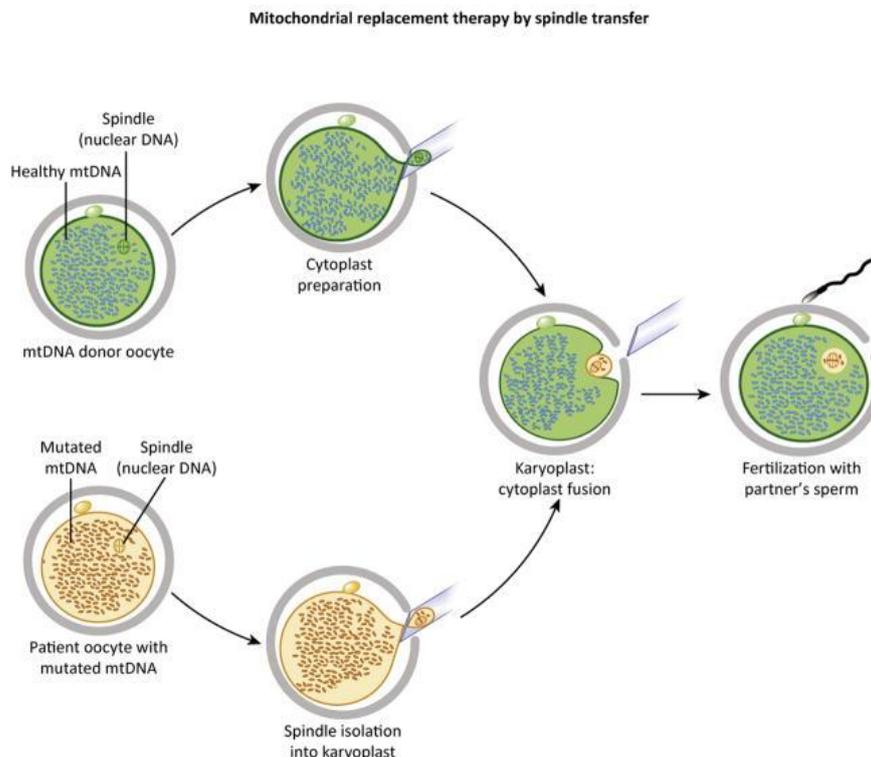


Рисунок 2 - Индивидуальные шаги в передаче веретена деления (ST)

Полярная передача тела (PBT)

Во время мейоза ооцит млекопитающих подвергается двум редуктивным отделам с неравномерной цитоплазматической сегрегацией и абстрагированием двух небольших тел, содержащих как дополнение хромосом. Первый полярный организм (PB1) содержит диплоидный набор хромосом, а второй (PB2) содержит гаплоидный набор. В мыши перенос PB1 или PB2 в соответствующую цитоплазму ооцита или зигота поддерживает нормальное завершение мейоза и полное развитие жизнеспособного потомства [32, 33]. PBT был описан недавно в контексте МРТ [34]

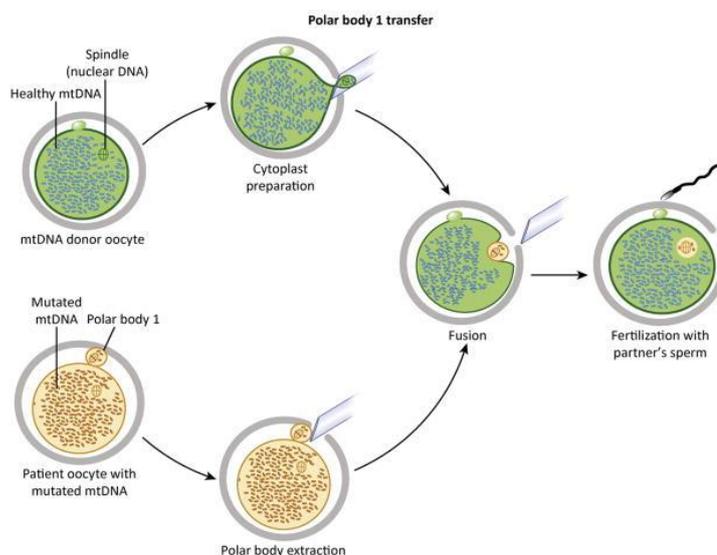


Рисунок 3 - Передача полярного тела 1 (PB1)

Митохондриальные проблемы связаны с возрастом женщины и как следствием увеличением частоты мутаций мтДНК ; они же приводят к снижению метаболической активности у эмбрионов; снижение производства АТФ и; измененный митохондриальный гомеостаз кальция [35]

Более того, с возрастом увеличение количества делеций мтДНК описано в кучевых клетках, которые окружают и метаболически поддерживают ооциты , а цитоплазматические недостатки в целом и митохондриальная дисфункция, в частности, могут способствовать нестабильности ядерного генома в старых ооцитах, что приводит к анеуплоидии эмбрионов. Например, аномалии веретена деления которые были связаны с недостаточными источниками энергии или смещениями в окислительно-восстановительной регуляции [36].

1.4 Менструальный цикл

Сложный периодический процесс, направленный на подготовку организма женщины к оплодотворению и наступлению беременности, называется менструальным циклом (лат. *menstruus* - ежемесячный). Он представляет собой совокупность трех различных событий:

- 1) овариальный цикл, связанный с созреванием и выделением ооцита;
- 2) цервикальный цикл, создающий условия, позволяющие спермиям произвести оплодотворение только в определенный период времени;
- 3) маточный цикл, обеспечивающий необходимые условия для имплантации бластоцисты. Все эти три цикла интегрированы посредством гормонов гипоталамо-гипофизарной системы и яичника[37].

Итак, в самом начале каждого месячного цикла женщины в яичнике имеется несколько (обычно не более 10) фолликулов определенной степени зрелости, которые в данном цикле могли бы полностью пройти этапы созревания и овулировать. Гонадотропин-рилизинг-фактор (гонадолиберин) - пептидный гормон, вырабатываемый в гипоталамусе, переносится в гипофиз, где он контролирует синтез и секрецию гипофизарных гонадотропинов - фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. Непосредственно перед наступлением менструального периода повышение концентрации ФСГ побуждает эту небольшую группу фолликулов к процессам окончательного созревания: в них возрастает количество вспомогательных клеток, входящих в состав фолликула, и происходит увеличение его размеров и размеров ооцита (после образования полости внутри фолликула его называют «вторичным»)[38]

Как уже говорилось, примерно в 98-99% случаев из этой группы полностью созревает только один фолликул (в оставшихся 2% - две или (значительно реже) больше яйцеклеток). Остальные же фолликулы дегенерируют в течение нескольких первых дней цикла. Вопрос о том, как именно происходит выбор из нескольких одинаковых фолликулов того, кому суждено полностью созреть, пока не имеет ответа[39].

После того как ФСГ «Подтолкнул» фолликул к росту и дифференцировке в начале цикла (помимо этого ФСГ индуцирует образование рецепторов к ЛГ на фолликулярных клетках и повышает активность ферментов, отвечающих за синтез эстрогенов), постепенно снижается уровень его концентрации в крови, но перед овуляцией эта концентрация резко возрастает[40].

Количество же ЛГ в первые дни цикла нарастает медленно. Под воздействием этого гормона возобновляется мейоз в формирующихся

гаметах (при этом они получают название ооцитов второго порядка), но до конца он все равно не дойдет - овуляция произойдет после наступления второго блока мейоза (на стадии метафазы II), и этот блок можно будет снять только оплодотворением[41].

Играет свою эндокринную роль и яичник. Клетки созревающего под влиянием ФСГ и ЛГ фолликула начинают выделять стероидные гормоны - эстрогены, оказывающие, как и андрогены у мужчин, общее системное влияние на женский организм. В репродуктивной же системе под влиянием эстрогенов происходит восстановление и разрастание истончившегося во время предыдущей менструации эндометрия, рост желез матки, увеличивается выделение слизистого секрета в шейке матки, расширение шеечного канала, разрастание эпителия внутри млечных ходов молочных желез. Кислая реакция в верхней трети влагалища несколько снижается - так, что жидкие компоненты эякулята уже могут довести рН в этом участке до нужного уровня (спермии, как говорилось ранее, в кислой среде неподвижны). Непосредственно перед овуляцией уровень эстрогенов быстро снижается. Это, как полагают, стимулирует активность мышц фаллопиевых труб, что способствует быстрому транспорту яйцеклетки по яйцеводу[42].

Интересно, что взаимоотношение количества эстрогенов и рилизинг-факторов (гонадолиберинов) гипоталамуса отличается в различные моменты месячного цикла до овуляции. Так, при низкой концентрации эстрогенов в крови (первые дни цикла, фолликул еще растет) у клеток гипофиза, синтезирующих ФСГ и ЛГ, чувствительность к гонадолиберину низкая, а кроме того, его и синтезируется мало[43]. Иными словами, в подпороговой концентрации эстрогены по принципу отрицательной обратной связи угнетают секрецию ЛГ и ФСГ, и их уровень в крови остается низким. По мере созревания фолликула концентрация эстрогенов крови повышается и незадолго до овуляции становится настолько высокой, что чувствительность к гонадолиберину гипофизарных клеток внезапно резко возрастает. По-видимому, одновременно усиливается и секреция гонадолиберина гипоталамусом. Таким образом, теперь эстрогены уже по механизму положительной обратной связи повышают секрецию ЛГ и ФСГ[44].

Максимального размера (до 15-20 мм) фолликул достигает на стадии граафова пузырька (третичного фолликула) к 10-11 дням месячного цикла, т.е. за 3-4 дня до овуляции. Ооцит располагается среди фолликулярных клеток, вдающихся в полость фолликула - в области яйценосного бугорка.

Примерно за сутки до овуляции фолликулярные клетки начинают вырабатывать большое количество эстрогена. Его повышенное содержание стимулирует выброс ЛГ, в результате чего происходит его массивное

выделение. Под воздействием ЛГ на 14-й день цикла стенка фолликула разрывается, и яйцо высвобождается из яичника: происходит овуляция [450].

Вскоре после того, как яйцеклетка выходит из яичника, остатки фолликула под действием ЛГ превращаются в желтое тело. Эта временная эндокринная структура начинает секретировать эстрогены (т.е. желтое тело берет в этом отношении на себя функции исчезнувшего фолликула), но главным ее гормоном становится прогестерон, гормон беременности (лат. pro - в пользу, gestatio - беременность). Дальнейшая судьба желтого тела будет зависеть от того, наступила беременность или нет. Если оплодотворение не произошло, то желтое тело через 2-3 дня начинает регрессировать, а секреция эстрогенов и прогестерона в связи с этим уменьшаться. Снижение в крови концентрации этих гормонов активирует гипоталамус, он побуждает гипофиз к новой выработке гонадотропинов (после овуляции их уровень очень низок), они стимулируют созревание новой группы фолликулов, происходит отслоение слизистой оболочки матки - менструация. Таким образом, начинается новый цикл [46].

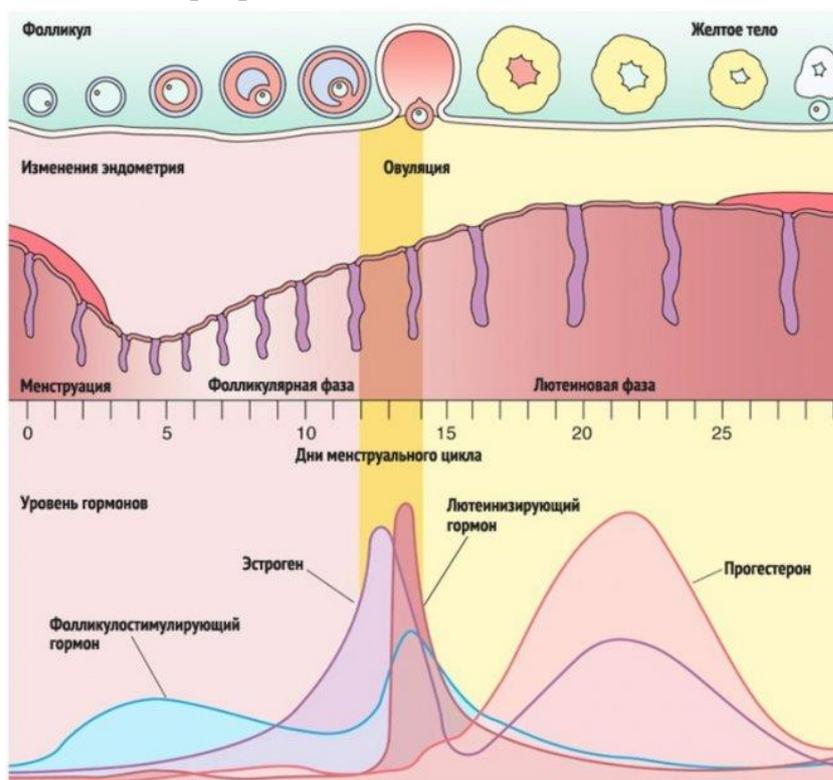


Рисунок 4 - Регуляция функции гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы.

1.5 Схемы стимуляции функции яичников

Кломифена цитрат (КЦ) назначаемый в режиме с 5го по 9-й или же с 3го по 7й дни цикла доза 100 мг в день, может быть эффективен лишь у КЦ – чувствительных пациенток молодого возраста, имеющих нормогонадотропную ановуляцию или СПКЯ, характеризующийся представленными ранее клинико-гормональными параметрами. При адекватном ответе яичников лечение может быть продолжено до 4 циклов, в случае отсутствия беременности целесообразно перейти к другим режимам стимуляции[47].

Периферический антиэстрогенный эффект является недостатком использования КЦ, что проявляется тонким эндометрием и плохими показателями цервикальной слизи. Для преодоления этого негативного момента часто в циклы стимуляции КЦ добавляют эстрогены. Эстрогены можно назначать лишь в конце фолликулярной фазы, не позже периода, когда фолликулы достигают размеров 14-15 мм, что соответствует приблизительно 9-му дню цикла. Наиболее распространенной схемой является назначение КЦ и ГТ в небольших и средних дозах[48].

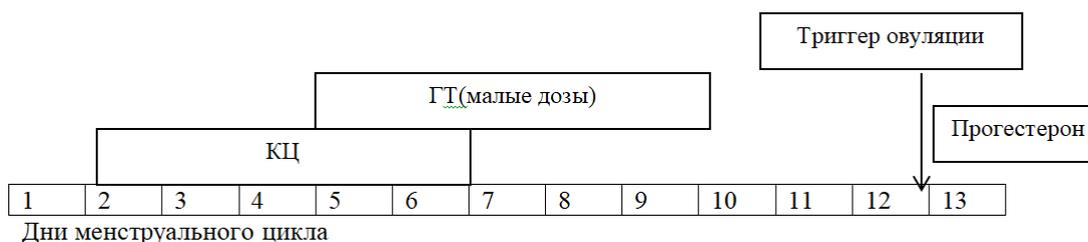


Рисунок 5 – Кломифена цитрат и гонадотропины

Такие методы стимуляции функции яичников применяют практически при всех формах ановуляторного бесплодия, включая синдроме поликистозных яичников, контролируемой индукции овуляции, внутриматочной инсеминации, при идиопатическом бесплодии, эндометриозе, субфертильных показателях спермы. У молодых пациенток с хорошим овариальным резервом предпочтение отдают протоколам КЦ+ ГТ, у женщин старшего возраста (после 30 лет), имеющих более низкие параметры овариального резерва, целесообразно использовать « чистые » схемы стимуляции[49].

Комбинированные протоколы с использованием аналогов Гн-РГ гонадотропин - ризлизинг гормон

Длинный протокол с агонисты гонадотропин - ризлизинг гормон и гонадотропин аГн-РГ+ГТ является классическим при проведении программ ВРТ, хотя может быть применен и при КИО, например, если стимуляция

проводится у пациенток с СПКЯ. Пояснение к протоколам: 1) аГн-РГ назначают с 21-го дня предыдущего менструального цикла в дозе 0,1 мг ежедневно в виде дейли-форм. На фоне продолжающегося введения аП-РГ присоединяют инъекции гонадотропинов, продолжая введение обоих препаратов до назначения триггера овуляции; 2) на 21-й день предыдущего менструального цикла в дозе 3,75 мг вводят аГн-РГ однократно (депо). При достижении десенситизации (2-3-й день менструального цикла) присоединяют гонадотропины [50]. Это наиболее принятая схема стимуляции.

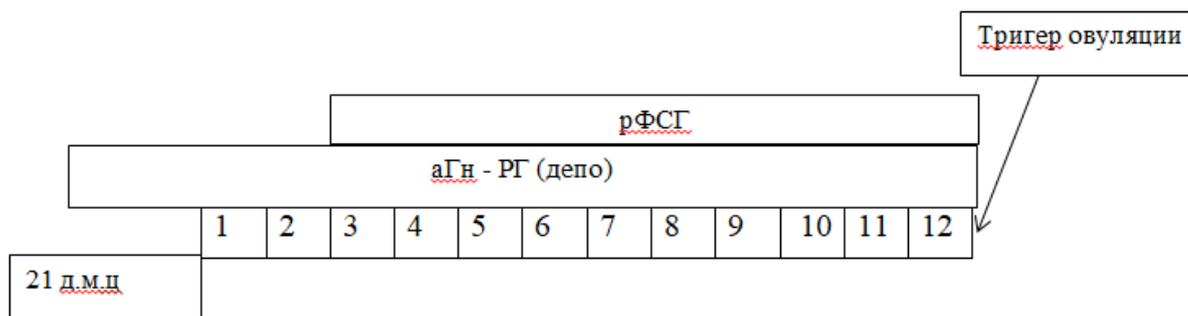


Рисунок 6 - Длинный протокол с аГн - РГ (депо)

Агонисты Гн-РГ используют в так называемых коротких и сверхдлинных протоколах. Короткий протокол рекомендуют пациенткам со сниженным овариальным резервом и «бедным» ответом. Смысл этого вида лечения заключается в том, чтобы в первые дни назначения, а Гн –РГ использовать свойства агониста стимулировать гипоталамо-гипофизарную систему и улучшать ответ яичников.

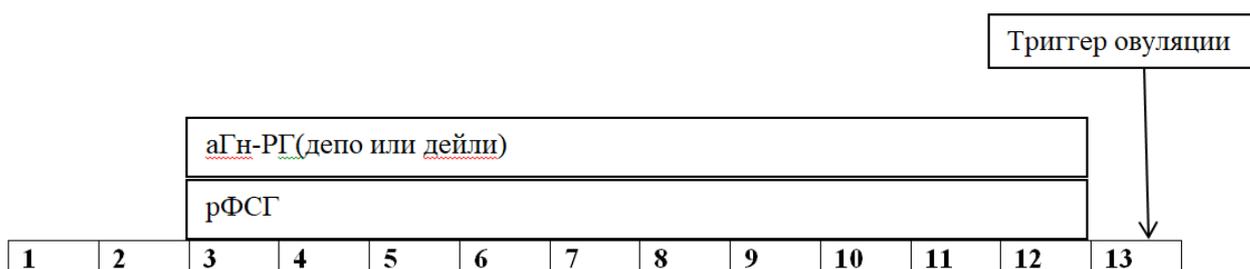


Рисунок 7 – « Короткий» протокол с аГн-РГ

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования и методы исследования

В качестве объекта исследования были взяты ооциты женщин путем проведения транвагинальной пункции, с которыми были проведены различные манипуляции:

- Проведение процедур ЭКО и ИКСИ
- Донация ооплазмы путем переноса пронуклеосов

2.2 Лабораторное оборудование

Лаборатория эмбриологии ИРМ соответствует Европейским стандартам, главной особенностью которой является «чистое помещение» стерильный воздух в эмбриологии и самое совершенное, на сегодняшний день, оборудование.



Рисунок 8 - Лаборатория ИРМ

Лаборатория оборудована в соответствии с количеством циклов, выполняемых процедур и предлагаемых услуг.

Таблица 1- Перечень оборудования в лаборатории ИРМ

Наименование	Количество	Назначение
Ламинарный бокс (класс 1)	4	Получение ооцитов, обработка с подогреваемой поверхностью спермы, работа с ооцитами стола и

		встроенным бинокулярным и эмбрионами микроскопом
Микроскоп, инвертированный	3	Оплодотворение, ИКСИ, контроль с микроманипулятором развития эмбрионов
Инкубатор	6	Инкубатор для подготовки сред и чашек, инкубатор для 2 культивирования
Центрифуга	1	Для обработки спермы
Микроскоп прямой световой	4	Для анализа спермы

CO₂-инкубатор



Стереомикроскоп



Ламинарная система



Инкубатор планшетный



Рисунок 9 – Основное оборудование эмбриологической лаборатории

Количество инкубаторов имеет решающее значение и должно основываться на количестве циклов и продолжительности культивирования. Эмбрионы и гаметы должны распределяться так, чтобы во время культивирования двери инкубаторов открывались редко; все оборудование должно быть проверено и пригодно для использования, иметь РУ; лабораторное оборудование должно проходить регулярную проверку и калибровку (1 раз в квартал). Обслуживание и ремонт должны быть задокументированы. Следует обратить внимание на то, что обслуживание таких инкубаторных систем требует не только специального расходного материала, в том числе желательного использования одношаговой культуральной среды, но и дополнительных сил на обслуживание и анализ видеороликов. Предлагая пациентам видеоролики или фото эмбрионов перед эмбриопереносом.

Микроманипуляторы наиболее простые в применении микроманипуляторы, которые имеют шкалу для установки угла микроинструментов, что важно при проведении ICSI. Наиболее распространенные микроманипуляторы «Narishige», возможно использование как механической, так и автоматической системы.



Рисунок 10- Микроманипуляционная система с инвертированным микроскопом

2.3 Подготовка лаборатории ВРТ к работе. Подготовка рабочего места.

Каждодневной рутинной работой, являлось подготовка лаборатории ВРТ, которая слагалась из следующих пунктов:

1. За 45 минут до начала первой процедуры включить оборудование (микроскопы, ламинарный поток, нагревательные поверхности).

- Проверить исправную работу проточно-вытяжной вентиляции, температуру и влажность в лаборатории, работу всех приборов.
2. Измерить концентрацию CO₂ в инкубаторах, заполнить необходимые листы и журнал регистрации. Произвести измерение других показателей, если это необходимо, а также их калибровку.
 3. Обработать все поверхности и ручки дозаторов и микроскопов 70% этиловым спиртом или специальным нетоксичным для эмбрионов дезинфицирующим раствором.
 4. Проверить наличие всех расходных материалов: перчатки, катетеры для переноса эмбрионов, шприцы, наконечники для дозаторов и стриппетеров.
 5. В конце рабочего дня, по окончании всех выполненных работ, выключить все оборудование. Обработать все поверхности и ручки дозаторов и микроскопов 70% этиловым спиртом или специальным нетоксичным для эмбрионов дезинфицирующим раствором. Проверить исправную работу проточно-вытяжной вентиляции перед выходом из лаборатории.

2.4 Подготовка сред и чашек.

Культуральные среды хранят в холодильнике при температуре 2 – 5 °С. Перед использованием необходимо:

1. Проверить срок годности, целостность упаковки сред.
2. Не использовать, если упаковка повреждена или среда имеет нестандартный цвет.
3. Открыв новый флакон, подписывают дату на упаковке.

Важными являются следующие пункты:

1. Среды разливаются в ламинарно-потокном шкафу на холодной поверхности, в стерильных неталькованных резиновых перчатках, избегая попадания света.
2. Для каждой чашки и для каждого типа среды необходимо использовать новую стерильную серологическую пипетку.
3. Не допускать соприкосновения кончика пипетки с внешними частями флаконов, поверхностью стола и др.
4. Всегда отмерять ровно столько среды, сколько понадобится, возвращать остаток во флакон недопустимо.
5. На всех чашках необходимо подписывать тип среды и дату подготовки. Где требуется, указывают номера эмбрионов.
6. Не следует подготавливать более 4 чашек одновременно.
7. Готовые чашки немедленно относят в инкубатор для уравнивания.

- I. Чашки готовят накануне в конце рабочего дня:

1. 35 мм чашка Петри для промывки ооцитов на ТВПФ изображена на рисунке 11:

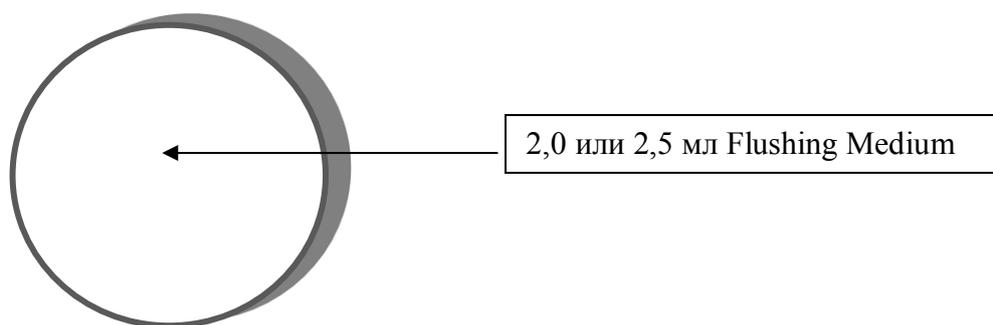


Рисунок 11 – Чашка для промывки ооцитов.

2. Четырехлуночные планшеты и чашки с центральной лункой для ТВПФ изображены на рисунке 12

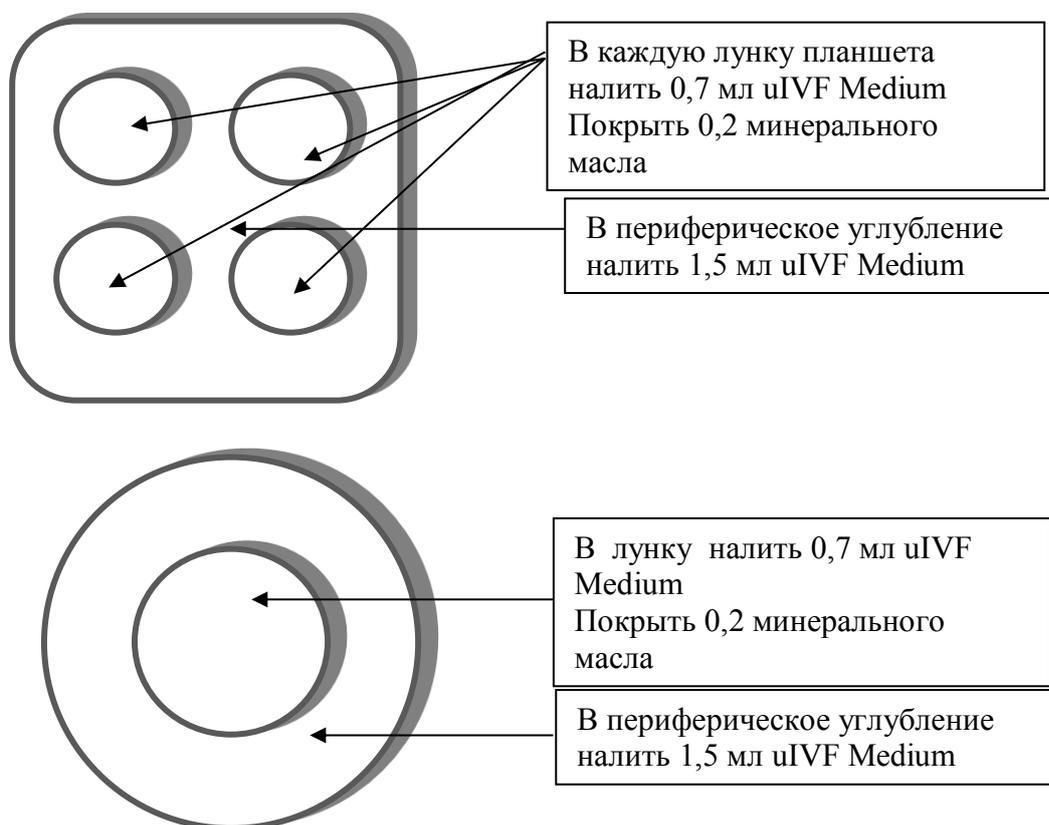


Рисунок 12 - Чашки для ТВПФ

3. Четырехлуночные планшеты и чашки с центральной лункой для оплодотворения по методике классического ЭКО. Готовятся так же как чашки для ТВПФ.
4. Чашка для ПЭ (без масла!) изображена на рисунке 13

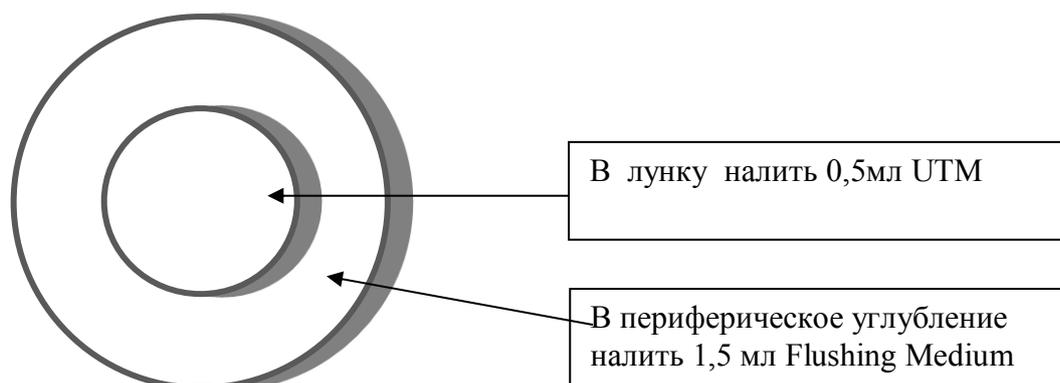


Рисунок – 13 Чашка для ПЭ

5. Четырехлуночный планшет с ICSI Cumulase изображена на рисунке 14

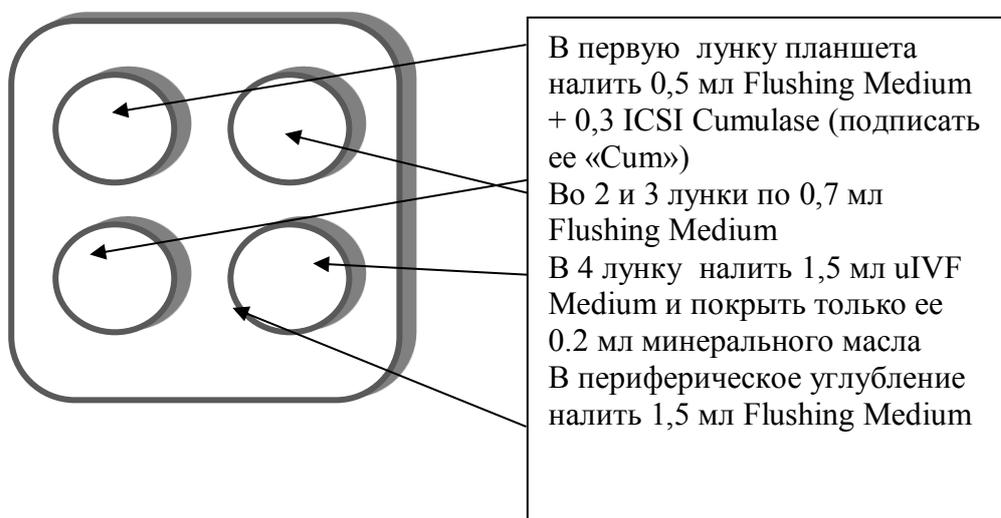
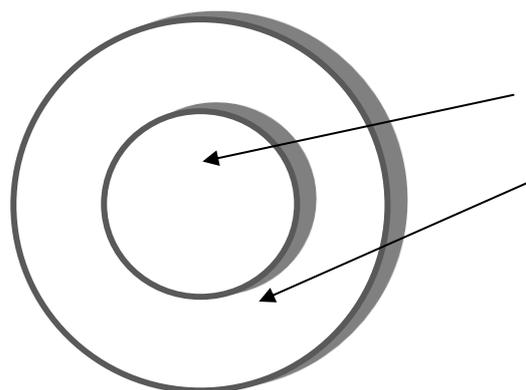


Рисунок 14 - Четырехлуночный планшет с ICSI Cumulase

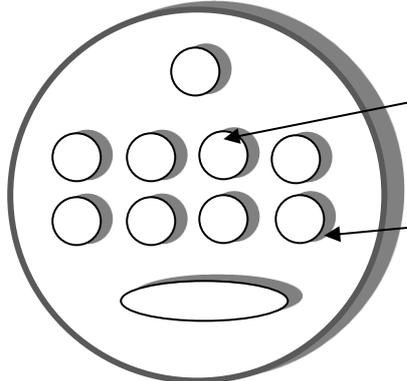
6. Чашки с центральной лункой или каплями, для культивирования эмбрионов после процедуры ICSI изображены на рисунке 15



В лунку налить 0,5 ISM1+0,5 минерального масла
 В периферическое углубление налить 1,5 мл Flushing Medium

Рисунок 15 - Чашки с центральной лункой или каплями, для культивирования эмбрионов после процедуры ICSI

7. Чашки для культивирования эмбрионов 1 дня развития. Готовятся исходя из количества полученных клеток для каждой пациентки. Подписывают фамилию пациентки, номер чашки, номера капель по порядку на дне чашки Рисунок 16.



Капли ISM1 по 25 мкл каждая (по 10 капель или менее в чашку Петри 60 мм и по 4 или менее капель в чашку 35 мм)
 Капли покрыть минеральным маслом: 5.0 мл для 60 мм и 3,0 мл для 35 мм чашки

Рисунок 16 - Чашки для культивирования эмбрионов 1 дня развития.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Проведения трансвагинальной пункции

Трансвагинальная пункция для аспирации фолликулярного содержимого является стандартным методом для сбора ооцитов.

За 2019 г в одной лаборатории ИРМ, где была выполнена лабораторная работа магистерской диссертации, провели 1800 трансвагинальных пункций. Среднее количество ооцитов взятых на 1 пункцию 10 штук. В итоге всего за весь период было найдено 18000 ооцитов. Ниже описана типичная каждодневная процедура ТВП.

Биологический материал: ооцит-кумулюсные комплексы, фолликулярная жидкость.

Реагенты:

- Культуральная среда Fertilization Medium (Cook Medical, Australia, G20719 K-SIFM-20)
- Культуральная среда Gamete Buffer (Cook Medical, Australia, K-SIGB-50)
- Буфер для промывки фолликулов Follicules Buffer (Cook Medical, Australia, K-SIFB-100)

Процедура

Подготовительный этап.

Мы подготовили чашеки Петри. Среды для пункции раскапывали накануне вечером.

На пункцию раскапали: один четырехлуночный планшет Oosafe OOPW-FW01 со средой Fertilization Medium (Cook Medical) покрытый маслом MediCult Liquid Parafin , чашка Петри диаметром 60 мм Nunc Thermo scientific 150260 со средой Gamete Buffer (Cook Medical).

Поместили в инкубатор буфер для промывки фолликулов (на случай, если потребуется промывание).

Подготовка рабочего места

В начале рабочего дня или за 30 мин до первой пункции включили поток воздуха внутри ламинарного шкафа.

Распылителем обработали 70 % спиртом пространство внутри ламинарного шкафа K-System L124, вытерли бумажной салфеткой.

Проведения пункции

Этап проведения пункции заключался в осмотре фолликулярной жидкости на наличие кумулюс-ооцитных масс и их перенос с помощью дозатора в среду отмывания (Gamaete Buffer). Поиск кумулюс-ооцитных масс был произведен в ламинарном шкафу под контролем микроскопа Nikon SMZ 800 .

Просмотр фолликулярной жидкости осуществляли в крышке чашки диаметром 100 мм (недопустимо разбрызгивание содержимого):

Надев латексные перчатки и взяв пробирку с фолликулярной жидкостью из окошка мы аккуратно выливали ее содержимое в крышку чашки Петри, находящейся на обогреваемом столике микроскопа Nikon SMZ 800. При наличии в фолликулярной жидкости образований, подозрительных на присутствие ооцит-кумулясных комплексов, доставали из инкубатора заранее подготовленную чашку Петри Ø 60 мм с центральной лункой с культуральной средой Gamete Buffer и помещали на нагревательную поверхность в ламинарный шкаф.

Следующим этапом мы присоединяли к дозатору стерильный наконечник на 200 мкл и спиривали дозатором ооцит-кумулясные комплексы в чашку Петри Ø 60 мм с центральной лункой;

Обязательным этапом является маркировка с помощью перманентного маркера чашку с культуральной средой, фамилией и инициалами пациентки.

По окончании просмотра содержимого крышки фолликулярную жидкость удаляли в собственную чашку для последующего пересмотра на наличие пропущенных клеток.

При возникновении длительных промежутков времени (более 4-х мин.) между поиском ооцит-кумулясных комплексов и аспирацией фолликулярной жидкости чашка с буфером помещали в инкубатор при температуре 37,1 °С.



Рисунок 17 – Ооцит кумулюсный комплекс

Переносили с помощью дозатора со стерильным наконечником под контролем микроскопа Nikon SMZ 800 полученные ооцит-кумулясные комплексы в четырехлуночный планшет (подготовленную накануне) с культуральной средой Fertilization Medium (Cook Medical, Australia).

Помещали промаркированную чашку с ооцит-кумулясными комплексами в инкубатор при температуре 37,1 °С, концентрацией CO₂ 6,9%

Оформление документации

Затем мы оформляли клинический протокол, где вносит данные о количестве, полученных в результате пункции ооцитов, качестве спермы до и после обработки, наличии/отсутствии промывания, объем среды для промывания.

В эмбриологический протокол заносится так же информация, а также информация о способе обработки спермы, фамилия эмбриолога и врача

пункции, способ оплодотворения, а в случае ИКСИ - названия производителей микроинструментов.



Рисунок 18 - ооцит-кумулюсный комплекс в чашке

3.2 Оценка ооцит кумулюсных комплексов

Не зависимо на вид зрелый ооцит кумулюсный комплекс проводится оплодотворение, только различны методы оплодотворения либо ИКСИ либо ЭКО. Когда мы видим не зрелый ооцит чаще проводится процедура ЭКО. Всего за 2019 г было проведено 1000 программ ИКСИ 300 программ ЭКО, остальные программы заморозки.

Для выполнения оценки качества ооцит кумулюсных комплексов необходимо специальное оборудование – инвертированный микроскоп. В лаборатории имеется инвертированный микроскоп NIKON Eclipse Ti. Данная модель микроскопа позволяет осуществлять визуализацию объектов с увеличением от 40x, 100x, 200x, 400 и 800x. Это достигается благодаря наличию 4 объективов, установленных в револьверном механизме –4x, 10x, 20x и 40x. Для получения более качественного изображения на микроскопе установлена оптическая система НМС –HoffmanModulationContrastsystem, состоящая из поляризатора и светофильтров для увеличения 200x и 400x. Слева на станине микроскопа расположен видеопорт, оборудованный видеокамерой ОСТАХ, подключенной к монитору и программному обеспечению, что позволяет осуществлять видеодокументацию выполняемых процедур. Осветитель микроскопа снабжен галогеновой лампой, кроме того, свет проходит через систему встроенных фильтров, входящих в базовую комплектацию микроскопа. Справа и слева на станине микроскопа располагаются винты грубой и точной фокусировки объекта.

Мы оценивали ооцит кумулюсные комплексы по следующей методике: Ооцит-кумулюсные комплексы классифицируются на 5 классов (Хиллер 1989) по степени зрелости яйцеклетки и ее готовности к оплодотворению.

Класс 1 - незрелый ооцит на стадии профазы:

- клетки кумулюса плотно и компактно расположены вокруг ооцита;
- герминальный визигул виден;
- нет полярного тельца.

Класс 2 – незрелый ооцит на стадии метафаза 1:

- "корона радиата" соединена с зоной пеллюцида, в то время как плотность кумулюсных масс падает и они увеличиваются в объеме;
- нет полярного тельца, нет герминального везикула;
- ооплазма слегка окрашена, иногда немного гранулирована;
- диаметр кумулюсных масс 400-600нм, (что эквивалентно диаметру 3-5 ооцитов).

Класс 3 - зрелый ооцит на стадии метафаза 2 :

- кумулюс низкой плотности, похож на паутину из тонких волокон;
- "корона радиата" все еще состыкована с зоной пеллюцида;
- полярное тельце выступает (часто едва различимо), нет ядра;
- ясная гомогенная цитоплазма.

Класс 4 – лютеинизированный ооцит (перезрелый):

- кумулюс формирует скопления, глыбки, иногда отсутствует;
- "корона радиата" может быть чрезвычайно увеличена, частично отсутствовать или сгущиваться в отдельных участках;
- полярное тельце целое или фрагментированное;
- цитоплазма зернистая, слегка затемненная;
- ооцит круглый, с ровными краями.

Класс 5 – атретический (нежизнеспособный) ооцит:

- дегенеративные изменения представлены в ооците на всех стадиях его развития;
- кумулюсные массы отсутствуют;
- "корона радиата" скученная, бугристая, неровная;
- ядро и полярное тельце дегенерированы, их может и не быть;
- темная, гранулированная цитоплазма;
- поверхность ооцита неровная, форма неправильная;
- четко видимая, темная зона пеллюцида.

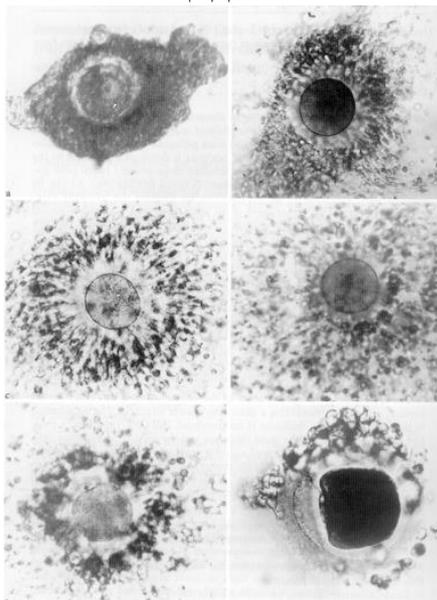


Рисунок 19 - ооцит-кумуляные комплексы различной степени зрелости

3.3 Денудация ооцитов перед ИКСИ

Так как мы изучили то что для старшего репродуктивного возраста эффективнее процедура ИКСИ, мы выбрали именно такой метод оплодотворения. За 2019г эта процедура была проведена 8360 ооцитам. При помощи дозатора на 200 мкл мы помещали ооцит-кумулюсные комплексы в капли для отмывания (с гиалуронидазой) и аспирирует их в наконечник и обратно до удаления клеток кумулюса в течение 30 секунд.

При помощи денудинг-пипетки с внутренним диаметром 170 мкм, присоединенной к денудинг-держателю, аспирировали ооциты в капле гиалуронидазы, после чего из капли раствора гиалуронидазы переносили в каплю Gamete Buffer.



Рисунок 20 – Денудация ооцита
а) не денудированный ооцит
б) ооцит после 20 секунд в гиалурогидазе
с) ооцит после денудации

3.4 Оценка ооцитов

Оценка ооцитов может проводится только после денудации ооцит кумулюсных комплексов. За 2019г денудированно 8360 ооцитов 6640 ооцитов по нашим оценкам оказались зрелыми МII. 720 ооцитов оказались не зрелыми MI и 900 на стадии GV. Дегенерированных всего 100 ооцитов.

Ооциты были оценены по классификации данной ниже.

Классификация ооцитов имеет описательный характер. При осмотре ооцитов мы оценивали

- наличие полярного тела (метафаза II);
- аномалии цитоплазмы (вакуоли, ЭПР, зона некроза, грануляция);
- аномалии перевителинового пространства;
- толщина зоны пеллюцида (ZP до 18 мкм);
- аномалии формы ооцита;
- размер ооцита.



Рисунок 21- Микроскопический контроль стадии зрелости ооцита

Контроль оплодотворения ооцитов осуществляется через 16-17 часов после проведения инсеминации:

- Чашка с культивируемыми ооцитами помещается на подогреваемый столик микроскопа (объективы 10x , 20x) и производится визуальная оценка оплодотворения.
- Отмечается наличие ооцитов с двумя пронуклеусами и двумя полярными телами, заносятся результаты в эмбриологический протокол .

3.5 Подготовка спермы. Центрифугирование в градиенте плотности

Для каждой программы ИКСИ и ЭКО был обработан эякулят для дальнейшего оплодотворения. Из 1000 программ ИКСИ 790 не имели проблем или имели незначительные нарушения в сперматогенезе. 210 мужчин имели не нормозооспермию. Далее описан метод обработки применявшейся в нашей лаборатории.

Данный метод позволяет отобрать сперматозоиды хорошего качества, обеспечив также их отделение от круглых клеток и клеточного дебриса. Суть метода состоит в наслоении нативной спермы на плотностный градиент последующим центрифугированием. Градиент плотности представляет собой коллоидные шарики, покрытые силаном. При центрифугировании различные элементы спермы (семенная плазма, сперматозоиды, лейкоциты, дебрис) распределяются на разных уровнях градиента согласно своей плотности. Кроме того, подвижные сперматозоиды активно проникают через градиент и формируют не- большой осадок на дне пробирки.

Существует два варианта градиентных систем:

- «непрерывный» градиент плотности;

- «ступенчатый» градиент плотности.

Наиболее распространенным является метод «ступенчатого» двукратного градиента плотностей, при котором используют коллоидную взвесь 40% (и качестве верхнего слоя и 90% в качестве нижнего. Обработка сперматозоидов с помощью градиента плотности обычно позволяет получить фракцию высокоподвижных сперматозоидов, свободную от клеточного дебриса, лейкоцито и дегенерированных половых клеток.

Метод флотации (swim-up) Сперматозоиды могут быть выделены благодаря их способности выплывать из семенной жидкости в культуральную среду. Такой метод получил название «флотация» (или «swim-up»)..

Мы обработали сперму путем центрифугированием в градиенте плотности + swim-up: приготовив два раствора среды SupraSperm (90 и 45%) из исходного 100 или 90% раствора SupraSperm, используя среду Sperm Preparation Medium в качестве разбавителя. Подготовили пробирку с градиентом. Для этого в центрифужную пробирку объемом 15 мл внесли 1-2 мл среды SupraSperm 90%, на нее аккуратно наслоили аналогичный объем среды SupraSperm 45%. Поместили пробирку в инкубатор для эквilibрирования на 10-15 минут, отметив на пробирке с градиентом ФИО и номер карты пациентки. Аккуратно наслоили 1,5 мл разжиженной спермы на среду SupraSperm, избегая взбалтывания и перемешивания.

Пробирку с градиентом и спермой центрифугировали с ускорением 2000 об/мин в течение 15 мин. Аккуратно удалили надосадочную жидкость, оставляя осадок со сперматозоидами на дне.

Затем мы провели отмывку сперматозоидов от среды SupraSperm и остатков семенной жидкости. Для этого добавили к осадку 2 мл среды для отмывки спермы Sperm Preparation Medium, перемешать и центрифугировать с ускорением 2000 об/мин в течение 5-7 мин. Удали супернатант и повторили процедуру отмывки. После последней отмывки удалили надосадочную жидкость и аккуратно, стараясь не взболтать осадок, по стенке пробирки настилали на осадок 1мл культуральной среды Sperm Preparation Medium. Для того чтобы подвижные сперматозоиды начали мигрировать в наслоенную среду пробирку поместили в инкубатор на 30-60 мин вплоть до процедуры оплодотворения ооцитов.

3.6 Метод ИКСИ

Метод ИКСИ (от английского ICSI - Intra Cytoplasmic Sperm Injection) базируется на программе ЭКО и ПЭ, являясь одним из вариантов проведения оплодотворения *in vitro*. В отличие от стандартной программы ЭКО, для успеха которой, требуется большое количество сперматозоидов, при ИКСИ в цитоплазму ооцита вводится лишь один сперматозоид, поэтому качество

спермы, как правило, не оказывает влияния на частоту оплодотворения и последующего дробления.

За 1 год было проведено 1000 программ ИКСИ из которых 480 закончились клинической беременностью. Далее описан метод, которым были оплодотворены зрелые денудированные ооциты.

Все зрелые на момент проведения ИКСИ ооциты поместили в капли среды под масло, обработанную сперму добавили в капли с PVP. Скорость движения сперматозоидов в PVP снижается в 2-3 раза, что облегчает манипуляции с ними. Успех ИКСИ оценивается по результатам оплодотворения.

Оплодотворение методом ИКСИ мы провели через 3 часа после получения ооцитов.

Оборудование

Для проведения ИКСИ необходим инвертированный микроскоп. В лаборатории ИРМ имеется инвертированный микроскоп NIKON Eclipse Ti. Данная модель микроскопа позволяет осуществлять визуализацию объектов с увеличением от 40x, 100x, 200x и 400x.

Это достигается благодаря наличию 4 объективов, установленных в револьверном механизме –4x, 10x, 20x и 40x. Для получения более качественного изображения на микроскопе установлена оптическая система НМС –Hoffman Modulation Contrast system, состоящая из поляризатора и светофильтров для увеличения 200x и 400x. Слева на станине микроскопа расположен видеопорт, оборудованный видеокамерой ОСТАХ, подключенной к монитору и программному обеспечению, что позволяет осуществлять видеодокументацию выполняемых процедур. Осветитель микроскопа снабжен галогеновой лампой, кроме того, свет проходит через систему встроенных фильтров, входящих в базовую комплектацию микроскопа. Справа и слева на станине микроскопа располагаются винты грубой и точной фокусировки объекта.

Техническое обслуживание

Для качественной визуализации объектов необходима регулярная обработка оптической части микроскопа 70° спиртом и протирание специальными салфетками всех частей микроскопа для удаления частиц пыли.

Процедура.

Для проведения ИКСИ мы провели некоторые подготовительные процедуры. Перед работой установили на инвертируемом микроскопе объектив в 10* и включаем осветитель микроскопа.

Вначале проводится проверка работоспособности электрической части микроманипуляционной установки. Установили нужную высоту и угол наклона держателей (высота и угол зависит от модели микроинструментов и указывается в их спецификациях). Вставили стерильные микроинструменты (микроигла для ИКСИ и холдинг- пипетка для удержания ооцита) в соответствующие держатели микроинструментов, ориентируя и фокусируя микроинструменты в поле зрения на увеличении 100x.

Непосредственно перед ИКСИ мы заполнили поочередно пипетки раствором РVP): вначале заполняется удерживающая, а затем инъекционная пипетка (увеличение x 100).

Дебушированные ооциты перенесли в чашку для ИКСИ в каждую каплю с раствором Gamete Buffer добавляется по одному ооциту. Во вторую каплю (справа) раствора РVP добавили суспензию заранее обработанной спермы

Чашку для ИКСИ поместили на обогреваемый столик микроманипуляционной установки с настроенными микроинструментами, которые опустили в нижнее положение.

Обездвиживание сперматозоида изображение сфокусировали на нижней капле раствора РVP. Далее микроигла опустили в первую (слева) каплю раствора РVP. Инъектором в микроигле создали отрицательное давление и раствор РVP аспирировали в микроиглу. Микроиглу перевели в каплю РVP со спермой (справа). Изображение сфокусировали на сперматозоидах, отбирали подвижный и морфологически нормальный сперматозоид, обездвижили прижатием микроиглы к кончику хвоста и аспирируется хвостом вперед в полость иглы путем создания отрицательного давления. Затем микроиглу перевели в каплю с ооцитом.

Ориентировка положения полярного тела ооцита. Удерживающую присоску опустили в каплю с ооцитом и ооцит с помощью микроинструментов ориентируется так, чтобы полярное тело располагалось в положении 12 часов, созданием отрицательного давления ооцит зафиксировали присоской. Такое расположение ооцита способствует наименьшей вероятности попадания иглы в зону веретена деления.

Технические особенности процедуры инъекции

Микроиглу подвигли к оболочке ооцита, сфокусировали я по центру ооцита, созданием положительного давления сперматозоид переместили к кончику микроиглы. Сфокусированную иглу переместили вплотную к блестящей оболочке ооцита в положении "3 часа" и создали положительное давления в игле сперматозоид переместили к кончику иглы. Иглу плавно вводили в цитоплазму ооцита через блестящую оболочку (избегать прокалывания цитоплазмы с противоположной стороны!). Затем в инъекторе микроиглы создается отрицательное давление, при котором вязкая цитоплазма прорывается, сперматозоид попадает в иглу; при прорыве цитоплазмы происходит скачок, после которого немедленно создается положительное давление, при котором сперматозоид с содержимым цитоплазмы поступает в ооцит, после чего микроигла осторожно удаляется из ооцита.Процедуру ИКСИ повторили для всех ооцитов.

После выполнения данной процедуры ооциты с помощью денудинг-пипетки с внутренним диаметром 170 мкм перенесли в четырехлуночный планшет с чистой средой Fertilization Medium . На следующий день перед оценкой оплодотворения, ооциты рассадили в индивидуальные микрокапли со средой Sage-1.

3.7 Оценка морфологии пронуклеусов

Из 6640 энуклеированных ооцитов, оплодотворилось 5577.

Контроль оплодотворения осуществлялся по следующим критериям:

- наличие двух пронуклеусов;
- наличие двух полярных тел
- схождение/ несхождение пронуклеусов;
- размер пронуклеусов по отношению друг к другу;
- расположение пронуклеусов;
- наличие вакуолей, аномалии цитоплазмы.
- Контроль оплодотворения ооцитов

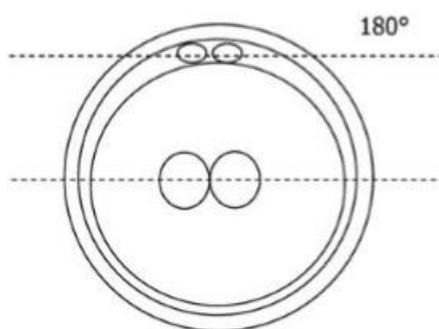


Рисунок 22– Схема морфологически правильного ооцита

3.8 Алгоритм культивирования эмбрионов

Ниже описан алгоритм культивирования эмбрионов которому мы следовали.

День 1.

Через 16-18 часов после оплодотворения.

1. Перенесли оплодотворенные зиготы в капли по 1 эмбриону, капли пронумеровали. Номер эмбриона соответствует его номеру в протоколе.
2. Оценили оплодотворение.
3. Отметили аномалии клеток.
4. Занести данные в протокол культивирования.

День 2.

Оценку производили спустя -45 часов после оплодотворения.

1. Оценили дробление. Оценили количество и морфологию бластомеров: равенство, сферичность, наличие фрагментации, мультинуклеации и вакуолей. Занесли данные в протокол.
2. Исключили из культивирования неразвивающиеся эмбрионы, эмбрионы с >50% фрагментации и эмбрионы с мультинуклеацией.

День 3.

Оценку произвели спустя 67-69 часов после оплодотворения.

1. Оценили дробление.
2. Исключили из культивирования неразвивающиеся эмбрионы, эмбрионы с >50% фрагментации и эмбрионы с мультинуклеацией.

День 4.

Эмбрионы не оценивали

День 5.

Оценку производили через 115 часов после оплодотворения.

3.9 Методика оценки качества эмбрионов

Мы использовали систему оценки по Gardner et al. Fertility and Sterility 2000, V.73, N6. Получив 3178 морфологически пригодных для подсадки эмбрионов. Используемая методика описана ниже.

Время оценки, после инсеминации

- **морфологии зигот:**

на **1 день:** через 16-18 ч. – наличие 2 пронуклеусов (PN) и 2 полярных тел (PB)

- **качества эмбрионов:**

на **2 день:** через 40-44 ч. – наличие 4-5 бластомеров

на **3 день:** через 64-68 ч. – наличие 6-8 бластомеров

на **4 день:** через 88-92 ч. – образование морулы

на **5 день:** через 112-116 ч. – образование бластоцисты

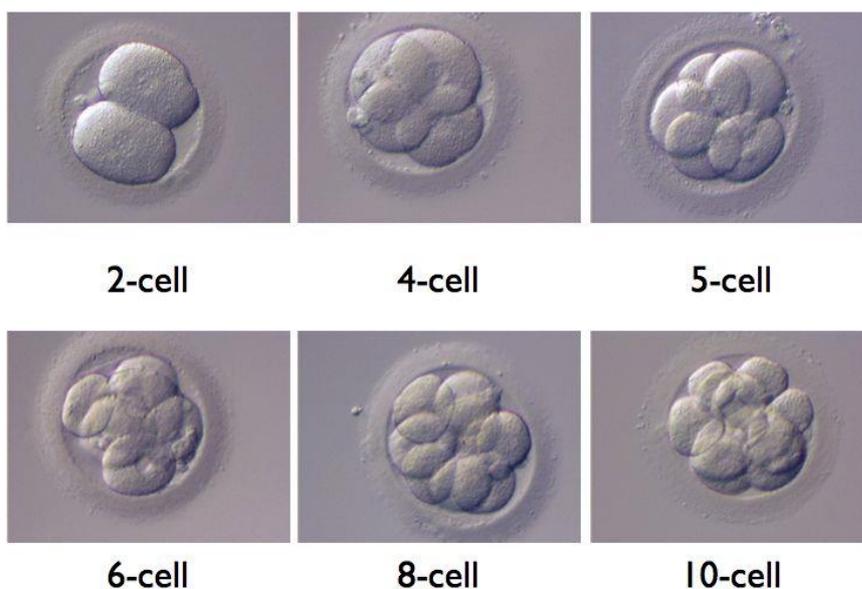


Рисунок 23 – развитие эмбриона от 2 бластамерного до 10ти бластамерного

Фрагментация

При делении эмбриона на бластомеры происходит отщипывание цитоплазмы не содержащая ядра. Фрагменты не содержат генетической информации.

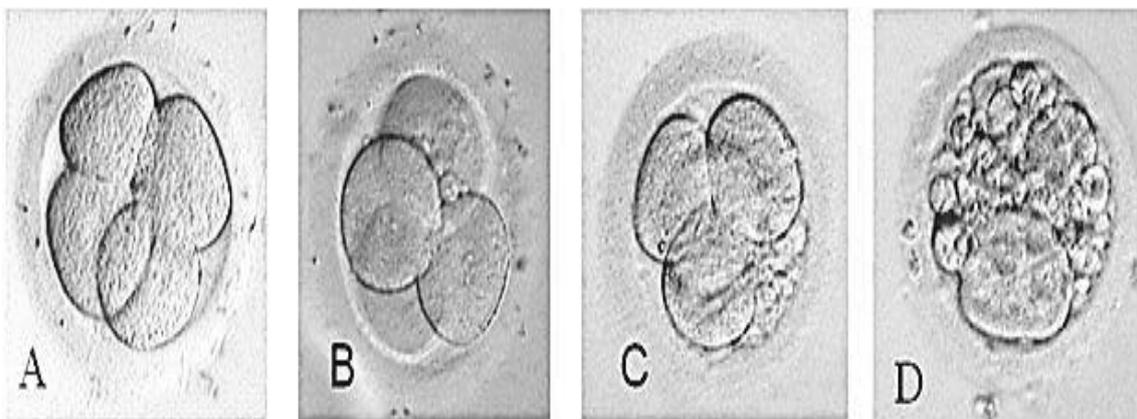


Рисунок 24 - Фрагментация эмбрионов

- A) Эмбрион без фрагментации**
- B) Эмбрион с незначительным процентом фрагментации**
- C) Эмбрион с фрагментацией в 20%**
- D) Эмбрион с фрагментацией более 40%**

Вакуоли — это окруженные мембраной цитоплазматические включения, наполненные жидкостью.



Рисунок 25 - Множественная вакуолизация

Таблица 2 - Оценка качества эмбрионов по бальной системе (3сутки)

№	Количество бластомеров	Фрагментация	Равность бластомеров	Сферичность бластомеров	Другая патология	Баллы
	4					3,5
	4	15				3,0
	4		+	+		2,5
	4	15	+	+		2,0

Причины остановки эмбрионов в развитии:

1. Эмбриональные причины: (внутренние) неконтролируемые :

- Хромосомные нарушения у эмбриона
- Дефекты внутриклеточных структур
- Сбои в активации генома клетки .

2. Внешние причины или контролируемые:

- Оснащение лаборатории
- Культуральные среды и материалы
- Температура
- Качество воздуха в лаборатории
- Исправная работа инкубаторов для поддержания оптимальных условий для эмбрионов
- Профессионализм и командная работа сотрудников лаборатории

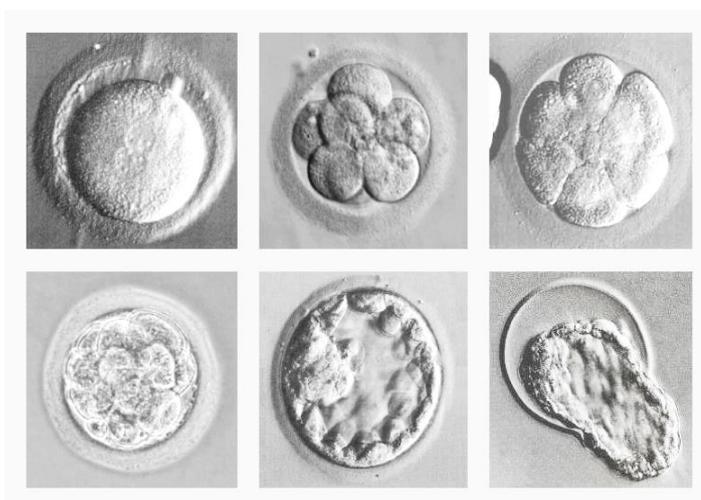


Рисунок 26 – Развитие эмбриона.

Оценка качества эмбриона 5 дня

Цифрами обозначается размер бластоцисты - стадия ее экспансии.

Первая буква обозначает качество внутренней клеточной массы - массы клеток, из которой в будущем будет развиваться сам эмбрион.

Второй буквой аббревиатуры обозначается качество трофобласта - клеточного слоя, полностью окружающего бластоцисту. Он отвечает за внедрение эмбриона в стенку матки - имплантацию.

Оценка эмбрионов 5-го дня

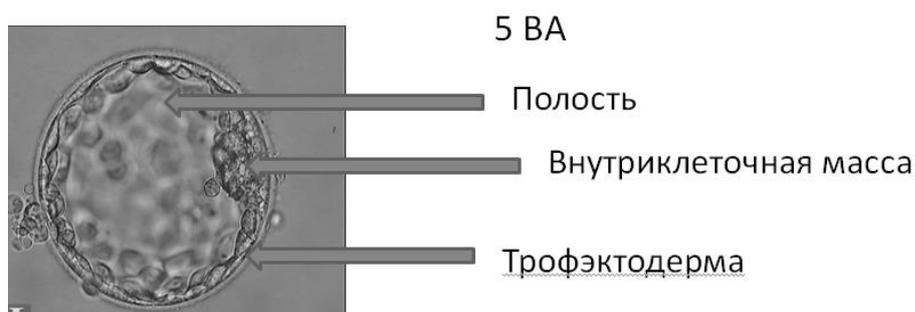


Рисунок 27 – Эмбрион пятых суток.

Внутриклеточная масса

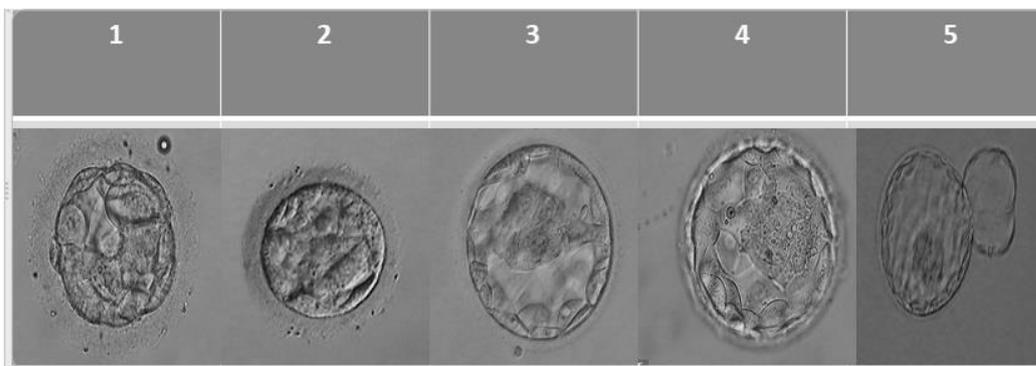


Рисунок 28 - Раскрытие полости



Рисунок 29 - Оценка эмбрионов 5-го дня

Таблица 3 - Успешный эмбриологический протокол

Количество растущих фолликулов	12
Количество полученных ооцитов	10
Количество зрелых ооцитов	8
Количество нормально оплодотворенных ооцитов	6
Количество бластоцист хорошего качества (5-6 сутки)	4 и 1 на перенос 3 на криоконсервацию (витрификация)

3.10 Индикаторы работы эмбриологии.

Основными индикаторами соответствия являются качественные характеристики культивирования показатели лаборатории ИРМ мы рассчитали в соответствии рекомендациям ВОЗ (таблица 2)

Таблица 4 – Расчет показателей лаборатории ВРТ

ИНДИКАТОРЫ ВРТ	2018	Контр. величины
Число ооцитов на цикл ЭКО/ИКСИ (среднее)	10,05	7--12
% зрелых ооцитов на цикл ЭКО/ИКСИ (среднее)	73%	>85%
Частота оплодотворения ЭКО (2PN), %	83%	>65%
Частота оплодотворения ИКСИ (2PN), %	84%	>60%
Аномальное оплодотворение ЭКО, %	11%	<10%
Аномальное оплодотворение ИКСИ, %	2%	<10%
% дегенерированных ооцитов ИКСИ (дег/инъец) , %	8%	<12%
Частота дробления ЭКО, %	100%	>95%
Частота дробления ИКСИ, %	100%	>95%
% выхода бластоцист ЭКО/ИКСИ	59%	>25%
% выхода бластоцист ЭКО, всего, %	62%	
ЭКО (отл.+хор. кач-ва), %	48%	
% выхода бластоцист ИКСИ, всего, %	57%	
ИКСИ (отл.+хор. кач-ва), %	41%	
Число эмбрионов на ЕТ (среднее)	1,5	<1.5
% эмбриопереносов ЭКО/ИКСИ (если ооциты получены), %	59%	> 9 5 %
Заморожено эмбрионов от числа дробившихся ЭКО/ИКСИ, всего , %	49%	>15%
Заморожено эмбрионов на 6 сутки от общего количества замороженных, %	14%	
hCG положит тесты ЭКО/ИКСИ/ЕТ , %	49%	>30%

Клин. беременность (подтверждение на УЗИ/ЕТ) , %	48%	>25%
% ранних потерь (до 12 недель)		
* % всех дегенерированных ооцитов на ТВП+ИКСИ		

3.11 Анализ ВРТ программ .

По расчетам, сделанным на основе данных клиники ИРМ , количество пациентов страдающими бесплодием с каждым годом только увеличивается. Это демонстрируется на графике ниже (рисунок 30).



Рисунок 30 – Количество проведенных программ с 1997 по 2019г.

Была исследована структура бесплодия 1946 пациентов . Причины бесплодия оказались различными, однако можно сказать, что женский фактор превосходит мужской.

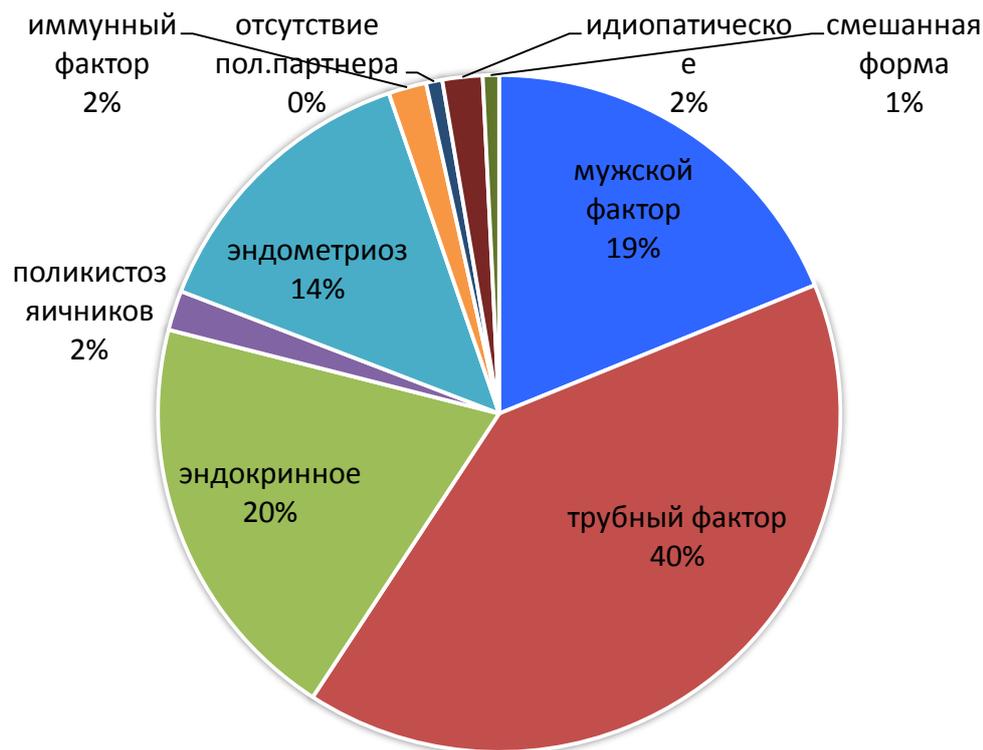


Рисунок 31 – Структура бесплодия.

Так же были исследованы причины отмен в циклах ЭКО. Всего за год их составило 480. Довольно большой процент составил по причине плохого качества яйцеклеток и эмбрионов.



Рисунок 32 – Причины ПЭ

Была проанализирована возрастная категория женщин, 43% женщин старше 34 лет.

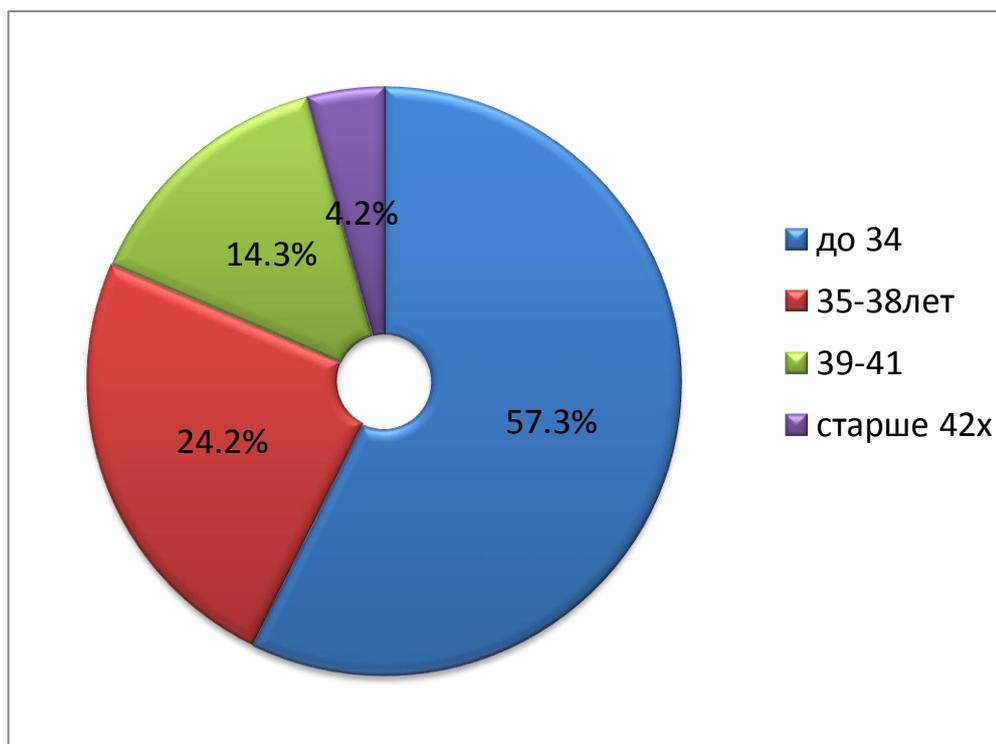


Рисунок 33 – Возрастная категория женщин

Далее была рассчитана эффективность в зависимости от возраста пациентки. Чем старше возраст пациентки тем ниже эффективность программы, что продемонстрировано в таблице 4 .

Таблица 5 – ЧНБ% в зависимости от возраста.

Возраст	Кол-во циклов	Беременности	ЧНБ, %
До 34	1490	641	43%
35-38	630	252	40%
39-41	370	81	22%
42 и старше	110	19	17%
Всего	2600	1014	39%

3.12 Сравнение программ ICSI и IVF

Такое сравнение между программами ICSI и IVF исследовалась для того что бы понять действительно ли в старшем репродуктивном возрасте оплодотворение и развитие нормального эмбриона хуже по причине цитоплазматических нарушений.

В первую часть было включено 458 программ, в 199 случаях -IVF и в 259 – ICSI, в котором был исключен мужской фактор, возраст супруги до 40 лет.

Во вторую части 791 протокол. Материнский возраст: 1) от 25 до 35 лет (424 программы из них 243 - IVF и ICSI – 241) 2) от 35 до 40 лет (315 программ из них 164 –IVF и ICSI -151) Включили следующие факторы: - Смешанный фактор бесплодия; - В исследования включены лишь чистые программы IVF либо ICSI; Были исключены: - мужской фактор; - программы с переносами эмбрионов “плохого” качества.

В первой части в группе ICSI % нормального оплодотворения составил 78 %, в то время как в группе IVF 80%. Разница между ними статистически не значима. Аномального оплодотворения составило 10,5 % в группе IVF, в сравнении ICSI 1,7% .

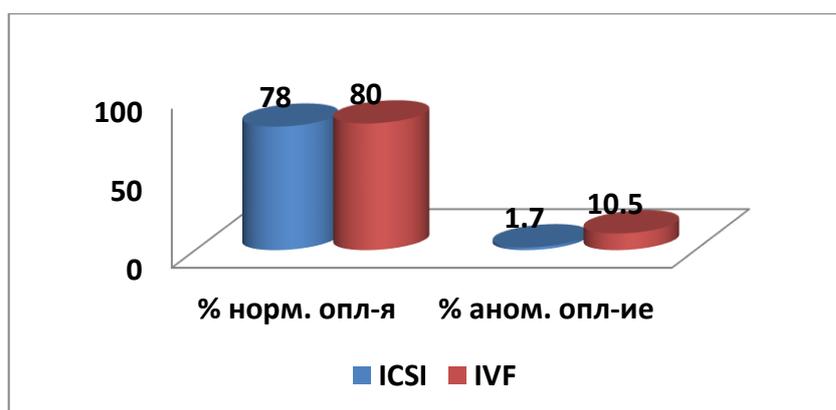


Рисунок 34 - % нормального оплодотворения

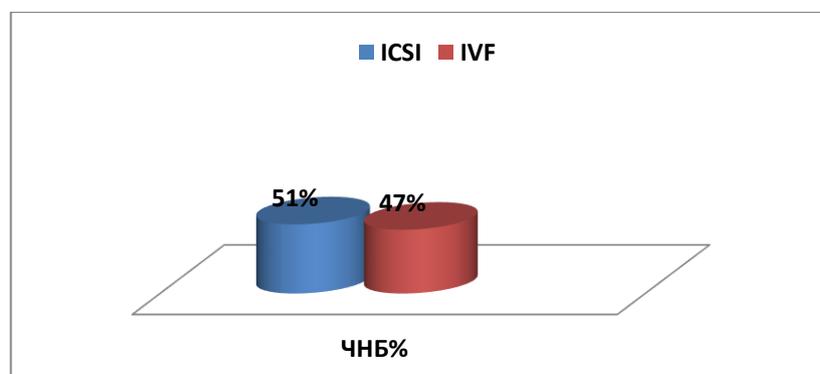


Рисунок 35 - ЧНБ%В возрастной категории до 34 лет

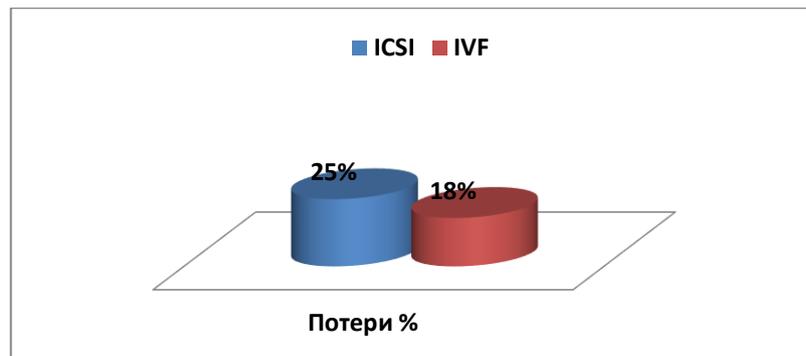


Рисунок 36 - %Потерь (выкидыши, замершие беременности итд)

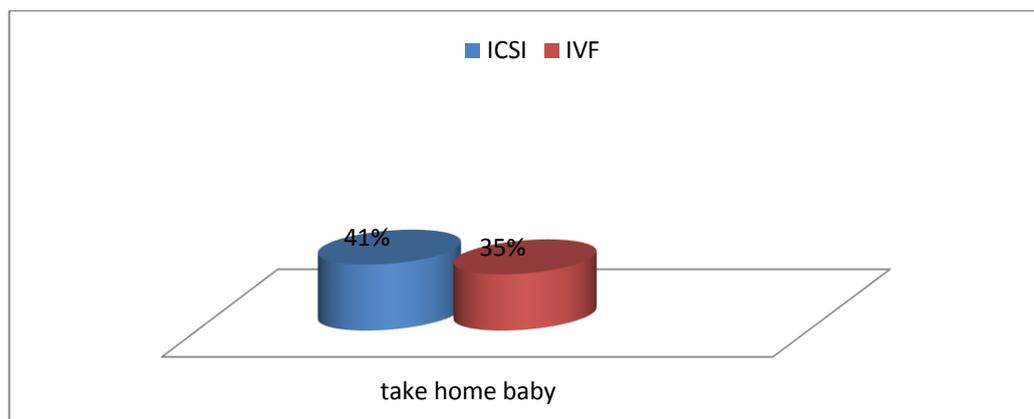


Рисунок 37 - Критерий take home baby

Во второй части исследовали частоту наступления беременности, потери (выкидыши, замершие беременности), индикатор take home baby. В возрастной категории до 34 лет ЧНБ% 47% в IVF группе и 51% в ICSI ($t = 0,8$), показатель статистически не значим. Потери составили 25% в группе IVF и 18% в группе ICSI (критерий достоверности $t = 1,09$), показатель статистически значимую разницу не подтвердил. Критерий take home baby 41% в группе ICSI, 35% в группе IVF, что на 6% меньше. ($t = 1,23$), что статистически не значимо. От 35 до 40 лет (315 программ из них 164 –IVF и ICSI -151) В этой возрастной категории ЧНБ% 36% в IVF группе и 55% в ICSI ($t = 2,8$), что статистически значимо. Потери в обеих группах составили 28-29%. Критерий take home baby на 9% выше в группе ICSI, 24% и 35% соответственно. ($t = 1,8$), что статистически значимо.

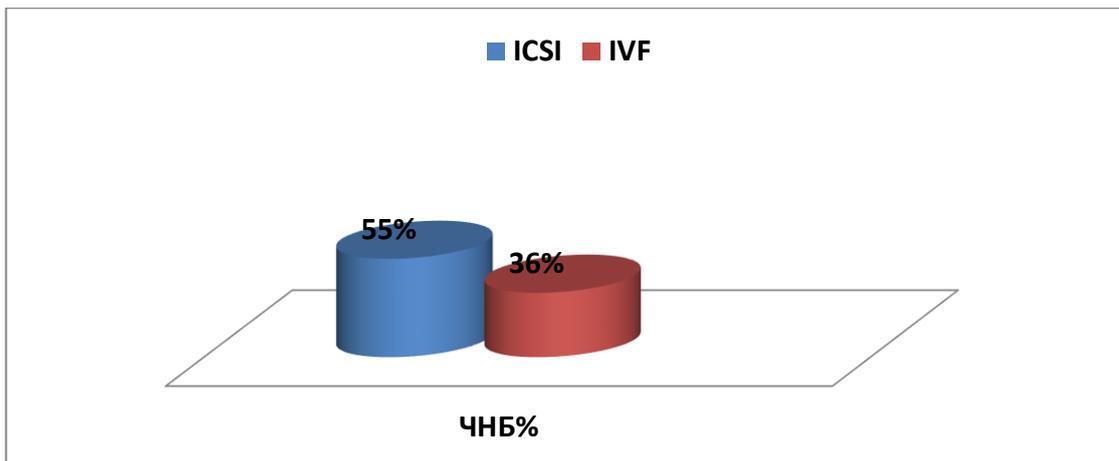


Рисунок 38 - ЧНБ% От 35 до 40 лет (315 программ из них 164 –IVF и ICSI -151)

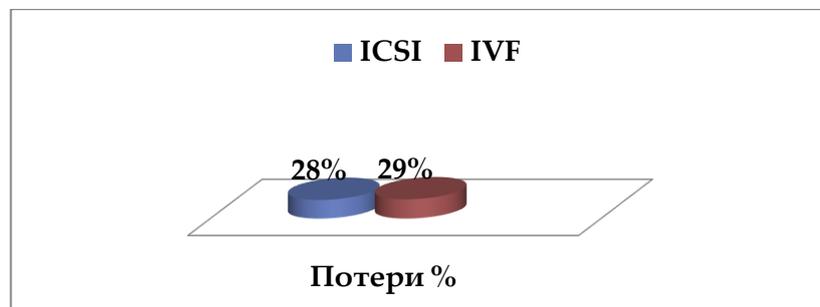


Рисунок 39 - %Потерь (выкидыши, замершие беременности итд)

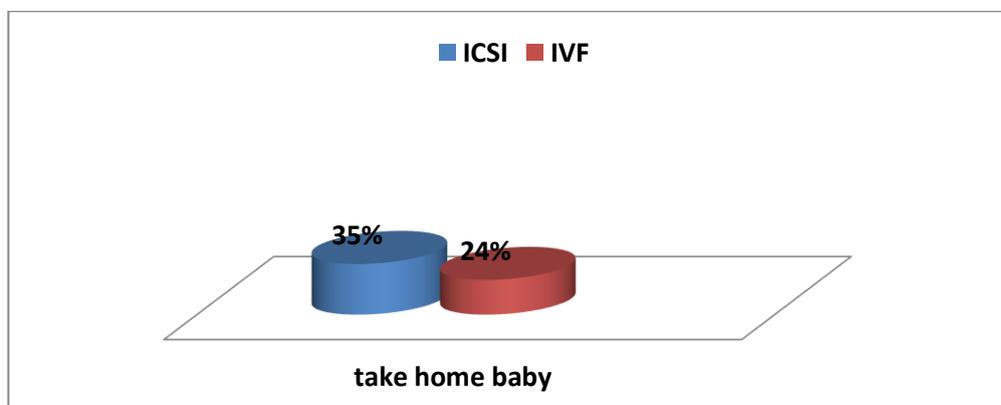


Рисунок 40 - Критерий take home baby

3.13 Донация ооциты

Мы опишем подробную разработанную нами методику для передачи пронуклеусов в клинической модели. У модельных пациентов успешная ядерная передача была достигнута между зиготами полиплоидами, в связи с невозможностью использовать анеуплоидные эмбрионы пациентов без их согласия.

Выбор этой стадии ооцитов был сделан по причине видимости ядер, а также возможности выделения и трансплантации. До недавнего времени передача генетического материала в зрелые ооциты считались недостижимыми из-за уникальной биологической характеристики МП. В отличие от GV зрелые ооциты не требуют созревания *in vitro*. У людей в *in vitro* созревание GV-интактных ооцитов неэффективно и связано с плохим развитием после оплодотворения. Зрелые яйцеклетки МП, регулярно извлекаются в клинических программах экстракорпорального оплодотворения. Митохондрии равномерно распределены в ооцитах МП, в следствии при переносе хромосом не возникает никакой обнаруживаемой гетероплазмы мтДНК в полученных эмбрионах и их потомстве.

Протокол включает конкретные реагенты, материалы и оборудование, необходимые для проведения этих процедуры. Мы также иллюстрируем пошаговые методы микроманипуляций. Большинство поддерживающих методов ВРТ, необходимых для хромосомы передача осуществляется в клинических лабораториях ЭКО. К ним относятся сбор ооцитов МП, оплодотворение интрацитоплазматической инъекцией спермы (ICSI) и культурой эмбриона *in vitro*. Все эти процедуры описаны выше. Описанные процедуры манипуляции являются универсальными, что означает, что критическое оборудование, реагенты и этапы микроманипуляции, описанные здесь, являются оптимальными для успешно выполняемой работы.

3.14 Реагенты и оборудывание

Реагенты и оборудывание использованные при работе донации ооплазмы представленны ниже.

Реагенты :

- NEPES medium
- среда эмбриона irvine
- Цитохалазин В
- Диметилсульфоксид (ДМСО)
- Набор для слияние клеток Gamete buffer
- Минеральное масло
- Высоковязкое силиконовое масло

Оборудование:

- Инвертированный микроскоп (Olympus)
- Рассеивающий стереомикроскоп (Olympus)
- поверхности с подогревом для микроскопа (Tokai Hit)
- Микроманипуляторы (Narishige)
- Держатели микропипетки (Narishige)
- холдинг пипетки, внутренний диаметр угол 35 °

Для изоляции пронуклеусов, мы рекомендуем использовать микропипетки для биопсии полярного тела Она больше чем пипетка энуклеации, SM30

- Пипетка интрацитоплазматической спермы (ICSI)

- Лазерный объектив
- Инкубатор CO₂ / O₂ для поддержания 6% CO₂, 5% O₂ и 89% культуры эмбрионов N₂ условия
- В качестве альтернативы, предварительно смешанный газ может использоваться для заполнения модульной камеры инкубатора Cell Culture Dish, микроманипуляция, совместимая
- Четырехлунчный планшет
- 60мм чашки Петри

3.15 Приготовление реагентов

В качестве HEPES среды возможно использовать либо Flushing либо HTF в нашем эксперименте использовался Flushing . Эти среды используются для обработки ооцитов и спермы во время сбор и манипуляции. Необходимо что бы все реагенты были тщательно проверены для достижения желаемых результатов.

Подготовка среды для культивирования эмбриона. В нашем случае мы использовали одноступенчатую среду Irvine. Отрегулируйте pH до 7,4 и осмолярность до 277 ± 5 .

Предварительно эквilibрируйте в инкубаторе при 37 ° C в течение минимум 4 часов перед использованием. Эта среда используется для культивирования ооцитов и эмбрионов

Поливинилпирролидон. PVP можно хранить в течение 3 месяцев при температуре 4 ° C. Это среда используется для иммобилизации спермы во время ИКСИ. 1 мг цитохолозина, смешать с 200 мкл ДМСО. Разделите этот основной запас по 5-мкл аликвоты и хранить до 6 месяцев при -20 ° C. Для приготовления микроманипуляционной среды для извлечения пронуклеосов рекомендуется добавить 1 мкл этого раствора в 1 мл среды Flushing. Выполняются все описанные манипуляции переноса пронуклеосов этой среде.

3.16 Процедура изоляции пронуклеосов

Изоляция пронуклеосов занимает 0-1 ч. Поместив от трех до пяти зигот от реципиента и донора. Мы высаживали зиготы в манипуляционную среду, за 5 мин до начала работы с клетками. Ооциты и эмбрионы чувствительны к температуре и должны поддерживаться при температуре 37 ° C . Все процедуры манипуляции должны проводиться в тускло освещенной комнате и при температуре (30 ° C).

Использовали режим лазерной панели управления, который интегрирован с программным обеспечением Oosight.

Опустив пипетки для обездвиживания отдельного ооцита на удерживающей пипетке holding. Перемещали пипетку с прикрепленным ооцитом на видимый REDi-лазер мишень и поместили цель в zona pellucida рядом с

пронуклеосами. Слегка опустив удерживающую пипетку с прикрепленным ооцитом и осторожно нажав на ооцит на дно чашки, чтобы стабилизировать его во время изоляции пронуклеусов.

Сосредоточили цель на пронуклеусах и довели кончик пипетки энуклеации до той же фокальной плоскости.

Убедились, что пипетка энуклеации и пронуклеусы находятся в такой же экваториальной фокальной плоскости, осторожно высунув ооцит с пипеткой без пронизывания zona pellucida. Сделали отверстие в зоне рядом с пронуклеосами с помощью лазера, начиная с внешнего слоя зоны.

Необходимо избегать создания большого зазора в зоне, мы оставили тонкий неповрежденный внутренний слой в zona pellucida. Это предотвратило утечку цитоплазмы из зоны. Медленно вставив пипетку через прорезь в zona pellucida перемещали по ее отверстию.

Медленно аспирируя пронуклеосы с минимальным количеством цитоплазмы проверили наличие пронуклеосов в пипетке. Медленно вынули пипетку из щели в zona pellucida.

Плазматическая мембрана растянулась и образовала тонкий мост между клеткой и пронуклеосами. Быстрое движение энуклеации в положение «6 часов» разрушило этот мембранный мост

Выпустив пронуклеосы в каплю для манипуляции рядом с энуклеированной яйцеклеткой. Переместили обе пипетки во вторую каплю манипуляции, содержащую яйцеклетки от второй женщины. Повторили шаги энуклеации, описанные выше для первой зиготы. Во избежание случайного смешивания хранили зиготы и пронуклеосы от каждой пациентки в отдельных каплях. Необходимо избегать контакта между пронуклеосами и маслом в пипетке так как это может вызвать лизис. Чтобы минимизировать шаги манипуляции (вытеснение пронуклеосов из пипетки во время промежуточной стадии) и избежать кариопластического лизиса, мы немедленно осуществляли передачу пронуклеоса от одной женщины в реципиента другой женщины. Оставляя изолированные пронуклеосы в течение длительного времени может привести к прилипанию мембраны на дно чашки и возможному лизису. Избегайте чрезмерного количества среды в пипетке, это может создать карман в перивителлиновом пространстве во время переноса пронуклеосов

Пронуклеосы замочить в растворе с цитохалозином + ДМСО до переноса. Последний шаг, был перенос пронуклеосов ко второй женщине проникая через тоже отверстие .

После зиготы должны были тщательно промыты в Gamete buffer и оставлены на 2-3 часа в целях восстановления. Культивировать эмбрионы в среде для эмбрионов Irvine описано выше.

3.17 Ожидаемые результаты

Все методы, описанные выше, потребуют определенных навыков микроманипуляции, что требует практики, прежде чем пытаться выполнить

эту процедуру. Если специалист выполняет манипуляции высокопрофессионально, изоляция пронуклеусов может быть успешно достигнута. Экспериментальные примеры во время переноса хромосомы показаны на рисунках ниже



Рисунок 41 - Удаление из зиготы пронуклеусы

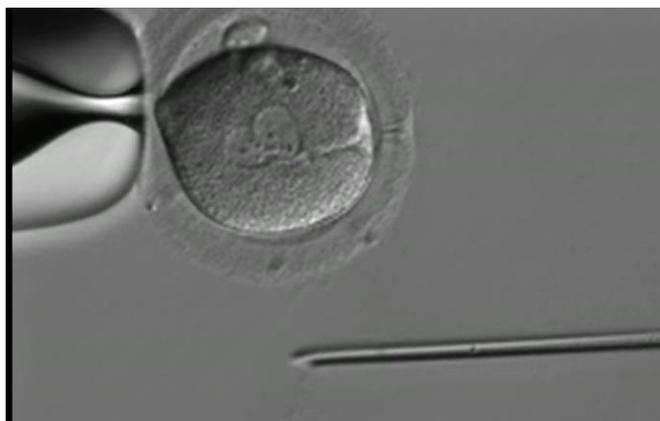


Рисунок 42– Удаленный один пронуклеос

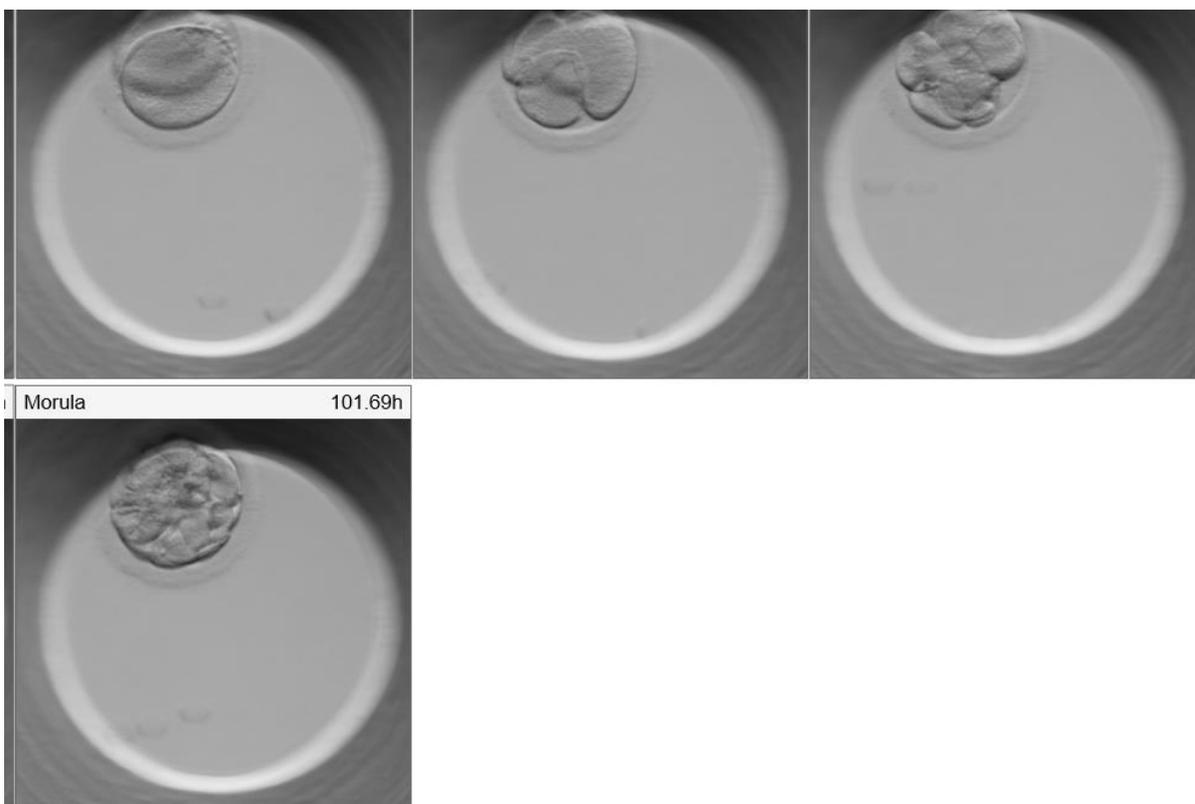


Рисунок 43– развития эмбриона с пересаженными пронуклеосами.

3.18 Выбор перспективного эмбриона на подсадку при помощи технологии Time Lapse

В перспективе после донации ооплазмы необходимо выбрать эмбрион для трансфера в полость матки. С помощью новейшей технологии мы разработали наилучший метод выбора перспективного эмбриона.

- Было проанализировано 45 эмбрионов подсаженных в свежем цикле.

16 из которых дали хорошего качества бластоцисты, но многие делились не по временным рамкам и имели аномалии в виде фрагментаций, вакуолей, неравных бластомеров.

Таблица 6 - Выбор перспективного эмбриона

Характеристика эмбрионов давшие беременность (29- эмбрионов)	Характеристика с отрицательным результатом (16 эмбрионов)
Время дробления 48 часов	

<p>4,5- среднее ко-во бластомеров</p> <p>34%- эмбрионов с фрагментацией 12%</p> <p>7% - эмбрионов имели неравные бластомеры</p> <p>Средний балл 3,2</p>	<p>4,1 среднее ко-во бластомеров</p> <p>50% -имеют фрагментацию в среднем 16%</p> <p>43% - эмбрионов имели неравные бластомеры</p> <p>Средний балл 2,8</p>
<p>Время дробления 72 часа</p>	
<p>8,1 и 34% компактизированных</p> <p>27% эмб-ов с фраг-й 13%</p> <p>7% эмбрионов имели неравные бластомеры</p> <p>Средний балл 3.3</p>	<p>7,5 и 31 % комп</p> <p>50% имеют фрагментацию в среднем 19%</p> <p>12% эмбрионов имели неравные бластомеры</p> <p>Средний балл 2,9</p>

Эмбрионы давшие беременность тратили меньше времени для слияния, однако остальные стадии бластуляции занимают больше времени, это показано на рисунках ниже.

Беременность не наступила

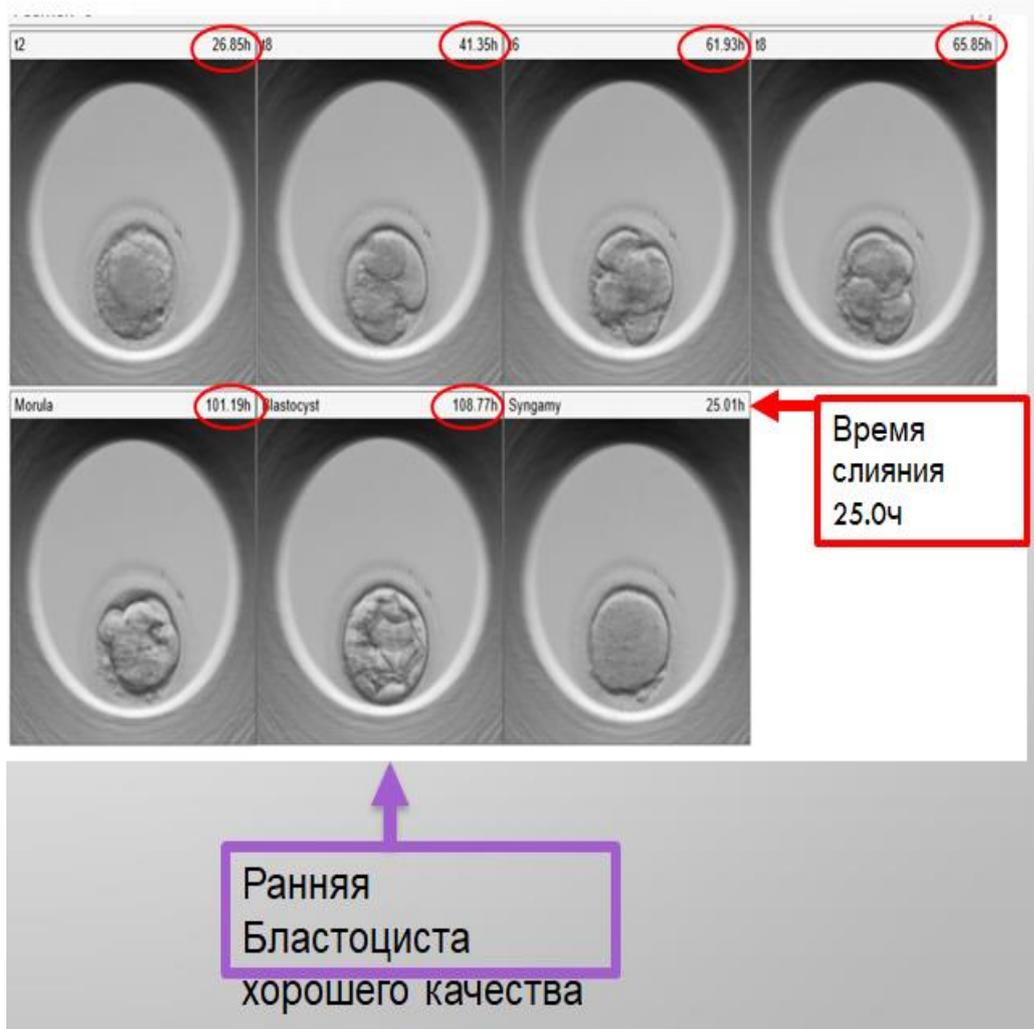


Рисунок 44– Деление эмбриона не давший беременности

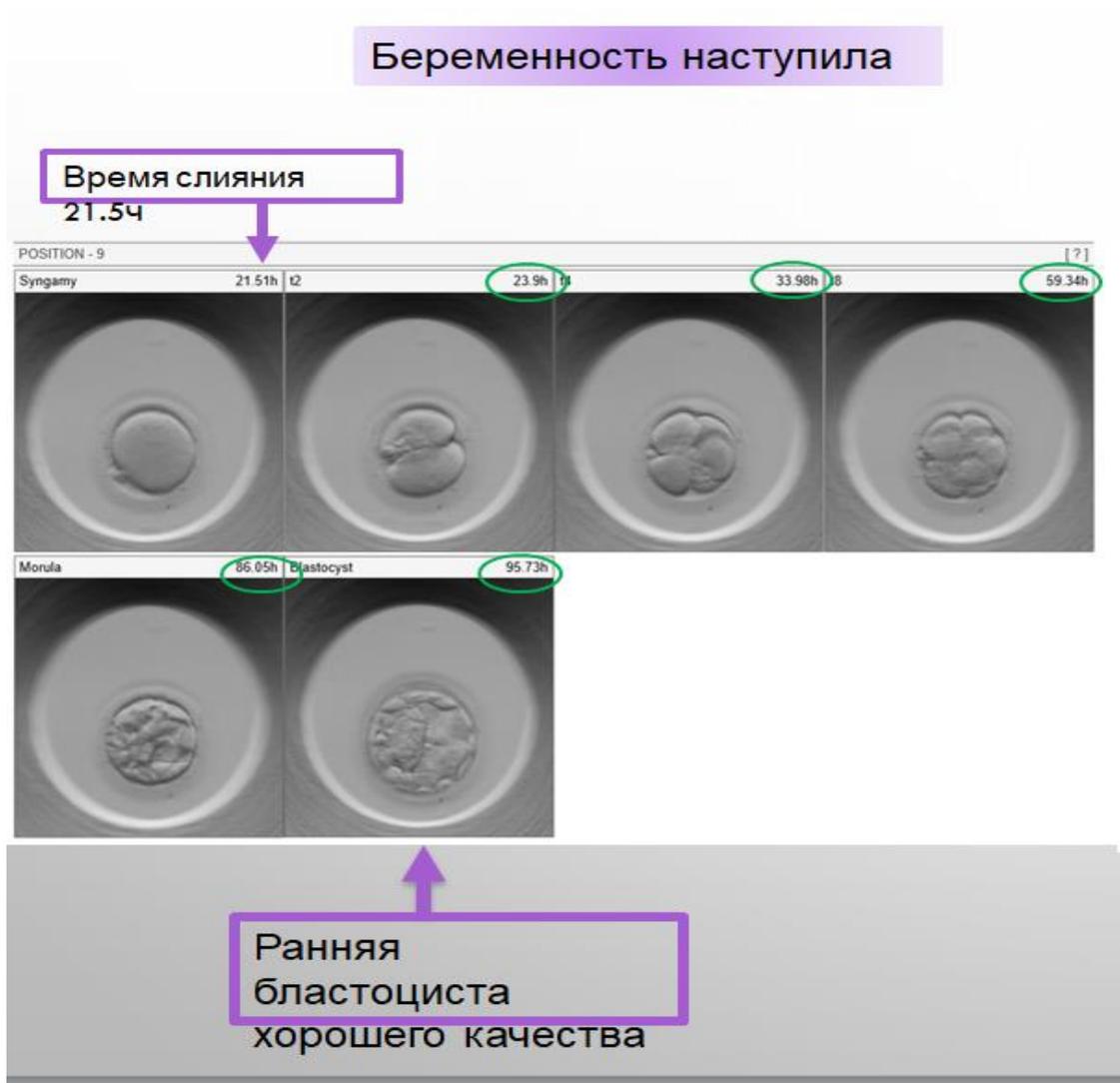


Рисунок 45 – Деление эмбриона давшего беременность

Таблица 7- Выбор эуплоидного эмбриона

№	2 день	3 день	5 день	Биопсия CGH	Результат
1	4 (20)	9 (не рав, не сфер)	---		
2	4	7 (20)	3 AA	+	не реком
3	4 (15)	4 (25)	----		
4	4(15) не рав	12 (25) не равн	4 BB	+	не реком
5	4	12	4BA	+	не реком
6	4 (15) не рав	12(15) не рав	---		
7	2 (10)	4	---		
8	3 (15)	7 (15) не равн	----		

9	4	8	3 ВВ	+	xx НОРМА
10	4 (20)	12	---		
11	4 (15)	8	3 ВВ	+	xy НОРМА
12	4 (25)	6 (30) не рав	2 СС		

Выбор перспективного по времени дробления эмбриона увеличивает на 30 % частоту наступления беременности. Это нам дает картину о том что при выборе эмбриона необходимо прослеживать картину развития эмбриона, а MIRI TIME Lapse нам позволяет прослеживать это четко по временным рамкам

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение строения и функций митохондрий показало их ключевую роль в процессах оогенеза и эмбриогенеза. При увеличении репродуктивного возраста происходит дисфункция яичников, что в результате влияет на митохондрии в ооцитах, которые снижают качество ооцитов и его потенциала к оплодотворению и дальнейшему развитию эмбриона. Наследование по материнской линии митохондриальные мутации ДНК могут вызвать фатальную (когда не происходит развитие эмбриона или не происходит оплодотворение) или заболевания с различными синдромами.

Проведены все стадии эмбриогенеза согласно эмбриологическому протокола: забор ооцитов, оплодотворение их спермой мужа или донора, оценка морфологии пронуклеусов, процедура ИКСИ, культивирование эмбрионов. Правильный выбор метода оплодотворения ЭКО или ИКСИ дает больший шанс на успешность программы. Подготовку эякулята необходимо проводить максимально точно во избежание плохой индификации, а так же потерь концентрации сперматозоидов. Оценку эмбрионов производить по мировым стандартам.

Был проведен успешный митохондриальный перенос путем доннации пронуклеусов. Развитие бластоцисты после переноса пронуклеусов может варьироваться между экспериментами из-за различий в качестве ооцитов. Донация ооплазмы может иметь клиническую пользу для будущих матерей, страдающих наследственными митохондриальными заболеваниями, женщин, а так же для пациентов старшего репродуктивного возраста или пациенток с множественными неудачными попытками ЭКО, не связанный с мужским фактором

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chalkia D. Генетика митохондриальной ДНК и загадка гетероплазмии в эволюции и болезни. // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2013 -№ 5
2. Jonathan Van Blerkom. Linda Gregory. Essential IVF: basic research and clinical applications. - 628 p.
3. Solano A., Playan A., Lopez-Perez MJ., Montoya J. Genetic diseases of the mitochondrial DNA in humans.- Salud Publica Mex.Mar-Apr 2001;43(2):151-61.
4. Pascale May-Panloup, Lisa Boucret, Juan-Manuel Chao de la Barca, Valérie Desquirit-Dumas, Véronique Ferré-L'Hotellier, Catherine Morinière, Philippe Descamps, Vincent Procaccio, Pascal Reynier. Ovarian Ageing: The Role of Mitochondria in Oocytes and Follicles.// Hum Reprod Update.- 2016 Nov;22(6):725-743
5. M W Gray, B F Lang, R Cedergren, G B Golding, C Lemieux, D Sankoff, M Turmel, N Brossard, E Delage, T G Littlejohn, I Plante, P Rioux, D Saint-Louis, Y Zhu, and G Burger. Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. -Nucleic Acids Res. 1998 Feb 15; 26(4): 865–878.
6. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. Nat Rev Genet.- 2005 May;6(5):389-402.
7. Об утверждении Правил проведения вспомогательных репродуктивных методов и технологий. Приказ и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан от 30 октября 2009 года № 627. – 2с.
8. James M. "The Role of Maternal Mitochondria During Oogenesis, Fertilization and Embryogenesis.//*Reproductive BioMedicine*.- 2002 - №12 – p.176–82
9. PalmerCS, OsellameLD, StojanovskiD, RyanMT. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery.// Cell Signal.- 2011 - №23 – p.1534–1545.
10. DaltonCM, CarrollJ. Biase dinheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte.// J Cell Sci. – 2013 - № 13 – p.2955–2964.
11. JoãoRamalho-Santos, Varum S.A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. // HumanReproductionUpdate. – 2009 - №15 - p.553–572
12. Polina V. Lishko, Inna L. Botchkina, Yuriy Kirichok. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm // Nature. – 2011 - №471. - p. 387–391.
13. Timo S, Normann G, Christoph B. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm // Nature. – 2011 - № 71. - P. 382–386.

14. Rémi D, Katherine H, Marshall P, Peter J. S. Mitochondrial respiration and Ca²⁺ waves are linked during fertilization and meiosis completion. // *Development* - 2003 №130 –p. 683-692;
15. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. // *Science* – 2004 - № 305 – p.858–862.
16. Santel A, Fuller M. T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. // *J Cell Sci* – 2001 - № 114 – p.867–874.
17. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. // *J Cell Biol* - 2003 - №160 – p.189–200
18. Jiang GJ, Pan L, Huang XY, Han M. Expression of HSG is essential for mouse blastocyst formation. // *BiochemBiophysResCommun.* – 2005 - № 335 – p.351–355
19. Babayev E, Emre Sel. Oocyte mitochondrial function and reproduction. // *Curr Opin Obstet Gynecol.* - 2015 Jun - №27(3) – p.175–181.
20. Zhang D, Keilty D. Mitochondriainoocyteaging: currentunderstanding. // *Science* - 2012 - № 283 – p.1488–1493
21. Zhen- Bo W, Jian- Xiu Hao, Tie- Gang Meng. Transfer of autologous mitochondria from adipose tissue- derived stem cells rescues oocyte quality and infertility in aged mice. // *AGING* - 2017 - №12
22. Арчер С.Л. *Митохондриальная динамика - деление и слияние митохондрий при заболеваниях человека* . // *J. Med.* – 2013 - №369 -p. 2236–2251
23. Купман В, Виллемс, Ф. *Моногенные митохондриальные нарушения*. // *J. Med.* – 2012 - № 366 - p.1132–1141
24. Шон Е.А. , ДиМауро С. Хирано М. *Митохондриальная ДНК человека: роль наследственных и соматических мутаций*. // *Nat Rev Genet.* – 2012 - №13 - p. 878–890 .
25. Boucret L, Juan-Manuel Ch. Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles Pascale May-Panloup . // *Human Reproduction.* -2016 - №22 – p. 725–743
26. Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2014 - №15 – p.634–646.
27. Dalton CM, Carroll J. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. // *J Cell Sci.* – 2013 - №126(Pt 13) – p.2955–2964.
28. Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* – 2013 - №3.

29. Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics.// British medical bulletin. – 2013 - №106 - p135–159.
30. Wallace DC. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. // Science. -1988 - №242 - p1427–1430.
31. Zeviani M. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. //Neurology. - 1988 - № 38 – p.1339–1346.
32. Elliott HR. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. //Am J Hum Genet.- 2008 - №83 - p254–260.
33. Mitalipov S. Limitations of preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA diseases. // Cell reports. – 2014 -№ 7 – p.935–937.
34. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion.// Science. – 1983 - №220 - p1300–1302.
35. Sato A. Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation.// Proc Natl Acad Sci U S A. – 2005 - №102 - p16765–16770.
36. Meirelles FV, Smith LC. Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. // Genetics. – 1997 - №145 - p445–451.
37. Meirelles FV, Smith LC. Mitochondrial genotype segregation during preimplantation development in mouse heteroplasmic embryos.//Genetics.- 1998 - №148 - p877–883.
38. Wang T. Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases.// Cell. – 2014 - №157 – p 1591–1604.
39. Sathananthan AH, Trounson AO. Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. //Hum Reprod.- 2000 - №15 - p148–159.
40. Van Blerkom J. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. //Hum Reprod. -2000 - №15 - p2621–2633.
41. Samuels DC, . Preventing the transmission of pathogenic mitochondrial DNA mutations: Can we achieve long-term benefits from germ-line gene transfer?// Hum Reprod. -2013- №28 - p554–559.
42. Craven L. Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. //Nature. -2010-№465 - p82–85.
43. Tachibana M. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells.// Nature. – 2009. №461 - 367–372.

44. Lee HS. Rapid mitochondrial DNA segregation in primate preimplantation embryos precedes somatic and germline bottleneck. // Cell reports. 2012; №1.- p506–515.
45. Tachibana M. Chromosome transfer in mature oocytes. // Nat Protoc. 2010; №5.- p1138–1147.
46. Tachibana M. Chromosome transfer in mature oocytes. // Fertil Steril. 2012; №97.- p16.
47. Пекарева В.А., Кодылева Т.А, Шурыгина О.В. Руководство по клинической эмбриологии М К И ДК Под ред.– Самара, 2010. – 306с.:
48. Чен П. Т. К, Гоулдстайн М., Роузенвэкс З. Секреты репродуктивной медицины / пер. с англ. ... С. 40
49. Корсак В.М. Руководство по вспомогательным репродуктивным технологиям для врачей эмбриологов. Издательство медицинских книг, 2011. - 216 с.