

Т.О. Юрчук¹
Н.О. Будерацька^{1,2}
І.Є. Ільїн²
Ю.В. Гонтар²
М.П. Петрушко^{1,3}

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м.Харків
² Медичний центр ІГР, м.Київ,
³ ДРТ-клініка репродуктивної медицини, м.Харків

Надійшла: 05.10.2019

Прийнята: 14.11.2019

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.4.50-54>

УДК 611.013.15:576.31

МОРФОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРШОГО ПОЛЯРНОГО ТІЛА ООЦИТІВ ЛЮДИНИ ТА РЕЗУЛЬТАТИ PGT-A ЕМБРІОНІВ

Yurchuk T.O. , Buderatska N.O. , Ilyin I.E. , Gontar J.V. , Petrushko M.P.  ✉ Morphological characteristics of the first polar body of oocytes and results of embryos PGT-A.

Institute of problems of biology and medicine of the national academy of sciences of Ukraine, Kharkiv, Medical center IGR, Kyiv, ERT-clinic of reproductive medicine, Kharkiv

ABSTRACT. Background. The relevance of studying problem of oogenesis is due to the high rate of infertile marriages associated with problems in the reproductive sphere. Human oocytes at meiosis metaphase II are characterized by polymorphism of the first polar body, which morphological features can be a predictor of the embryos chromosomal status. **Objective.** Determination of chromosomal status of embryos derived from oocytes with different morphological characteristics of the first polar body. **Methods.** Preimplantation-genetic analysis of embryos was performed using molecular cytogenetic methods; culturing method was used to fertilised oocyte and development of preimplantation embryo, assessment of oocyte and embryo development were studied by the light and fluorescence microscopy; cryobiological and statistical methods were also used. **Results.** It has been shown that the oocyte fertilization rate does not depend on the first polar body morphology. However, oocytes with an enlarged and scattered-fragmented polar body do not develop after fertilization until blastocyst stage. That is why it impossible to carry out their genetic analysis. Fertilisation of the oocytes with local fragmentation of the polar body does not increase the incidence of embryo aneuploidy. **Conclusion.** The morphological characteristics of the first polar body may indirectly indicate the chromosomal status of human embryos. The data obtained will facilitate the selection of eggs for patients undergoing ART treatment in cases where the creation of an excessive number of embryos should be avoided.

Key words: oocyte, polar body, genetic testing, euploid chromosome set.


Citation:

Yurchuk TO, Buderatska NO, Ilyin IE, Gontar JV, Petrushko M.P. [Morphological characteristics of the first polar body of oocytes and results of embryos PGT-A]. Morphologia. 2019;13(4):50-4. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.4.50-54>

 Yurchuk T.O. 0000-0002-4993-9129,  Buderatska N.O. 0000-0002-1915-0880

 Ilyin I.E. 0000-0003-0074-4619,  Gontar J.V. 0000-0002-3261-3130

 Petrushko M.P. 0000-0001-8331-5419

✉ petrushkomarina@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Вступ

Допоміжні репродуктивні технології (ДРТ) широко використовуються при лікуванні безпліддя. Оцінка якості ооцитів є одним з найважливіших питань ДРТ [1]. Якість яйцеклітин може бути головним фактором їх виживання після кріоконсервування, запліднення та розвитку ембріонів *in vitro* [2-4].

Полярне тіло (ПТ) – продукт мейотичного поділу ооцитів, яке утворюється при асиметричному цитокінезі [5]. Воно містить ядро, рибосоми, комплекс Гольджі, мітохондрії, хоча ступінь їх функціональності значною мірою невідома [6]. Перше ПТ виділяється після початку сплеску лютеїнізуючого гормону, що є важливою ознакою мейотичного дозрівання ооцитів [7]. Біль-

шість хромосомних анеуплоїдій, які виявляють в ембріонах, можуть бути спричинені помилками сегрегації хромосом під час першого мейозу. Тому актуальним є питання пошуку предикторів еуплоїдного набору хромосом ембріонів, одним із яких може бути морфологічний стан першого ПТ.

Мета – визначення хромосомного статусу ембріонів, отриманих із ооцитів з різними морфологічними характеристиками першого ПТ.

Матеріали та методи

Усі маніпуляції з гаметами та ембріонами проводили відповідно до Європейського протоколу із захисту ембріонів [8] та рішення Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України.

Ооцити людини отримувалися в циклах лікування безпліддя методами ДРТ.

Аспіровану фолікулярну рідину продилялись на наявність ооцит–корона–кумуляного комплексу під стереомікроскопом SMZ–18 (Nikon, Японія) у попередньо нагрітих до 37°C чашках Oosafe (SparMED, Німеччина) діаметром 60 мм. Усі відібрані комплекси ретельно відмивали від фолікулярної рідини та клітин крові та переносили в фосфатно–буферне середовище HTF (LifeGlobal, США) з додаванням 5% Protein Supplement (LifeGlobal, США) для подальшого культивування *in vitro*.

Для оцінки ступеня зрілості, морфологічних особливостей полярного тіла та подальшого запліднення ооцита, проводили видалення клітин кумулюсу. Процедуру виконували через 2 год після отримання яйцеклітин. Морфологічні характеристики полярного тіла оцінювали за допомогою мікроскопу Nikon TI–U компанії Nikon (Японія). Для фото-, відеозапису та інших важливих етапів роботи з ооцитами та ембріонами використовували систему програмного забезпечення Cronus компанії Research Instruments (Велика Британія).

Для проведення передімплантаційно-генетичного тестування анеуплоїдій (ПГТ-А) проводили біопсію клітин трофектодерми ембріонів на п'яту добу культивування, шляхом відсікання кількох клітин трофектодерми за допомогою лазерного пристрою Saturn (Research Instruments, Велика Британія), інвертованого мікроскопа Nikon TI-U (Nikon, Японія), мікроманіпуляторів (Narishige, Японія) мікропіпеток з внутрішнім діаметром 17 мкм (Cook, США) для фіксованого утримання ембріона та мікропіпеток з діаметром 23-27 мкм (Origio, Данія) для біопсії трофектодерми.

Клітини трофектодерми обробляли гіпотонічним розчином (1% цитрат натрію), після чого фіксували на склі за допомогою суміші метанолу та оцтової кислоти в співвідношенні 3:1. Після підсихання, наносили флуоресцентні ДНК–зонди на поверхню, де знаходились ядра клітин ембрі-

она. Використовували зонди для хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X, Y комерційних наборів PB MultiVysion та CepX/CepY (Abbott, США).

Ооцити були віднесені до різних груп в залежності від наступних морфологічних характеристик першого ПТ: овальне з гладкою поверхнею (група 1), збільшене у розмірі (група 2), зменшене у розмірі (група 3), фрагментоване локально (група 4), множинні фрагменти, розсіяні у перивітеліновому просторі (група 5).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за методом Стьюдента з використанням програми «Excel» («MS», США). Результати приведені у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення. Дані вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Найбільша кількість ооцитів (872) увійшло в групу 1 (рис.1). Клітини характеризувалися наявністю першого ПТ, яке мало овальну форму, чіткі краї та не мало ознак фрагментації.

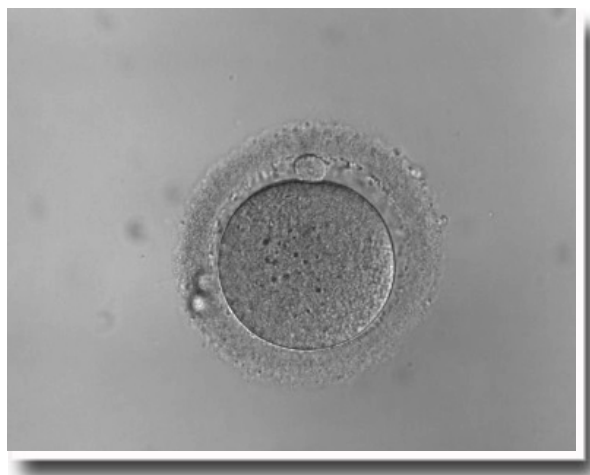


Рис. 1. Ооцит групи 1 з нормальними морфологічними характеристиками ПТ. Нативний препарат. $\times 400$.

У групи 2-5 увійшло 11, 14, 180 та 5 ооцитів відповідно. У групі 1 – (37,5 \pm 7,1)% ембріонів мали еуплоїдний набір хромосом, 3 – (55,5 \pm 6,3)% , 4 – (33,9 \pm 3,3)%.

Дизморфізм першого полярного тіла не вплинув на частоту запліднення ооцитів груп 1, 3-5 (табл. 1). Частота запліднення ооцитів із збільшеним полярним тілом була значущо нижче відносно цього показника у всіх досліджуваних групах.

На третю добу різниця морфокінетичних параметрів розвитку була статистично не значуща. На п'яту добу культивування *in vitro* тільки у групі 5 не було виявлено жодного ембріону на стадії бластоцисти. А у групі 2 серед ембріонів, які досягли стадії бластоцисти, не було виявлено жодного ембріону, який би відповідав високим морфологічним критеріям.

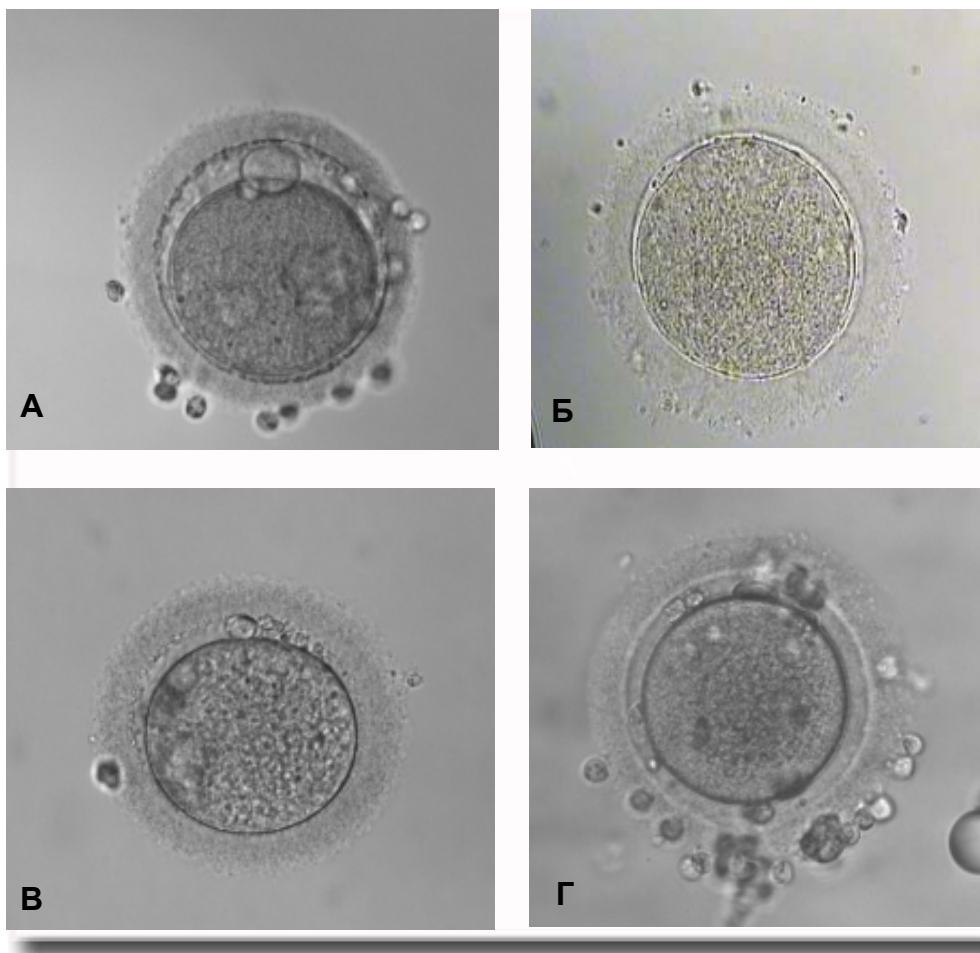


Рис. 2. Морфологічні варіанти першого ПТ: А – збільшене, Б – зменшене, В – фрагментоване локально, Г – множинні фрагменти. Нативний препарат. $\times 400$.

Морфофункціональні та генетичні характеристики ембріонів, отриманих із ооцитів досліджуваних груп

Таблиця 1

Показники, %	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5
Частота запліднення	88,3 \pm 9,2	63,6 \pm 4,6*	85,7 \pm 12,1	85,5 \pm 16,0	71,4 \pm 11,5
Кількість ембріонів на 3-ю добу	93,3 \pm 10,1	85,7 \pm 9,3	78,5 \pm 8,8	92,9 \pm 10,4	80 \pm 10,3
Кількість бластоцист	67,5 \pm 10,0	57,1 \pm 12,8	71,4 \pm 9,9	81,1 \pm 11,8	0
Кількість категорії AA	46,5 \pm 5,1	0	40 \pm 4,4	32,0 \pm 2,9	0
Кількість ембріонів з еуплоїдним набором хромосом	37,5 \pm 7,1	-	55,5 \pm 6,3*	33,9 \pm 3,3	-

Примітка. * – різниця значуща по відношенню до групи 1, $p < 0,05$.

Чи існує кореляція між морфологічними характеристиками ПТ та подальшими морфофункціональними характеристиками ембріонів, цікавило багатьох дослідників. J. Tep із співав. [9] з'ясували, що характеристики першого ПТ не впливають на частоту запліднення ооцитів. Автори оцінювали запліднення і подальший розвиток двох груп ооцитів, а саме з фрагментованим та морфологічно нормальним першим полярним тілом. Авторами був виявлений статистично значущий зв'язок між морфологічними параметрами

першого полярного тіла та якістю отриманих ембріонів, при цьому частота настання вагітності при перенесенні ембріонів, які розвинулися з ооцитів першої групи, була значущо вище, ніж при перенесенні ембріонів, отриманих з ооцитів другої групи.

Y. Verlinsky зі співавторами [10] показав, що дизморфізм першого ПТ не впливає на подальші якісні характеристики ембріонів.

На відміну від цих спостережень, T. Ebner зі співавторами [11] виявив кореляцію між усіма

спостережуваними морфологічними особливостями першого ПТ та частотою утворення зигот та якістю ембріонів, які розвинулися із них. За даними L. Rienzi зі співавторами [12], аномалії ПТ були пов'язані зі зниженням частоти їх запліднення, проте не виявили жодної кореляції з якістю ембріонів. Була виявлена кореляцію між збільшенням першим ПТ та зменшенням частоти запліднення, а також із погіршеною якістю ембріонів [13]. Встановлено, що фрагментація або дегенерація першого ПТ пов'язана з більш високою частотою запліднення та нижчим рівнем фрагментації ембріонів [14]. Було показано, що важливим у прогнозуванні якості ембріонів є не тільки морфологічні характеристики першого ПТ, але й кут його розташування по відношенню до пронуклеусів, які з'являються після їх запліднення.

Трансфер полярного тіла може бути використаний для запобігання передачі спадкових захворювань мітохондріальної ДНК, тому вивчення морфологічних характеристик першого ПТ та взаємозв'язок цих характеристик із хромосомним статусом ембріонів є своєчасним [15].

Таким чином, було показано, що морфологічні параметри першого полярного тіла можуть служити критерієм для відбору найбільш якісно-

го матеріалу в програмах допоміжних репродуктивних технологій.

Висновки

Морфологічні характеристики першого ПТ можуть опосередковано свідчити про хромосомний статус ембріонів людини. Отримані дані щодо хромосомного статусу ембріонів із дизморфізмом полярного тіла дозволять полегшити відбір яйцеклітин для пацієнтів, які проходять лікування методами ДРТ у випадках, коли слід уникати створення надмірної кількості ембріонів.

Перспективи подальших розробок

Перспектива подальшої роботи полягає у використанні морфологічних критеріїв першого ПТ та їх використання як предикторів якості ембріонів для створення реконструйованих ооцитів, шляхом трансферу першого ПТ в енуклеюваний ооцит донора.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках програми «Підтримка розвитку пріоритетних напрямів наукових досліджень» (КПКВК 6541230).

Літературні джерела References

1. Buderatska NO, Petrushko MP. [Variability of morphological parameters as a criterion for predicting the effectiveness of cryopreservation of human oocytes]. *Morphologia*. 2016;10(4):18–22. DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2016.4.18-22>
2. Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. [Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars]. *Early Hum Dev*. 2018;126:6–9. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016
3. Buderatska N, Petrushko M. [Oocytes as alternative to embryos in cryopreservation applied in assisted reproductive technologies]. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2016;26(4):375–82. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo26.04.375>
4. Petrushko MP. [Current state of cryopreservation of reproductive cells and embryos]. *Visn Nac Akad Nauk Ukr*. 2017;7:44–52. doi:10.15407/visn2017.07.044. Ukrainian.
5. Schmerler S, Wessel GM. Polar bodies—more a lack of understanding than a lack of respect. *Mol Reprod Dev*. 2011;78(1):3–8. doi: 10.1002/mrd.21266.
6. Wei Y., Zhang T., Wang YP. Polar Bodies in Assisted Reproductive Technology: Current Progress and Future Perspectives. *Biology of Reproduction*. 2015;92(1):1–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.125575>.
7. Liu W, Xin Q, Wang X. Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of preovulatory oocytes in mammals. *Cell Death Dis*. 2017;8(3):e2662. doi: 10.1038/cddis.2017.82.
8. Protocol on Embryo Protection A Working Party of the 24th Meeting of the Steering Committee on Bioethics of the Council of Europe. Strasbourg. 2003; 44p.
9. Ten J, Mendiola J, Vioque J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:40–8. doi:10.1016/S1472-6483(10)60762-6.
10. Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, Kuliev A. [Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential?]. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:336–41. doi:10.1016/S1472-6483(10)61874-3.
11. Ebner T, Yaman C, Moser M, et al. [Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection]. *Hum Reprod*. 2000;15(2):427–30.
12. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril*. 2008;90(5):1692–700.

doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.09.024.

13. Navarro PA, de Araújo MM, de Araújo CM. Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;104(3):226–9. doi: 10.1016/j.ijgo.2008.11.008.

14. Yu EJ, Ahn H, Lee JM. Fertilization and embryo quality of mature oocytes with specific

morphological abnormalities. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 2015;42(4):156–62. DOI: <https://doi.org/10.5653/cerm.2015.42.4.156>.

15. Zhang SP, Lu CF, Gong F. [Polar body transfer restores the developmental potential of oocytes to blastocyst stage in a case of repeated embryo fragmentation]. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(5):563–71. doi: 10.1007/s10815-017-0881-y.

Юрчук Т.О., Бударяцька Н.О., Ільїн І.Є., Гонтар Ю.В., Петрушко М.П. Морфологічні характеристики першого полярного тіла ооцитів людини та результати PGT-A ембріонів.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Актуальність вивчення проблеми оогенезу обумовлена високою частотою безплідних шлюбів, пов'язаних з проблемами в репродуктивній сфері. Ооцити людини на стадії метафази II мейозу характеризуються вираженим поліморфізмом першого полярного тіла, морфологічні особливості якого можуть бути предиктором хромосомного статусу розвинутих ембріонів. **Мета.** Визначення хромосомного статусу ембріонів, отриманих із ооцитів з різними характеристиками першого полярного тіла. **Методи.** Передімплантаційно-генетичний аналіз ембріонів проводили за допомогою молекулярно-цитогенетичних методів; культуральні методи використовували для запліднення ооцитів та розвитку ембріонів передімплантаційних стадій розвитку, оцінку ооцитів та розвитку ембріонів здійснювали з використанням світлової та флуоресцентної мікроскопії, також застосовували кріобіологічні та методи статистичної обробки результатів. **Результати.** Було показано, що частота запліднення ооцитів не залежить від морфологічних характеристик першого полярного тіла. Проте ооцити із збільшеним та розсіяно-фрагментованим полярним тілом після запліднення не розвиваються до стадії бластоцисти, що унеможливило проведення їх генетичного аналізу. Запліднення ооцитів з локальною фрагментацією полярного тіла не призводить до збільшення частоти анеуплоїдій у хромосомному наборі ембріонів. **Підсумок.** Морфологічні характеристики першого полярного тіла можуть опосередковано свідчити про хромосомний статус ембріонів людини. Отримані дані дозволять полегшити відбір яйцеклітин для пацієнтів, які проходять лікування методами ДРТ у випадках, коли слід уникати створення надмірної кількості ембріонів.

Ключові слова: ооцит, полярне тіло, генетичне тестування, еуплоїдний набір хромосом.

Юрчук Т.А., Бударяцкая Н.А., Ильин И.Е., Гонтарь Ю.В., Петрушко М.П. Морфологические характеристики первого полярного тела ооцитов человека и результаты PGT-A эмбрионов.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Актуальность изучения проблемы оогенеза обусловлена высокой частотой бесплодных браков, связанных с проблемами в репродуктивной сфере. Ооциты человека на стадии метафаза II мейоза характеризуются выраженным полиморфизмом первого полярного тела, морфологические особенности которого могут быть предиктором хромосомного статуса полученных эмбрионов. **Цель.** Определение хромосомного статуса эмбрионов, полученных из ооцитов с различными характеристиками первого полярного тела. **Методы.** Доимплантационно-генетический анализ эмбрионов проводили с помощью молекулярно-цитогенетических методов; культуральные методы использовали для оплодотворения ооцитов и развития эмбрионов доимплантационных стадий развития, оценка ооцитов и развития эмбрионов осуществляли с использованием световой и флуоресцентной микроскопией, также применяли кробиологические и методы статистической обработки результатов. **Результаты.** Было показано, что частота оплодотворения ооцитов не зависит от морфологических характеристик первого полярного тела. Однако ооциты с увеличенным и рассеяно-фрагментированным полярным телом после оплодотворения не развиваются до стадии бластоцисты, что делает невозможным проведение их генетического анализа. Оплодотворения ооцитов с локальной фрагментации полярного тела частота не приводит к увеличению возникновения анеуплоидий в хромосомном наборе эмбрионов. **Выводы.** Морфологические характеристики первого полярного тела могут косвенно свидетельствовать о хромосомный статус эмбрионов человека. Полученные данные позволят облегчить отбор яйцеклеток для пациентов, проходящих лечение методами ВРТ в случаях, когда следует избегать создания чрезмерного количества эмбрионов.

Ключевые слова: ооцит, полярное тело, генетическое тестирование, euploidный набор хромосом.