Лекция Е.А.Лесик

Работа эмбриолога на пункции. Оценка качества ооцитов. Факторы влияющие на качество ооцитов. Классическая методика ЭКО. Оценка оплодотворения.

Санкт-Петербург – 2015г.

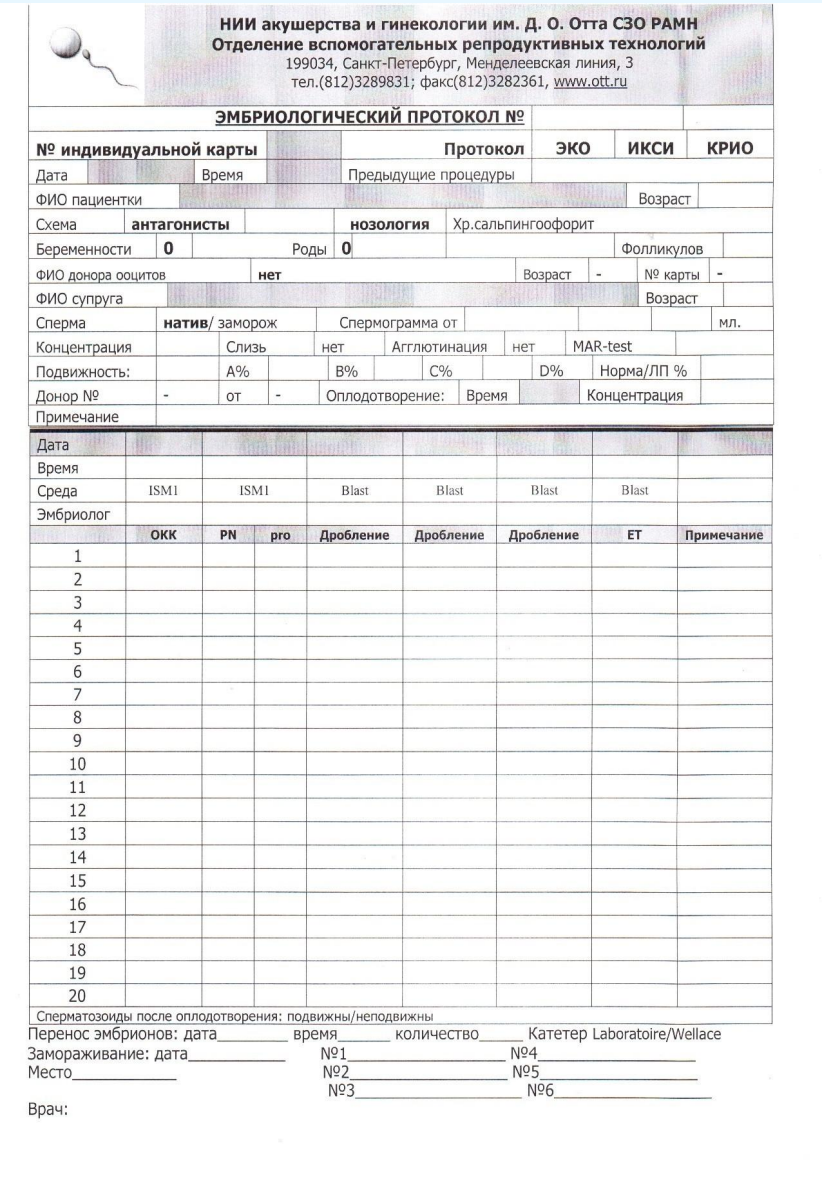
Подготовка к пункции

Успех вспомогательных репродуктивных технологий зависит от правильной координации медицинского и научного подходов к каждой из пар, проходящих курс лечения по программе ЭКО, с тесным взаимодействием врача-репродуктолога и эмбриолога. Каждый этап должен тщательно контролироваться с использованием базовых научных знаний и практических умений с учетом индивидуальных отличий у конкретных пациентов.

Подготовка лабораторного отчета

- Номер эмбриологического протокола
- Номер медицинской карты пациента
- Дата и время проведения пункции
- ФИО супруги, супруга
- ФИО или шифр (код) донора ооцитов, донора спермы
- Показатели спермограммы (объем, концентрация, PR+NP, морфология, тест на антиспермальные АТ, особые примечания)
- Данные предыдущих ВРТ
- Способ стимуляции яичников, дозы препаратов
- Количество зрелых фолликулов

- Указать способ оплодотворения (IVF, ICSI), время инсеменации, концентрацию сперматозоидов, нативная или замороженная сперма
- Указать культуральные среды
- Количество полученных ОКК
- Результаты оплодотворения
- Описание качества эмбрионов по дням развития с оценкой качества
- Дата, время переноса эмбрионов, количество, их стадия развития и качество.
- Криоконсервация эмбрионов(есть/нет), качество криоконсервированных эмбрионов, место хранения.
- Примечания



НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН
Отделение вспомогательных репродуктивных технологий
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3
тел.(812)3289831; факс(812)3282361, www.ott.ru

ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОТОКОЛ №

№ индивидуальной карты | **Протокол** | **ЭКО** | **ИКСИ** | **КРИО**

Дата | Время | Предыдущие процедуры

ФИО пациентки | Возраст

Схема | **антагонисты** | **нозология** | Хр.сальпингоофорит

Беременности | **0** | Роды | **0** | Фолликулов

ФИО донора ооцитов | **нет** | Возраст | - | № карты | -

ФИО супруга | Возраст

Сперма | **натив**/ заморож | Спермограмма от | мл.

Концентрация | Слизь | нет | Агглютинация | нет | MAR-test

Подвижность: | A% | B% | C% | D% | Норма/ЛП %

Донор № | - | от | - | Оплодотворение: | Время | Концентрация

Примечание

Дата								
Время								
Среда	ISM1	ISM1		Blast	Blast	Blast	Blast	
Эмбриолог								
	ОКК	**PN**	**pro**	**Дробление**	**Дробление**	**Дробление**	**ET**	**Примечание**
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								

Сперматозоиды после оплодотворения: подвижны/неподвижны

Перенос эмбрионов: дата_____ время_____ количество_____ Катетер Laboratoire/Wellace

Замораживание: дата_____ №1_____ №4_____

Место_____ №2_____ №5_____

№3_____ №6_____

Врач:

Подготовка к проведению пункции

- **Чашка с культуральной средой** (среда для оплодотворения, с оптимальным состав для осуществления слияния гамет, высоким содержанием глюкозы). Нанесите метку с фамилией пациента.

  Перед использованием уравновесьте в течение минимум 4 часов в инкубаторе (5-6% CO_2 при 37°С). Среду необходимо покрыть парафиновым маслом.
- **Среда для промывки ооцитов**. (Сохраняет стабильный pH вне инкубатора благодаря буферу HEPES; с гепарином или без гепарина). Разлить в чашки Петри Ø 30мм.
- **Чашка Петри Ø90мм** для исследования фолликулярного аспирата.
- **Пипетка** со стерильными наконечниками для забора ОКК.

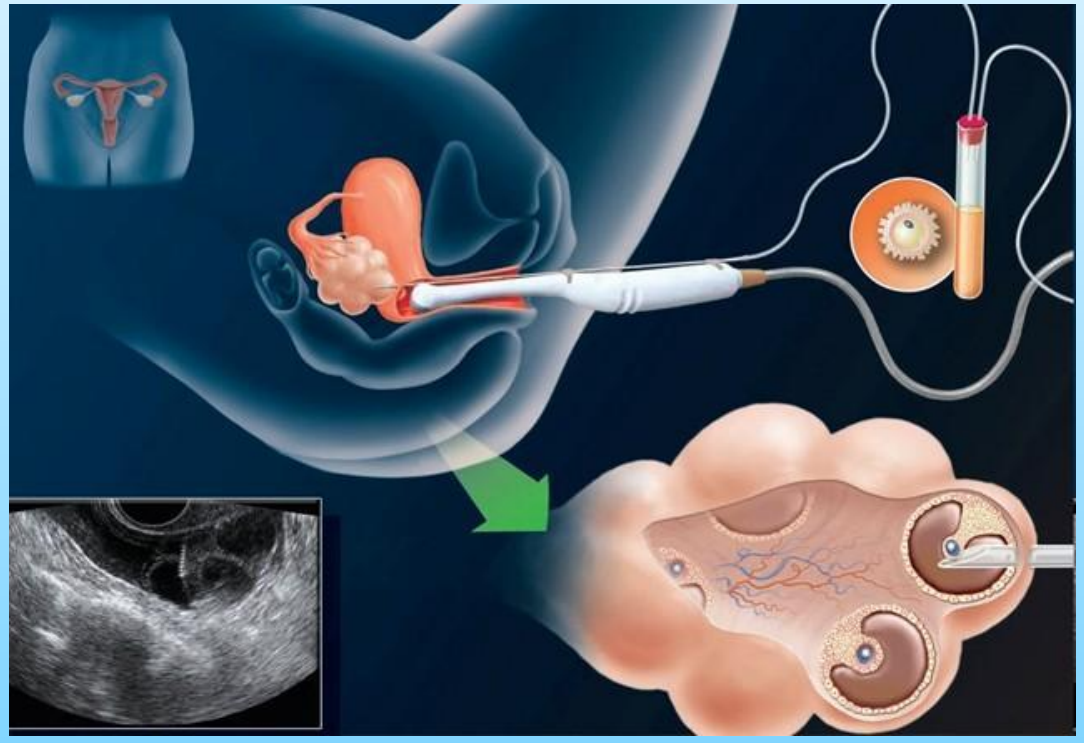
  1мл шприцы с надетыми иглами (для препарирования ОКК)
- Контейнер для утилизации биологических отходов (слива фолликулярной жидкости)

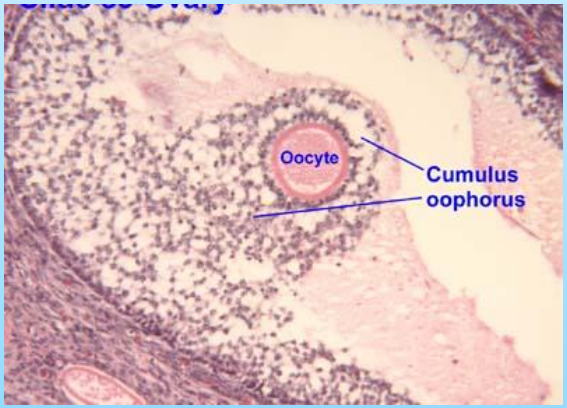
Перед началом забора ооцитов необходимо:

1. Убедиться, что нагревательные поверхности, столики микроскопов, металлические штативы нагреты до температуры 37°С.
2. Пробирки для забора образцов и чашки Петри для исследования аспирата также должны быть нагреты.

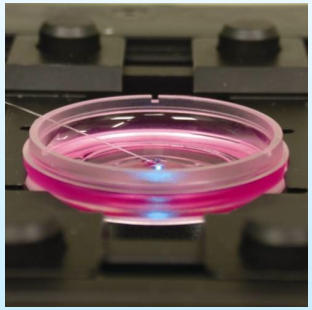
Трансвагинальная пункция яичников

Уровень отрицательного давления в вакуумном насосе 100–120 mmHG

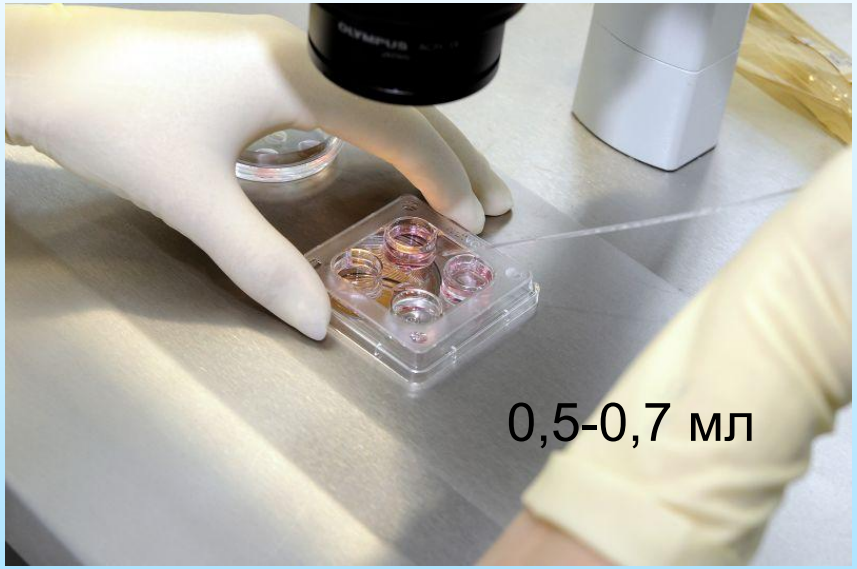


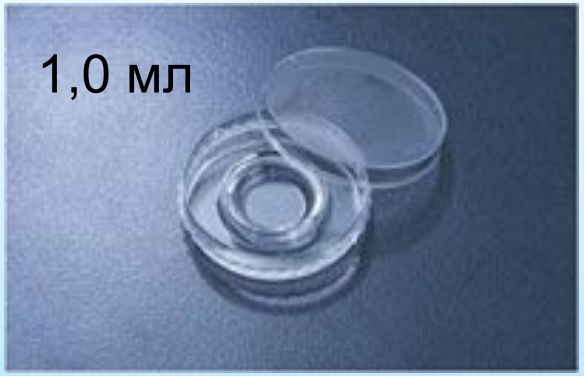


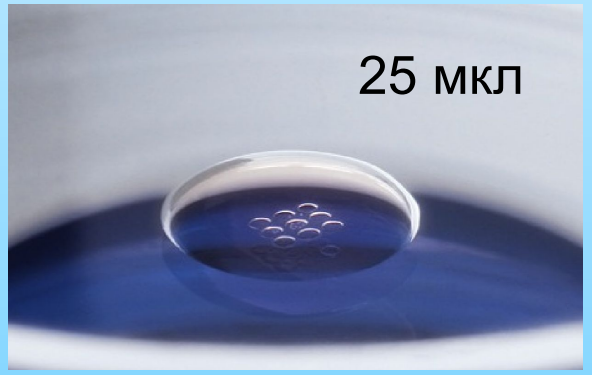
Забор ооцитов



1. Фолликулярный аспират исследуют немедленно под микроскопом на подогреваемой поверхности
2. Ооциты отмываются в среде для манипуляций с ооцитами (HEPES), при необходимости отсекаются кровяные сгустки или гранулезные клетки
3. Ооциты немедленно переносятся в культуральную среду
4. По окончании процедуры производится оценка качества и зрелости ОКК, а также определяется оптимальное для инсеменации время
5. Чашка с ОКК помещается в инкубатор (37°C, 6% CO_2, 5% O_2, 89% N_2)


0,5-0,7 мл


1,0 мл


25 мкл

COOK

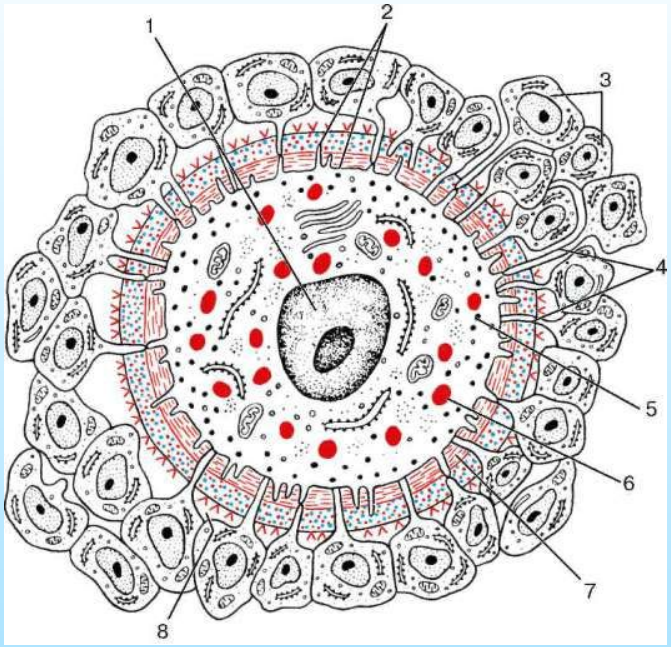


Рис. Схематическое изображение строения яицеклетки человека.

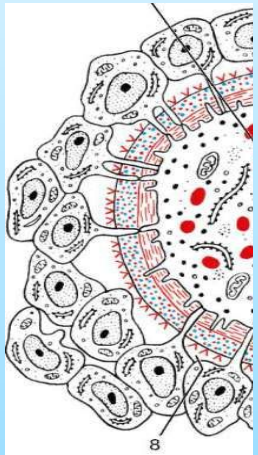
1 – ядро с проядрышком; 2 – плазмолемма, оолемма; 3 – фолликулярный эпителий;
4 – лучистый венец; 5 – корти-кальные гранулы;6 – желточные включения;
7 – блестящая зона (zona pellucida, или Zp) – гликопротеиновая мембрана;
8 – рецептор .

Оболочки

Зернистая оболочка – клетки фолликулярного эпителия (кумулюса).

Лучистый венец (Zone radiate**)** – слой фолликулярных клеток прилегающих к ооциту.

Функции клеток кумулюса – за счет межклеточных взаимодействий через т.н. щелевые контакты клетки взаимодействуют между собой и с оолеммой. Предназначенны для диффузии сахаров, аминокислот, предшественников липидов, нуклеотидов, метаболитов и сигнальных молекул.



Блестящая оболочка (Zone pellucida, ZP**)** **-** распологается поверх плазмалеммы, компоненты блестящей оболочки синтезируются ооцитом и фолликулярными клетками и состоит из гликопротеинов разных видов (**Zp_1, Zp_2, Zp_3, Zp_4**) и гликозамингликанов.
Сахаристые остатки гликопротеинов ZP2 и ZP3 являются лигандами для рецепторов на головке сперматозоидов, ответственных за связывание с Zona pellucida и запуск акросомальной реакции.
Гликопротеины фракции **Zp_2** после кортикальной реакции препятствуют полиспермии.
.

Органеллы

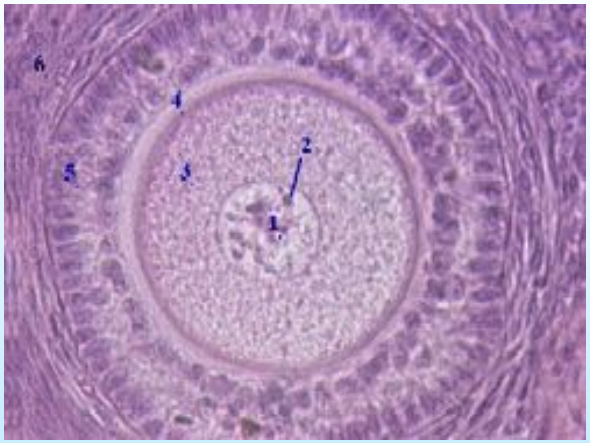
Эндоплазмотическая сеть
Аппарат Гольджи
Лизосомы
Вакуоли
Митохондрии
Рибосомы
Цитоскелет (микротрубочки и микрофиламенты)

Отсутствуют центриоли. В связи с этим, способность к делению восстанавливается только тогда, когда в клетку попадают центриоли сперматозоида

У растущего ооцита существует один главный центр организации микротрубочек (ЦОМТ). В состав ЦОМТ входит центросома, которая обеспечивает астральную конфигурацию микротрубочек.

У центросом ооцита нет центриолей, поэтому они получили название ЦОМТ. В зрелом, мейотически компетентном ооците присутствуют множественные ЦОМТ, которые в процессе созревания ооцита обеспечивают миграцию герминативного пузырька (ГП). Эксцентрическое положение ГП связано с положением мейотического веретена (или даже определяет его положение), которое в свою очередь определяет место отделения полярного тельца.

Перечень специфических структур:



Желточные мембранные гранулы – фосфо- и липопротеины. Обеспечивают развитие эмбриона в течение первой недели развития.

Кортикальные мембранные гранулы – после оплодотворения участвуют в кортикальной реакции.

Мультивезикулярные тельца - производные лизосом; появляются в процессе переваривания ооцитом фагоцитированных частиц.

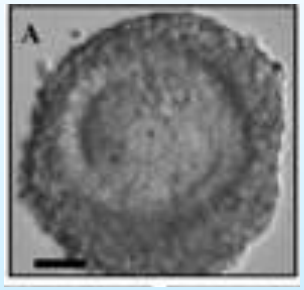
Белоксинтезирующая система - очень высокое содержание в цитоплазме рибосом, рРНК, мРНК, тРНК.

Основной фактор, определяющий результаты IVF – Морфо-функциональное состояние яйцеклетки

Качество ооцита – фактор, ограничивающий фертильность женщины

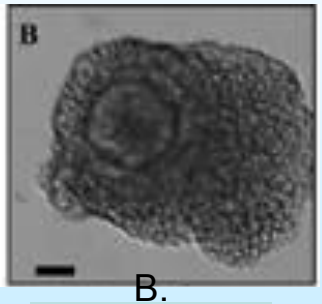
- способность к оплодотворению
- формирование морфологически полноценного эмбриона, способного к имплантации и перспективного для криоконсервирования,

Классификация ооцит-кумулюсного комплекса



А. Профаза I
Зародышевый пузырек

- Незрелый ооцит
- Клетки кумулюса, расположены очень компактно в 1-2 слоя
- Лучистый венец не контрастирует
- Цитоплазма гранулированная с четко очерченным кортикальным слоем
- Имеется зародышевый пузырек (GV)
- Тетраплоидный – 2 набора по 46 хромосом



В.
Метафаза I

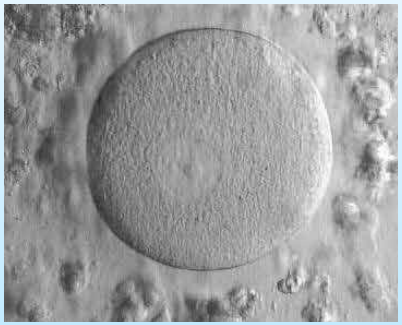
- Незрелый ооцит («промежуточной зрелости»)
- Кумулюс многослойный, лучистый венец виден
- Центральная цитоплазма гранулированная или гомогенная
- Отсутствует GV
- Нет полярного тельца
- Хромосомы выстроены на экваторе клетки, но еще не расходятся

С.
Метафаза II

- «Зрелый ооцит»
- Кумулюс и лучистый венец расширились
- Цитоплазма гомогенная
- Имеется первое полярное тельце
- 2N, 23 хромосомы, 46 хроматид

- Лютеинизированный ооцит – кумулюсныуе клетки превращаются в желатиновые массы
- Атретический ооцит – клетки гранулезы фрагментированы, кумулюса мало или он полностью отсутствует

Около 20% ооцитов не зрелые – в стадии MI или GV



Зародышевый пузырек
(GV - Germinal Vescicle)

Метафаза I

Асперируемые фолликулы <14 мм

Дефицит рецепторов ЛГ

Низкое интрафолликулярное содержание ЛГ

Недостаточно времени для интрафолликулярного действия ЛГ/ФСГ

Воздействие низких уровней ХГЧ

Нарушение контактов и проводящей способности клеток кумулюса и лучистого венца

В цитоплазме не происходят процессы созревания и завершение мейоза I

Почему на пункции не получают ооцитов или получают меньше ожидаемого количества

Патогенез синдрома пустого фолликула

- На ооциты не воздействовал ХГЧ
- Клетки лучистого венца не сокращаются
- Цитоплазма не созревает и мейоз I не завершается
- Ооцит не отделяется от стенки фолликула

Лабораторные факторы

- Низкое давление в аспирационной системе
- Низкая квалификация эмбриолога
- Контаминация кровью

Качество ооцитов
(прогностические факторы)

Характеристики

- **Морфологические**

(аномальные морфологические характеристики отмечаются у 60-70% ооцитов).

(Van Blerkom J, Henry GH. (1992) Oocyte dismorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. Human Reproduction; 7: 379–390.

Balaban B, Urman B. (2006) Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. Reproductive Biomedicine Online; 12(5): 608-615..)

- **Клеточные и молекулярные**

-экспрессия генов в ооцитах и кумулюсных клетках

-генетический анализ полярных телец

-протеомика (анализ экскретируемых ооцитом белков)

-метаболиты в фолликулярной жидкости и культуральной среде

Patrizio P et al. (2007) Molecular methods for selection of the ideal oocyte. Reproductive Biomedicine Online; 15: 346–353.

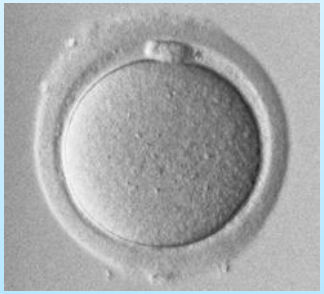
Gilchrist RB et al. (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Human Reproduction Update; 14: 159–177.

Revelli A et al. (2009) Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. Reproductive Biology and Endocrinology; 7:40.

Микроскопия с использованием модуляционнного контраста Хоффмана, Намарского

Микроскопия в поляризованном свете

Зрелость ядра

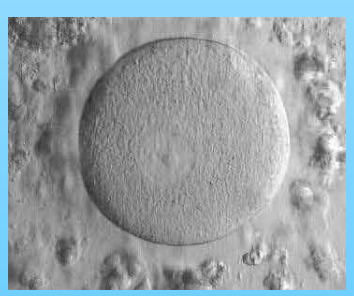


Ооцит на стадии метафазы М II (зрелый)

Первое полярное тельце

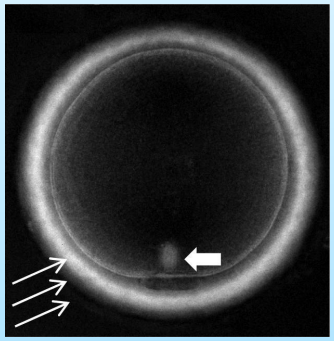
Ооцит на стадии метафазы М I (незрелый)

Отсутствует полярное тельце и зародышевый пузырек



Стадия зародышевого пузырька GV (незрелый)

Отсутствует полярное тельце и зародышевый пузырек

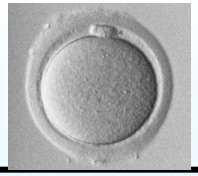


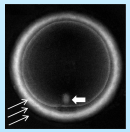
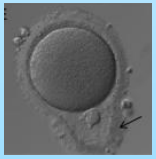
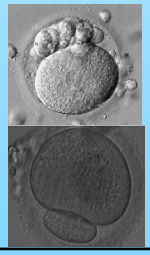
Hum Reprod Update. 2011 Jan-Feb; 17(1): 34–45.

Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature

Laura RienziLaura Rienzi, Gábor VajtaLaura Rienzi, Gábor Vajta, Filippo Ubaldi

Таблица. ***Критерии качества ооцита***



Критерий (экстра-цитоплазмотический)	Параметры	Ссылки
Форма ооцита	округлость, размер 155мкм (гигантский ооцит 200мкм)	*De Sutter et al.,1996; Balaban et al., 1998;., Ebner et al.,2008*
Зона pellucida (блестящая оболочка) 	гликопротеиновая мембрана, три слоя, толщина внутреннего слоя, высокие двупреломляющие свойства внутреннего слоя в поляризованном свете	*Shen et al. (2005), Rama Raju et al.,2007 Montag et al.,2008; Ebner et al., 2010,*
Перивитилиновое пространство 	увеличенное перивитилиновое пространство, присутствие гранулирования	*Balaban et al., 1996,2008; Chamayoy et al.,2006; Ten et al., 2007*
Морфология первого полярного тела (PBI) 	поверхность, фрагментация, размер	*Chamayoy et al.,2006; Ten et al., 2007; Rienzi et al.,2008*
Ооцит-кумулюсный комплекс	объем кумулюсных клеток и короны radiata	*Ng ST, et al.,2003 Ebner T, et al.,. 2008*

Продолжение таблицы.

Критерии качества ооцита

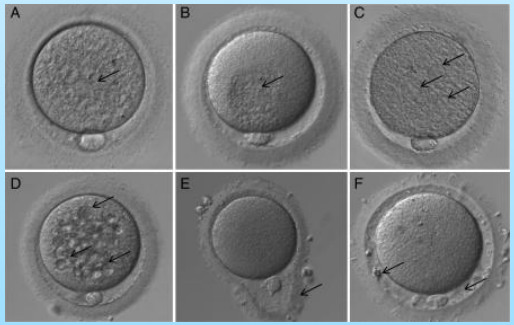
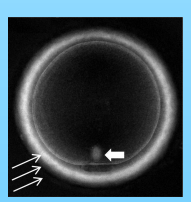
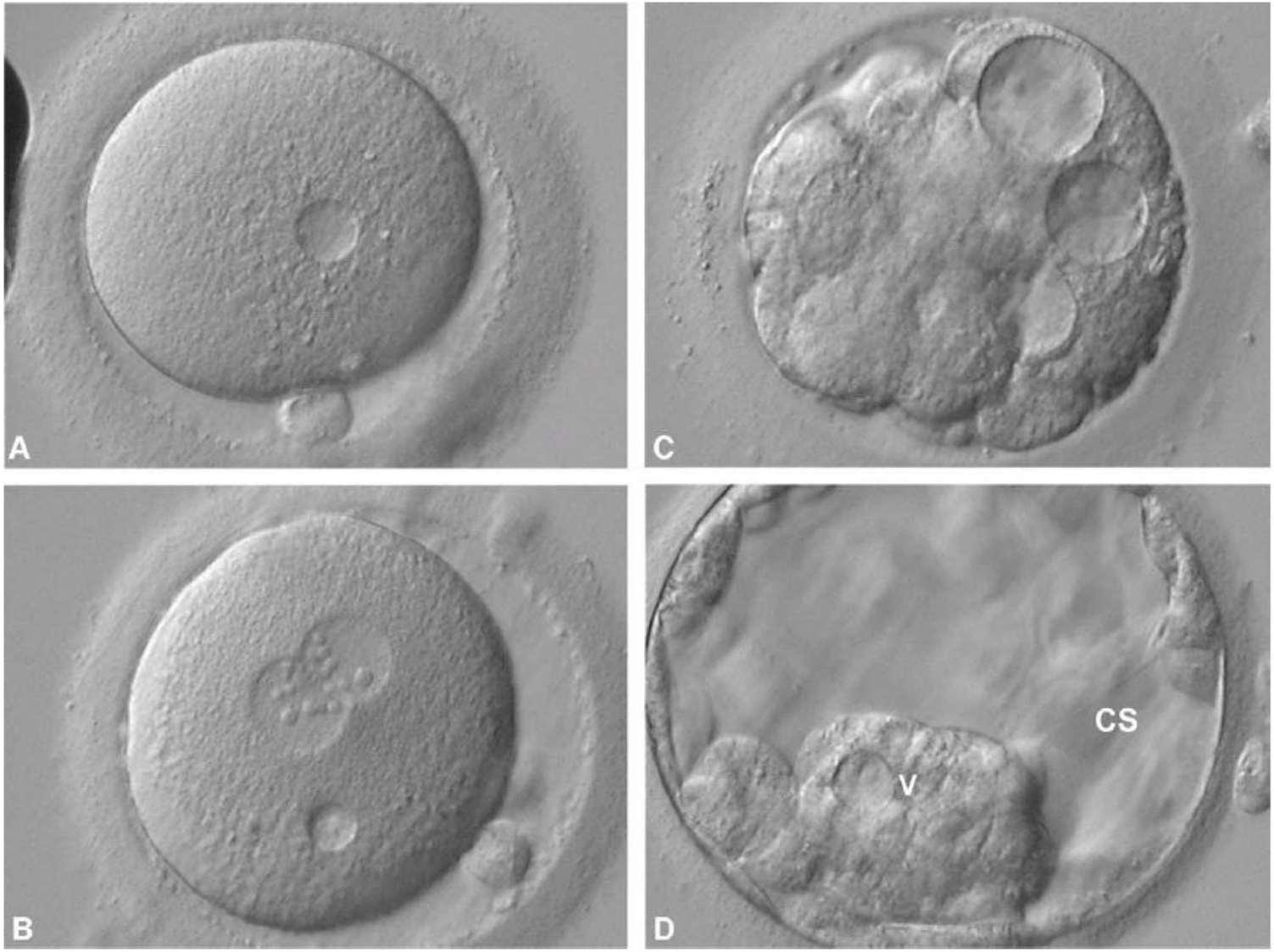
Критерий (интра-цитоплазмачиский)	Параметры	Ссылки
Ооплазма 	Цвет, прозрачность, гранулирование (однородное и неоднородное) расположенное гранулирования (на одной или двух сторонах ооцита, или в центре) Присутствие вакуолей и/или цитоплазматические включения (кластеры эндоплазматического ретикулума, фрагменты, липидные капли), вязкость и сопротивление клеточной мембраны при ИКСИ	*De Sutter et al.,1996; Loutradis et al., 1999; Esfandiari et al., 2006; Ten et al., 2007; Rienzi et al.,2008*
Веретено деления хромосом 	Наличие веретена, расположение непосредственно под PB I, длина, двойное преломление в поляризованном свете.	*De Sutter et al.,1996; Loutradis et al., 1999; Esfandiari et al., 2006; Ten et al., 2007; Rienzi et al.,2008*

FIGURE 1

Vacuolization throughout preimplantation development. (**A**) Vacuole (17 μm) in MII oocyte. (**B**) Ten-μm vacuole at zygote stage. (**C**) Compacting embryo with severe vacuolization (22–35 μm). (**D**) Vacuole (17 μm) in the inner cell mass of an expanded blastocyst. CS = cytoplasmic string; V = vacuole.



Ebner. Vascuolization throughout development. Fertil Steril 2005.

применением поляризационной микроскопии: анализ зоны пеллюцида и веретена деления

- фиброгранулярная структура, три слоя
- высокие двупреломляющие свойства внутреннего слоя
- внутренний слой синтезируется ооцитом

Многочисленные публикации делают очевидной зависимость двупреломляющих свойств блестящей оболочки и потенциала развития ооцита:

Shen et al. (2005), **ретроспективное исследование**

Rama Raju et al. (2007)

Montag et al. (2008), **проспективное исследование**

Ebner et al. (2010), **проспективное исследование**

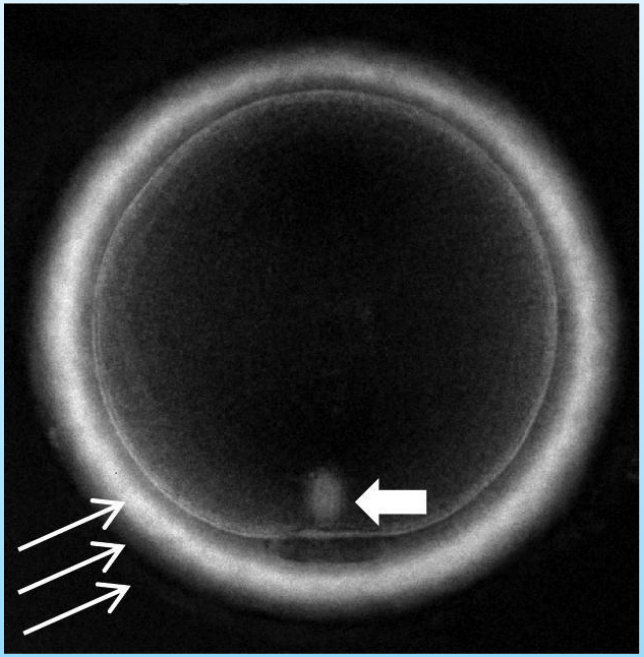


Рисунок. Метафаза II человеческих ооцитов с использованием поляризованной световой микроскопии (400× ув): веретено деления(короткая стрелка) и слои зоны pellucida (длинные стрелки)

Дисморфизм
(гипотеза Blerkom, Henry, 1992)

Раннее созревание

-Гигантские ооциты
-Центральная грануляция
-Веретено деления

Позднее созревание

-Агрегация эндоплазма-
тического ретикулума (sER)
-Вакуолизация
-Фрагментированное
полярное тельце

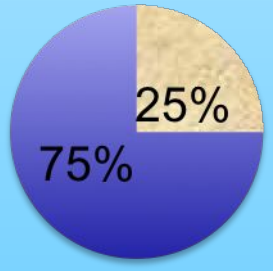
Криоконсервированные ооциты
Возможные последствия

- Изменение метаболизма
- Ультраструктуральные повреждения (оргенеллы, цитоскелет), деполимеризация микротрубочек MII веретена деления (степень вырожанности коррелирует с возастом)
- Уменьшается количество кортикальных гранул, ZP уплотняется, способность к оплодотворению снижается

Кумулятивный показатель беременности

(возраст пациенток <39 лет)

Криоконсервация эмбрионов



Криоконсервация ооцитов

Ооцит с хорошей морфологией «компетентный ооцит»

- правильной (сферической) формы
- с однородной, равномерно гранулированной цитоплазмой
- с маленьким перивителлиновым пространством
- с интактным первым полярным телом
- бесцветной зоной пеллюцида

Созревание ооцитов в условиях in vitro (IVM – in vitro maturation) репродуктивная технология

- 1991 год – первая IVM беременность, Южная Корея

% беременности /ET ≈ 27% (1999-2015гг IVF Japan)

- Показания для IVM

  - синдром поликистозных яичников (пациенты с высоким риском гиперстимуляции яичников)
  - пациентки с большим количеством незрелых ооцитов
  - противопоказания к гормональной стимуляции (эндометриоз, гормоно-зависимые опухоли, заболевания молочных желез, щитовидной железы и др.)
  - для доноров ооцитов (снижение гормонально нагрузки, удешевление протокоола стимуляции)
  - для женщин со слабым ответом на гормональную стимуляцию ≤ 3 ооцита MII, как альтернатива остановке программы ЭКО
  - для пациенток перед химиотерапией.

IVM метод

Мониторинг	С 7-го д.ц.
День пункции	2 фолликула >7 мм
Критерий отмены	Доминантный фолликул, формирование кист
Тригер, ХГЧ	За 36 ч до ТВП
Аспирация ооцитов	Аспирационное давление 100mmHG, IVM игла
IVM среда	Комерческая среда, 100 IU/l, FSH75 IU/l, 10% сыворотки крови пациента
Время созревания	24-48 ч

- Недостатки метода

- Неоднородный пул ооцитов (GV, MI, MII)
- Дифференциальное расписание оплодотворения (ICSI)
- Дисинхронизация этапов развития эмбриона, сложность выбора времени переноса и криоконсервации.

Факторы, влияющие на качество ооцита

Клинические факторы

- Гинекологические заболевания (синдром поликистозных яичников, эндометриоз, аутоимунный оофорит)
- Стимуляция суперовуляции в циклах ЭКО
- Ошибки сегрегации хромосом во время мейоза I и II
- Возраст пациентки
- Факторы апоптоза

Лабораторные факторы in vitro (субоптимальные)

- Температура аспирации, рабочих поверхностей, при ICSI
- pH культуральной среды
- Осмолярность культуральной среды
- Температура
- O_2
- Использование эмбриотестированного пластика
- In vitro манипуляции
- Качество воздуха в ЭКО лаборатории
- Факторы апоптоза

Клинические факторы. Стимуляция суперовуляции в циклах ЭКО

- влияет на микроокружение ооцита и как следствие на качество ооцита, включая морфологию, хромосомные аномалии, степень зрелости ооцита
- Суммарная доза гонадотропинов

  - FSH, используемого для яичниковой стимуляции, может затронуть организацию ооцита и, в частности, отрицательно влияет на визуализацию веретена деления

  - ЛГ играет главную роль в процессе созревания ооцита, необходим для завершения первого мейотического деления – формирования ооцита второго порядка

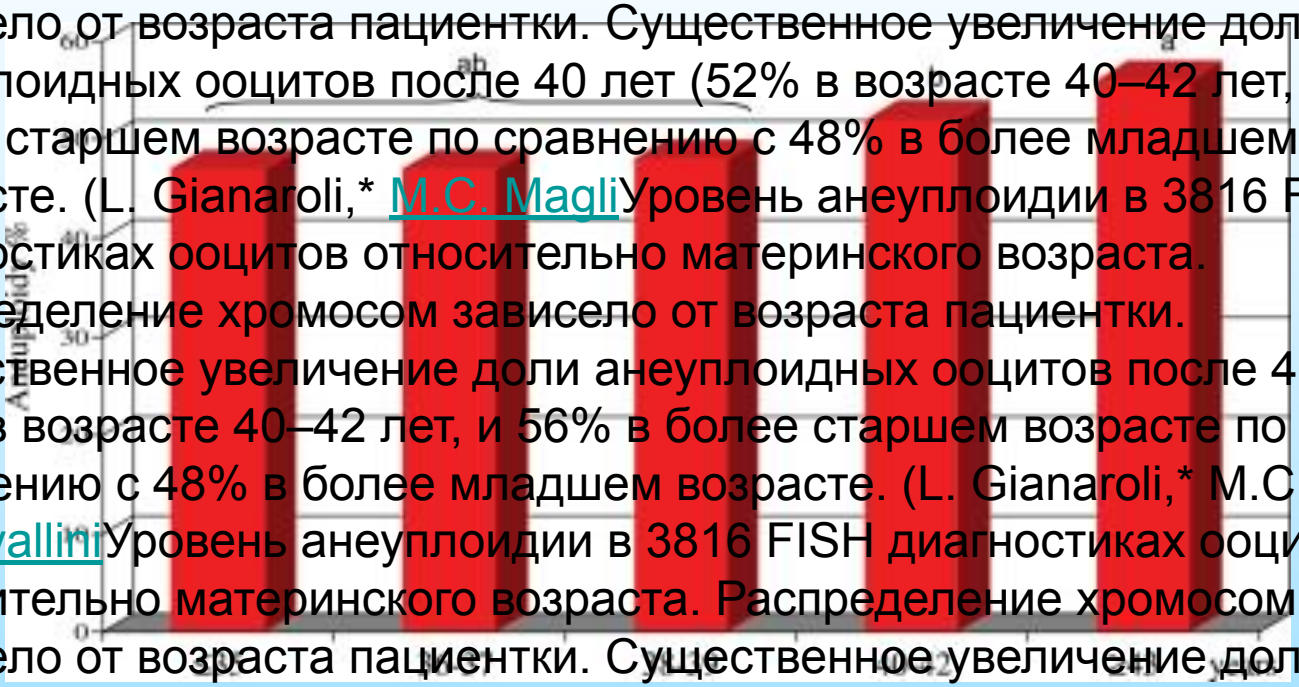
Возраст

1.Остановка эмбриогенеза может быть результатом событий, связанных с созреванием или несостоятельностью метаболизма ооцита. Цитоплазма ооцита является средой для вновь образованного ядра зиготы.

2. Частота анеуплоидии значительно увеличивается с увеличением материнского возраста.

Считается, что до 30% человеческих зигот анеуплоидны, это число, более чем удваивается у женщинах с возрастом старше 38 лет (Кулиев и др., 2005). Ооцит является основным фактором анеуплоидии эмбриона.

возрасте. (L. GianaroliУровень анеуплоидии в 3816 FISH диагностиках ооцитов относительно материнского возраста. Распределение хромосом зависело от возраста пациентки. Существенное увеличение доли анеуплоидных ооцитов после 40 лет (52% в возрасте 40–42 лет, и 56% в более старшем возрасте по сравнению с 48% в более младшем возрасте. (L. Gianaroli,* M.C. MagliУровень анеуплоидии в 3816 FISH диагностиках ооцитов относительно материнского возраста. Распределение хромосом зависело от возраста пациентки. Существенное увеличение доли анеуплоидных ооцитов после 40 лет (52% в возрасте 40–42 лет, и 56% в более старшем возрасте по сравнению с 48% в более младшем возрасте. (L. Gianaroli,* M.C. Magli, G. CavalliniУровень анеуплоидии в 3816 FISH диагностиках ооцитов относительно материнского возраста. Распределение хромосом зависело от возраста пациентки. Существенное увеличение доли анеуплоидных ооцитов после 40 лет (52% в возрасте 40–42 лет, и 56% в более старшем возрасте по сравнению с 48% в более младшем возрасте. (L. Gianaroli,* M.C. Magli, G. Cavallini, A. CrippaУровень анеуплоидии в 3816 FISH диагностиках ооцитов относительно материнского возраста. Распределение хромосом зависело от возраста пациентки. Существенное увеличение доли анеуплоидных ооцитов после 40 лет (52% в возрасте 40–42 лет, и 56% в более старшем возрасте по сравнению с 48% в более младшем возрасте. (L. Gianaroli,* M.C. Magli, G. Cavallini, A. Crippa, A. CapotiУровень анеуплоидии в 3816 FISH диагностиках ооцитов относительно материнского возраста. Распределение хромосом зависело от возраста пациентки.



«Маркеры апоптоза как предикторы эффективности вспомогательных репродуктивных технологий»
Грищенко Н.Г.
Харьковский национальный медицинский университет
Международный медицинский журнал, 2010, №4

Существуют исследования, которые позволяют предположить, что причину неуспеха ВРТ надо искать в области, связанной с апоптозом (Antczak M. et al, 1999, Levy R. et al, 1998, Haouzi D. et al, Барышников А.Ю. И др., 2002)
Большинство ооцитов в фолликулах в разные периоды своего роста претерпевают обратное развитие (атрезию). Этот механизм направлен на предотвращение образования избыточного количества яйцеклеток. В основе этого процесса находятся апоптоз – процесс програмируемой гибели. Возможно, именно процесс инициации в яйцеклетке каскада апоптических реакций является первопричиной элиминации ооцитов, неспособных к оплодотворению, получения эмбрионов низкого качества, остановки развития эмбрионов, плохой выживаемости ооцитов и эмбрионов после криоконсервации.

Для атретичных фолликулов характерны прогрессирующее уплотнение яйцеклетки, утолщение прозрачной зоны, регрессия фолликулярного эпителия, лизис органелл, кортикальных гранул, сморщивание ядра. Блестящая зона становится складчатой, утолщается и гиалинизируется.

Факторы, влияющие на качество ооцита

Клинические факторы

- Гинекологические заболевания (синдром поликистозных яичников, эндометриоз, аутоимунный оофорит)
- Стимуляция суперовуляции в циклах ЭКО
- Ошибки сегрегации хромосом во время мейоза I и II
- Возраст пациентки
- Факторы апоптоза

Лабораторные факторы in vitro (субоптимальные)

- Температура аспирации, рабочих поверхностей, при ICSI
- pH культуральной среды
- Осмолярность культуральной среды
- Температура
- O_2
- Использование эмбриотестированного пластика
- In vitro манипуляции
- Качество воздуха в ЭКО лаборатории
- Факторы апоптоза

pH культуральной среды

pH культуральной среды находится в физиологическом интервале 7,2 – 7,4.

Бикарбонатный буфер культ. среды + 5-6% CO_2

Установка in vitro различных значений pH для разных стадий (ооцит, 2 pn зигота, дробящийся эмбрион, бластоциста), положительно сказывается на развитии эмбриона.

Ооцит не способен в ощутимой мере регулировать свой внутриклеточный pH, его pH повторяет pH окружающей среды.

Эмбрионы, напротив, способны к поддержанию слегка кислого pH (7,1 – 7,2) даже при более высоких значениях pH окружающей среды.

Опасны перепады pH среды связанные с частым

открыванием инкубатора и выветриванием CO_2, и нахождением чашек с клетками вне инкубатора более 3-х минут.

Dale B et al. (1998) Intracellular pH regulation in the human oocyte.
Human Reproduction; 13: 964–970.

Swain JE, Pool TB. (2009) New pH-buffering system for media utilized during gamete and embryo manipulations for assisted reproduction. Reproductive Biomedicine Online; 18: 799-810.

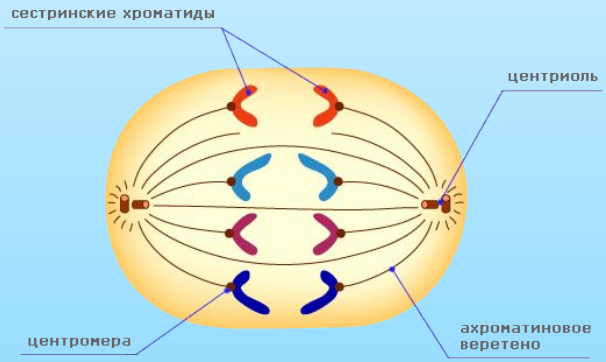
Температура

При снижение температуры изменяется веретено деления.

Деполимеризация веретена деления

Нарушения метаболизма, стабильности клеточных мембран итранспортных процессов

При 10 мин охлаждении до 33°C, веретено деления разбирается, но способно восстановиться (с возможными ошибками)



При охлаждении до 28 °C веретено восстанавливается лишь у 40% клеток (с возможными ошибками)

При охлаждении до 25°C веретено деления не восстанавливается

Pickering SJ et al. (1990) Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. Fertility and Sterility; 54: 102-108.

Wang WH et al. (2001) Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. Human Reproduction; 16: 2374-2378.

Осмолярность

Важной характеристикой среды является ее осмолярность, определяемая концентрацией и константами диссоциации ее компонентов.
Обычно осмолярность равняется 285 мОсм/кг воды и соответствует таковой крови.
Важным параметром стабильности осмолярности в культуральной среде является температура и влажность.
Изменение осмолярности является результатом испарение культуральной среды.
Изменения осмолярности приводят к сморщиванию или набуханию ооцитов. Испарения можно избежать, покрыв среду слоем масла.

Как обеспечить стабильность среды культивирования

- Использовать минеральное масло.
- При работе с гаметами и эмбрионами вне инкубатора действовать максимально быстро (3 минуты)
- Обеспечить поддержание необходимой температуры среды внутри чашки. Нагревательные поверхности должны обеспечивать стабильное поддержание необходимого значения температуры и быть откалиброваны с учётом использования конкретного культурального пластика.

O2

- Ооцитам и эмбрионам необходим кислород, в условиях in vitro они генерируют АТФ путем аэробного окислительного метаболизма пирувата, лактата, аминокислот и возможно липидов

- *In vivo* ооциты и эмбрионы развиваются в условиях концентрации O2, не превышающей 5-8%. Атмосферный уровень кислорода – 21% - не является для эмбрионов физиологически нормальным и способствует образованию большого количества активных форм кислорода

Выводы

- **Получение ооцита**

- Трансвагинальная функция фолликулов под ультрозвуковым контролем
- Температура 37°С
- Стабильный pH-7,4

- **Качество ооцитов**

- На способность ооцита к развитию влияют:

размер ооцита, зрелость ядра, визуализация веретена деления, цитоплазматические характеристики: тип грануляции, наличие вакуолей, скопление гладкого эндоплазматического ретикулума.

- На способность ооцита к развитию не влияют:

экстрацитоплазматические характеристики.

Классическая методика экстракорпорального оплодотворения

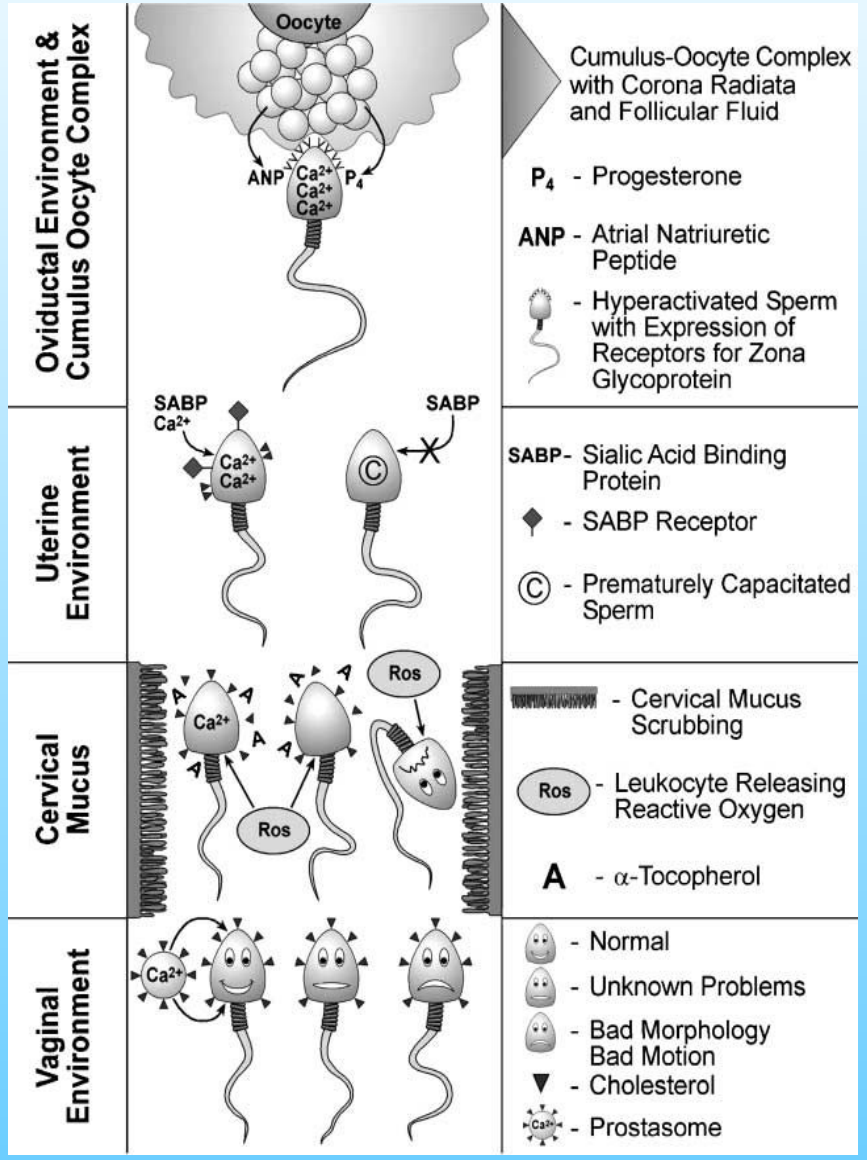
Подготовка сперматозоидов к оплодотворению

«созревание спермиев» in vivo:

1. Активация спермиев в придатках яичка (эпидидимусе) – обретение подвижности. Сперматозоид должен встретить ооцит до истощения своих энергетических ресурсов.

2. Капацитация (процесс приобретения мужскими гаметами оплодотворяющей способности) проходит в женских половых путях занимает около 6 часов. Происходит гиперактивация, необходимая для достижения места оплодотворения и связывания с оболочкой ооцита. Исчезают эпидимальные и семенные белки, окружающие сперматозоид. Происходит реакция дестабилизации плазматической мембраны в области акросомы. Изменяется строение гликопротеинов плазматической мембраны, обнажаются участки рецепторов, способных принимать сигналы от ооцита и запускать начало акрасомальной реакции. Капацитация является температурозависимым процессом и проходит при температуре 37°С.

Сперматозоид человека in vivo



Подготовка спермы к оплодотворению

- Удаление семенной плазмы и простагландинов
- Удаление мертвых, неподвижных сперматозоидов, клеток эпителия мочеполового тракта, клеток простаты, лейкоцитов, клеток сперматогенеза, бактерий (источник АФК – активных форм кислорода)
- Получить высокую концентрацию подвижных, морфологически качественных, зрелых сперматозоидов
- Имитировать процесс капацитации сперматозоидов

Капацитация

Биохимически капацитация — это изменение строения некоторых молекул (стеролов, липидов и гликозилированных белков) цитоплазматической мембраны сперматозоида. Принципиально сложные изменения дают возможность сперматозоиду:

- вступить в фазу гиперактивации
- образовывать необходимые связи с рецепторами на поверхности прозрачной оболочки.
- запустить физиологическую акросомальную реакцию

В процессе капацитации происходит удаление компонентов семенной жидкости (отмывка сперматозоидов)

-Холистерин (блокирует капацитацию, вызывает декапацитацию)

-утрачиваются рецепторы к фрукозе и маннозе, ингибирующие связывание интактного сперматозоида с зоной пилюцида (ZP) ооцита

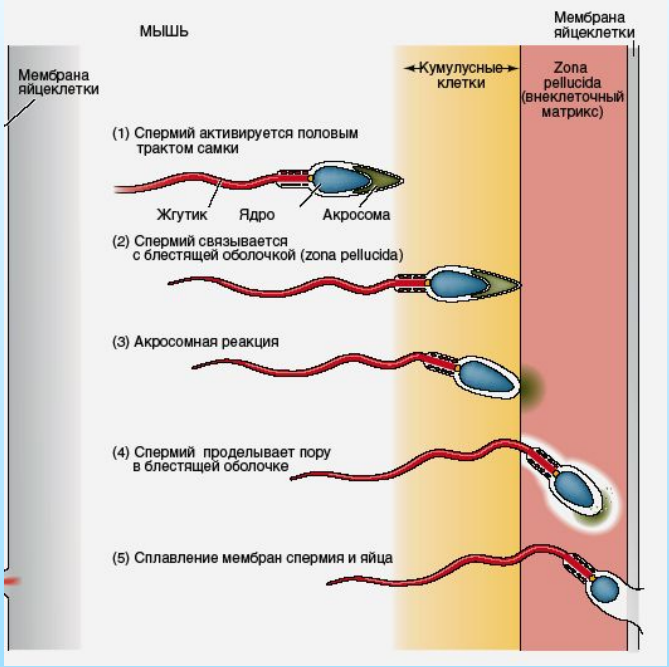
Спермий в половых путях самки. Схема оплодотворения.

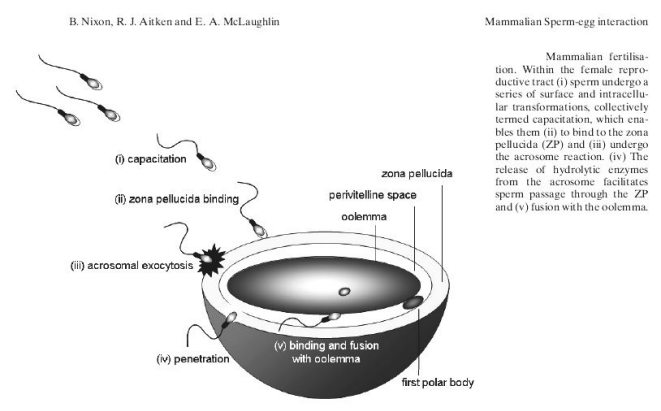
- Капацитация
- Гиперактивация
- Преодоление 3-х естественных барьеров:

1. **клетки кумулюса** и лучистого венца (гиалуронидаза)
2. связывание с **zona pellucida** (гликопротеины ZP1, ZP2, ZP3, ZP4), акросомный экзоцитоз, проникновение сквозь zona pellucida
3. **цитоплазматическая мембрана ооцита** (оолемма), сплавление мембран спермия и ооцита, поглощение спермия ооцитом (фагоцитоз)

деконденсация ядерного материала и образование мужского пронуклеуса

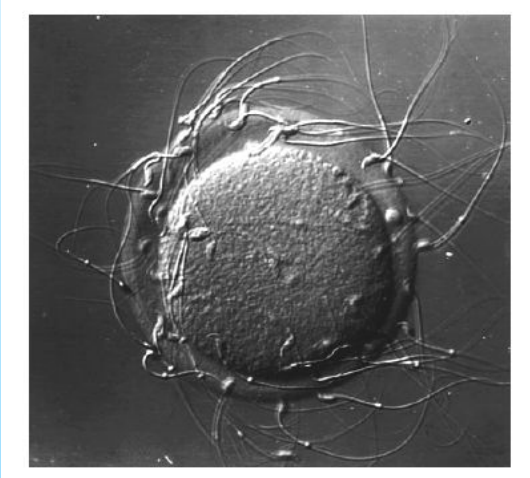
Harper и соавт., 2008





Реакция зоны

Блок полиспермии необходим для предотвращения нарушения оплодотворения



Индуцируется фактором активации фосфолипазы C-zeta сперматозоида.

Медленный блок полиспермии (свойственный млекопитающим)

Ca++-зависимая реакция
Кортикальная реакция ооцита

Кортикальные гранулы - гомологи акросомного пузырька спематозоида.
Содержат протеолитические ферменты, мукополисахарид, гиалин, изменяют структуру гликопротеинов ZP2, ZP3

Подготовка спермы для проведения ЭКО и внутриматочной инсеминации

Удаление семенной жидкости Капацитация

Увеличивается проницаемость цитоплазмотической мембраны
Повышается подвижность сперматозоидов (гиперактивация)
Подготовка к акросомальной реакции

Спермальный профиль пациента → Выбор метода подготовки спермы к оплодотворению

Основные показатели:
Объем
Концентрация
Соотношение числа подвижных и неподвижных форм
Присутствие антител, наличие дебриса, клеточных элементов.

Метод «swim-up»

Метод градиент плотности

Метод **«swim-up»**

Принцип метода основан на различной подвижности сперматозоидов

Критерии выбора метода:

- нормозооспрмия
- легкие формы олиго-, астено-, тератозооспермии.
- нормальная вязкость
- агглютинации нет

Метод не рекомендуется при:

- значительной клеточной контаминации

«+»	«-»
- дешево	-отбор только по подвижности
- просто	-плохо очищает от клеточых включений, влияние АФК
	-риск передачи инфекционных агентов

Метод «градиент плотности»

Критерии выбора метода:

- олиго-, астено-, тератозооспермия
- присутствие значительной клеточной контаминации и посторонних клеточных элементов
- Mar-test > 30%

Принцип метода

центрифугирование через градиент коллоидных растворов разной плотности (40%, 80%, 90%)

«+»

-Легко
-Селекция по подвижности и морфологии, интактная ДНК, хорошо конденсированный хромотин, низкая степень аппоптоза
-Удаление компонентов семенной жидкости, клеток крови, инфекционных агантов

«-»

- дорого

Подготовка спермы к проведению ИКСИ

Критерии выбора:

- олигоспермия, объем ≤ 0,5 мл
- выраженная олиго-астенозооспермия,
- криптозооспермия
- акинозоосперми
- сперматозоиды TESE, TESA, MESA PESA

Принцип метода:

Промывка спермы. Выделение сперматозоидов из семенной жидкости и секрета предстательной железы путем центрифугирования смеси спермы со средой для приготовления сперматозоидов.

Инсеменация ООЦИТОВ in vitro
Фактор времени

Тригер овуляции (ХГЧ)→36 часов→пункция → → 2- 6 часов→инсеменация

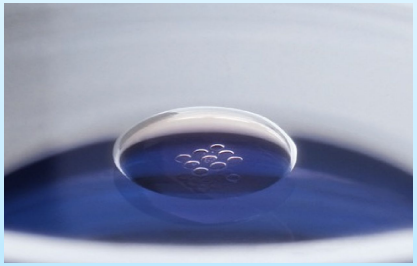
- Способность ооцитов к оплодотворению, последующему дроблению и имплантации статистически достоверно снижается при инкубировании их более 9 ч

Influence of oocyte preincubation time on fertilization after intracytoplasmic sperm injection
K Yanagida, H Yazawa, H Katayose, K Suzuki, K Hoshi A Sato
Human Reproduction 09/1998; 13(8)
The effect of insemination/injection time on the results of IVF and ICSI
M. Jacobs Human Reproduction 08/2001; 16(8):1708-1713

Вывод: Преинкубация обязательно необходима, а ее оптимальная длительность подбирается эмпирически в каждой лаборатории. При этом окно оп лодотворения для зрелого ооцита достаточно широко, однако преждевременное оплодотворение недозревших ооцитов может негативно повлиять на исход дробления и имплантации эмбрионов.

Инсеменация ООЦИТОВ in vitro

Количественный фактор



- Культивирование в большом объеме

Количество прогрессивно подвижных сперматозоидов обычно должно составлять 50 - 150 тыс/мл в ≤ 5мкл

- Культивирование в каплях (0,25-0,50 мкл)

Количество прогрессивно подвижных сперматозоидов должно составлять 50 - 150 тыс. на ооцит

< 50 000 – эффективность оплодотворения будет снижена

>150 000 - повреждения кислородными радикалами ооцитов, зигот, при попадании погибающих или мертвых сперматозоидов, либо воздействия избыточного количества литических акросомальных ферментов. ~~ПОЛИСПЕРМИЯ~~

Однако эти правила реализуется лишь в случае:

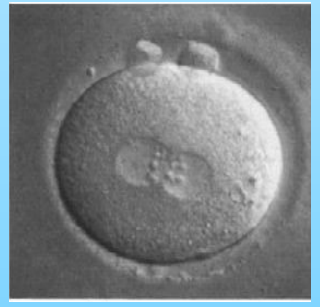
- нормальной морфологии сперматозоидов
- наличия необходимой концентрации активно подвижных сперматозоидов в эякуляте
- отсутствия дефектов акросомальной зоны
- отсутствия больших концентраций антиспермальных антител в сперме (MAR-тест меньше 50%).

Сперматозоид

- капацитация
- гиперактивация
- связывание с zona pellucida
- акросомный экзоцитоз
- проникновение сквозь zona pellucida
- сплавление мембран спермия и ооцита
- поглощение спермия ооцитом
- деконденсация ядерного материала и образование мужского пронуклеуса

Яйцеклетка

- овуляция
- слияние мембран спермия и яйца
- активация яйца:
  - возрастание Ca++
  - кортикальная реакция –блок полиспермии (реакция зоны)
  - завершение мейоза
- образование женского пронуклеуса



- сингамия – сплавление мужского и женского пронуклеусов

Оценка зиготы (1-й день)

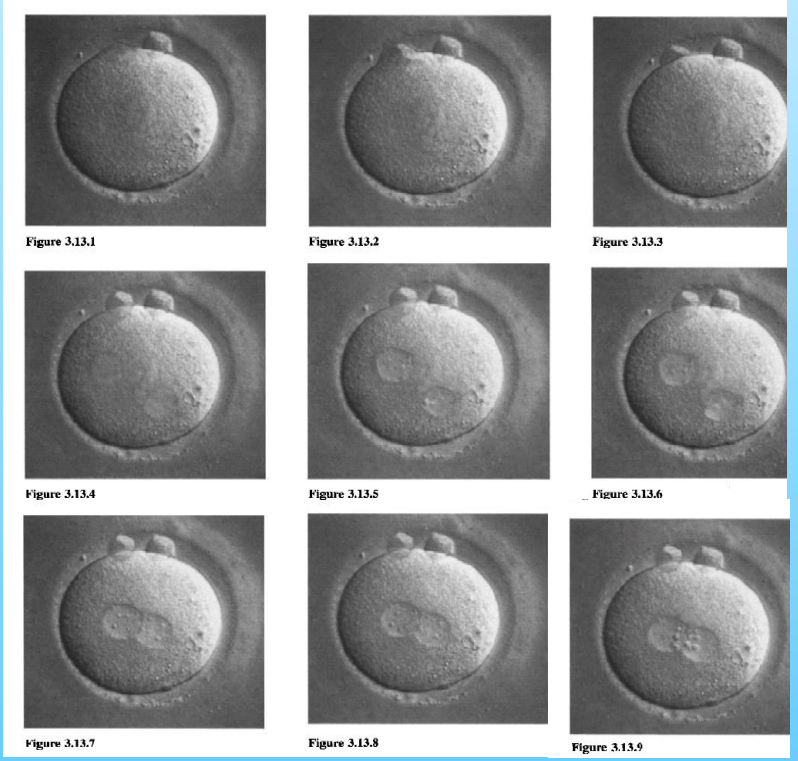
Параметры:

Пронуклеусы

Проядрышки

Полярные тельца

Формирование пронуклеусов



Мужской пронуклеус формируется через 8 часов после оплодотворения

Оба пронуклеуса визуализируются через 10-16 часов и исчезают Через 6-8 часов после появления.

Оценка оплодотворения
(количество пронуклеусов)

Отсутствие оплодотворения

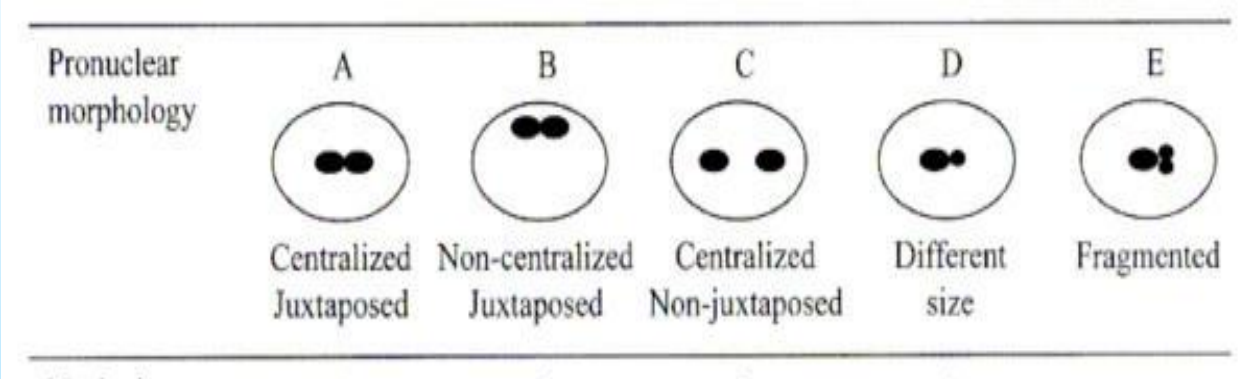
~ 20-30% ооцитов не оплодотворяется (0р)
по причине:

- низкой концентрации активных сперматозоидов
- дефекта в механизме адгезии сперматозоида
- незрелости или плохого качества ооцита

Качество пронуклеарных зигот, их морфология

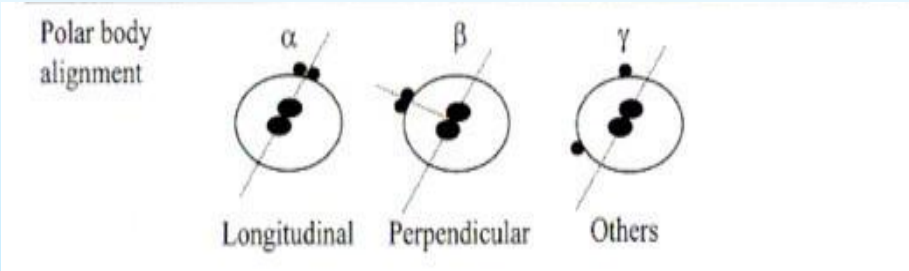
1. Форма зиготы
2. Цитоплазматическое гало (органеллы клетки: митохондрии смещены к центру и окружают пронуклеусы)
3. Грануляция цитоплазмы и наличие включений (вакуолей)
4. Размеры и расположение полярных телец
5. Размеры и расположение пронуклеусов
6. Размеры и расположение проядрышек

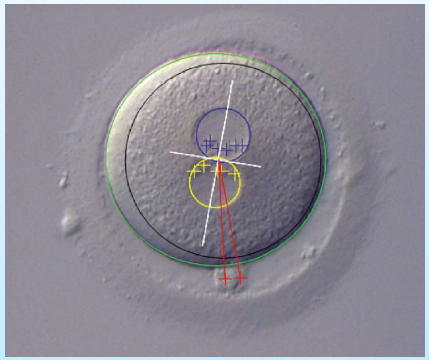
Рисунок. Различные конфигурации, используемые для оценки морфологии пронуклеусов (положение в цитоплазме, размер)



Клинические беременности n, (%)			
	≤32	33-37	38-41
A	95 (39.7)	208 (43,9)	123 (34,7)
B	55 (23.0)	123 (26.0)	53 (15.0)
C	9 (3.8)	11 (2.3)	11 (3.1)
D	3 (1.3)	9 (1.9)	9 (2.5)
E	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
All zygotes	239	473	354

Рисунок.Ориентация пронуклеусов относительно PBII





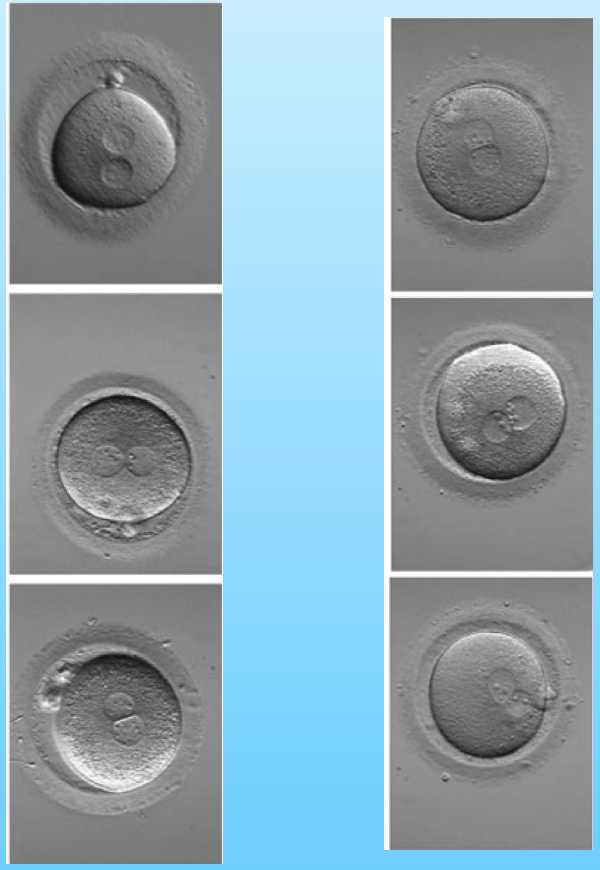


Figure 2: Computer-dependent measurements of morphological features
in zygotes.
Оолемма (зеленый), цитоплазматическое гало (черный), пронуклеусы и проядрышки (желтый и голубой). Соостность пронуклеусов и полярного тела.

Оценка проядрышек

На основе оценки проядрышек пронуклеусов разработаны системы оценки жизнеспособности эмбрионов человека

Количество
Размер
Расположение и сходство в обоих пронуклеусах

Classification of PNs by Tesarik et al., 1999

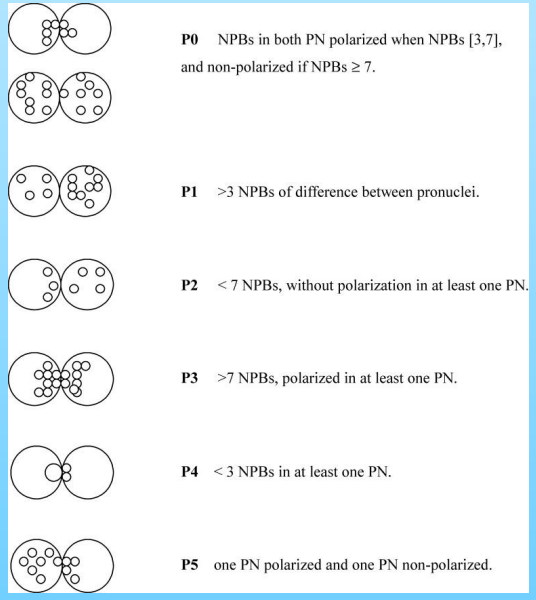
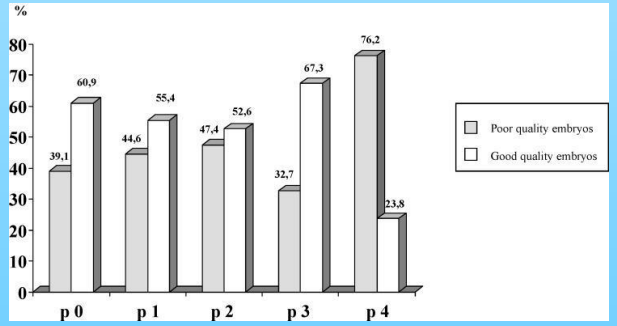


Table 1

Distribution of zygotes according to Tesarik's classification

Patterns	*n*	Percentage
p0	226	39%
p1	101	18%
p2	137	24%
p3	56	10%
p4	44	8%
p5	5	1%



Zygotes classified according to Tesarik's system and the quality embryo developed

Classification of PNs by Scott et al., 2000

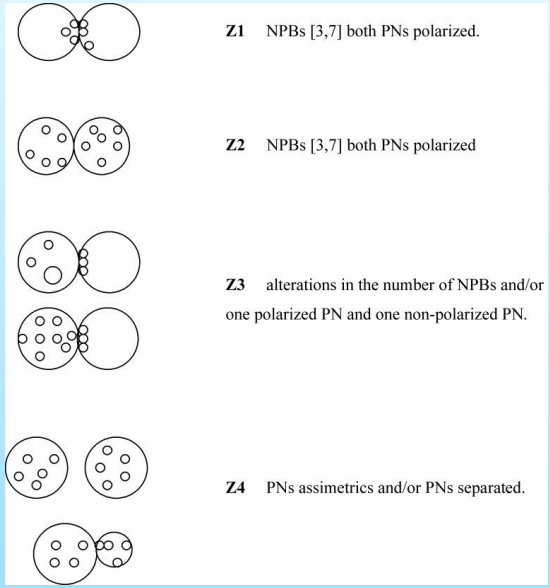
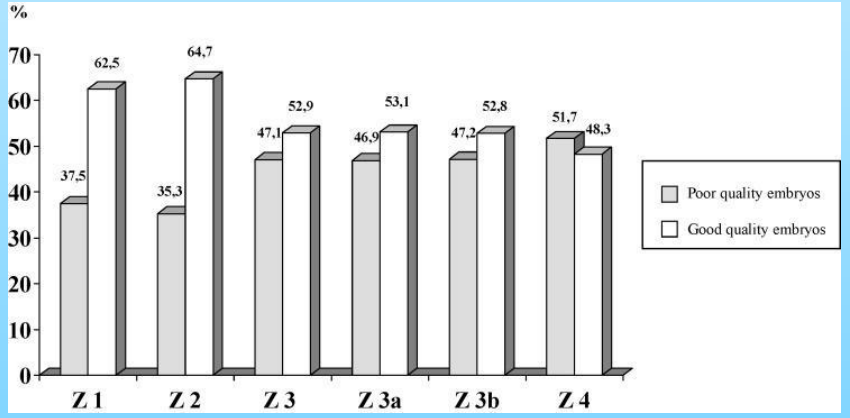


Table 2

Distribution of zygotes according to Scott's classification

Patterns	*n*	Percentage
Z1	128	23%
Z2	34	6%
Z3a	143	25%
Z3b	231	41%
Z4	29	5%

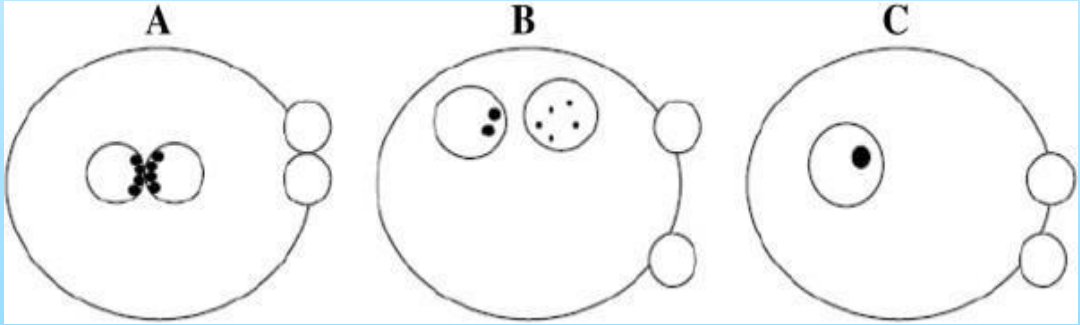


Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: Usefulness of pronuclear scoring

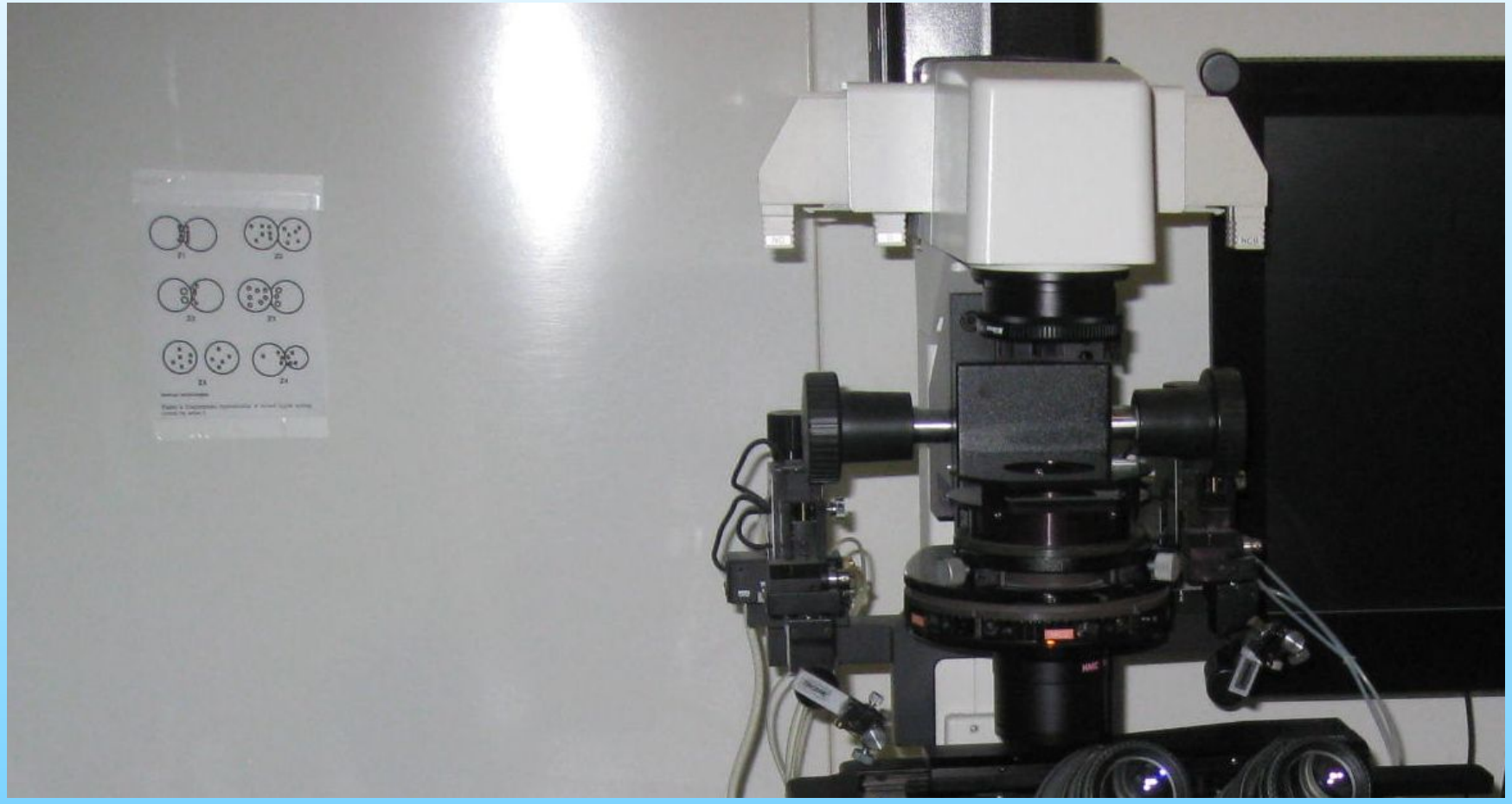
J Assist Reprod Genet. 2007 May; 24(5): 173–181

Gemma ArroyoGemma Arroyo, 1 Anna VeigaGemma Arroyo, 1 Anna Veiga,1 Josep SantalóGemma Arroyo, 1 Anna Veiga,1 Josep Santaló,2 and Pere Nolasc Barri1

ESHRE системы оценки морфологии зиготы



Каждая лаборатория может выработать систему для оценки морфологии зигот.



Лаборатория эмбриологии Клиники Доктора Гакштайгера, г. Ульм, Германия