

ГЛАВА IV

**Современные подходы к лечению
нарушений репродуктивной
функции у человека.
Применение вспомогательных
репродуктивных технологий**

4.1. Развитие современных методов лечения бесплодия

Согласно определению, принятому на Международной конференции по населению и развитию (The International Conference on Population and Development), проведенной в Каире в 1994 г., "репродуктивное здоровье – это состояние полного физического, умственного и социального благополучия, а не просто отсутствие болезней или недугов во всех аспектах, касающихся репродуктивной системы, ее функции и процессов". Современная репродуктивная медицина изучает все вопросы репродуктивного здоровья людей с момента рождения и до глубокой старости и включает следующие направления: эндокринологические и нейроэндокринологические аспекты регуляции репродуктивного процесса, проблемы бесплодия, вспомогательные репродуктивные технологии, вопросы, связанные с оплодотворением, имплантацией и развитием эмбриона, генетические аспекты репродукции, заместительную гормональную терапию, вопросы, связанные с контрацепцией, проблемы андро- и менопаузы, перинатальную и фетальную медицину, междисциплинарные аспекты акушерства, детскую андрогинекологию, сексологию и качество жизни, хирургию в гинекологии и андрологии, вопросы послеоперационной реабилитации.

Одним из ключевых направлений репродуктивной медицины является исследование бесплодия в семье. По данным ВОЗ (2002 г.) и ESHRE (2006 г.) в мире насчитывается около 50-80·10⁶ бесплодных супружеских пар. В западных странах каждая шестая пара репродуктивного возраста (от 15 до 45 лет) имеет нарушение репродуктивной функции (Soini et al., 2006). Как рассматривалось выше, около 30-35% случаев нарушения репродуктивной функции обусловлены женским фактором, приблизительно такой же процент (25-30%) составляют нарушения деятельности репродуктивной системы у мужчины, в 20-30% случаев наблюдается сочетанное бесплодие и примерно в 10-15% случаев причина бесплодия не установлена – так называемое идиопатическое (необъясни-

мое) бесплодие, для которого характерны нормальные результаты стандартного обследования (Dohle et al., 2005) (рис. 2.1).

Еще 40-45 лет назад проблема бесплодия не была так актуальна, как сегодня, а знания о причинах нарушения репродуктивной функции и способах его лечения были существенно ограничены. Современное понимание патофизиологических процессов оогенеза и сперматогенеза, функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадного тракта, процессов оплодотворения и имплантации эмбриона позволяет проводить диагностику и лечение нарушений репродуктивной функции как у мужчины, так и у женщины.

Протоколы обследования супружеских пар, которые обращаются в связи с нарушением репродуктивной функции, основываются на рекомендациях Всемирной организации здравоохранения.

Обследование позволяет определить основной фактор бесплодия у одного или обоих супругов и, соответственно, разработать алгоритм лечения в каждом конкретном случае. В зависимости от данных, полученных в результате обследования, современные высокоэффективные методы лечения бесплодия представлены двумя направлениями: восстановление естественной фертильности супружеской пары и применение вспомогательных репродуктивных технологий.

Восстановление естественной фертильности предусматривает проведение эндоскопических операций, медикаментозной коррекции эндокринологических нарушений и эндометриоза, а также сочетание этих подходов.

Разработка и интенсивное внедрение ВРТ в практику здравоохранения в течение последних 30 лет позволили не только диагностировать бесплодие, но и кардинально повысить эффективность его лечения, исследовать механизмы нарушения репродуктивной функции. ВРТ представляют

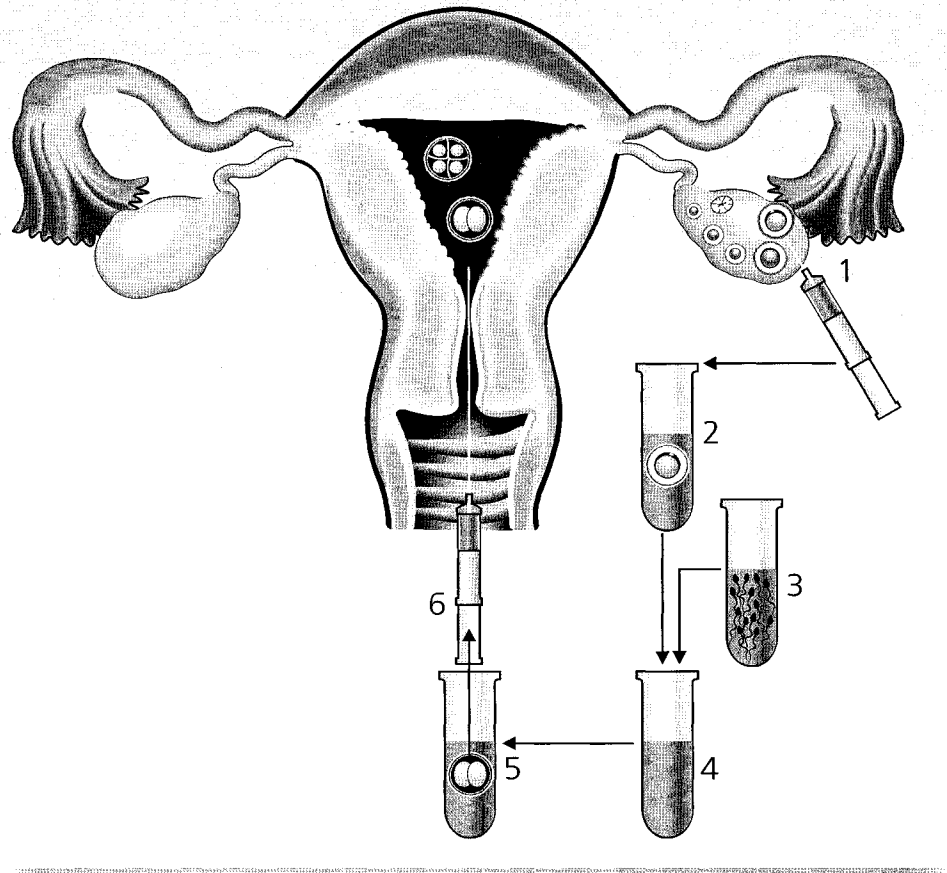


Рис. 4.1. Поэтапное применение ВРТ. Схема:

- 1 – пункция яичника и аспирация фолликулярной жидкости; 2 – ооциты;
3 – сперматозоиды; 4 – оплодотворение *in vitro*; 5 – эмбрион;
6 – перенос эмбриона в полость матки.

собой комплекс мероприятий, проводимых с целью наступления беременности и рождения здорового ребенка при невозможности забеременеть и выносить плод естественным путем. В ходе применения ВРТ отдельные или все этапы зачатия и раннего развития эмбриона могут осуществляться вне организма (рис. 4.1).

Успешное применение ВРТ оценивают не только частотой наступления беременности, но и рождением здоровых детей при сохранении здоровья женщины. К ВРТ относят следующие методы:

- экстракорпоральное оплодотворение и перенос эмбрионов в полость матки (ЭКО, или IVF);
- ЭКО в сочетании с инъекцией сперматозоида в цитоплазму ооцита (ЭКО с ICSI);
- ЭКО с дозреванием ооцитов *in vitro* (ЭКО с IVM);
- ЭКО в сочетании с ICSI при использовании замороженных-оттаянных ооцитов, сперматозоидов, перенос заморожен-

ных-оттаянных эмбрионов;

- внутриматочную инсеминацию спермой супруга/донора (IUI);
- перенос половых клеток в маточные трубы (GIFT);
- перенос зигот в маточные трубы (ZIFT);
- донацию сперматозоидов;
- донацию ооцитов;
- донацию эмбрионов;
- программу суррогатного материнства.

Проведение ЭКО предусматривает применение по показаниям таких микроманипуляций, как преимплантационная диагностика наследственных заболеваний, вспомогательный хэтчинг, удаление фрагментации (дефрагментация), дреллинг ооцитов, донация ооплазмы.

Следует отметить, что в зарубежной практике под ВРТ понимают систему программ (методик), в основе которых лежат непосредственные манипуляции с ооцитами и сперматозоидами, позволяющие осу-

ществлять отдельные, а иногда и все этапы зачатия вне организма. Соответственно, ВРТ включают программы оплодотворения *in vitro* – экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО и ЭКО с ICSI), при этом используют как гаметы генетических родителей, так и клетки доноров. Программу искусственной инсеминации, так же как и лечение бесплодия, в основе которого лежит применение медикаментов для стимуляции фолликулогенеза, к ВРТ не относят.

Современные достижения в области лечения нарушения репродуктивной функции у человека стали возможными благодаря тесному сотрудничеству биологов и врачей. Первые опыты по оплодотворению были проведены на животных. В 1891 г. В. Хип осуществил успешный перенос эмбрионов одной крольчихи в полость матки другой с последующим рождением потомства. Параллельно, в 1897 г. В.С. Груздев опубликовал статью, посвященную исследованиям оплодотворения извлеченных из фолликулов крольчихи ооцитов. Ученый сделал вывод о том, что полноценность оплодотворения напрямую зависит от степени зрелости ооцита (В.С. Груздев, 1897).

В 20–40-х гг. XX ст. в клиниках активно применяют внутриматочную инсеминацию спермой супруга или донора. Впервые внутриматочная инсеминация спермой супруга как метод лечения бесплодия была успешно использована более 200 лет назад в Лондоне Д. Хантером, который в 1790 г. ввел сперматозоиды мужчины с гипоспадией во влагалище его жены, после чего у женщины наступила беременность. Позже Д. Симс провел внутриматочную инсеминацию шести женщинам с цервикальным фактором бесплодия (Sims, 1886). Инсеминация спермой донора является одним из старейших методов лечения бесплодия и применялась задолго до появления ВРТ. Позже искусственную инсеминацию проводили путем введения спермы мужа или донора во влагалище, цервикальный канал, брюшную полость, полость матки, маточные трубы. Наиболее распространенным стало введение сперматозоидов в полость матки и маточные трубы. Эти методы используют в клинической практике уже более 40 лет.

В начале XX ст. были инициированы исследования по криоконсервированию клеток и тканей, которые долгие годы оставались безуспешными до момента открытия криопротекторов в одной из лондонских лабораторий. В 1940 г. группа ученых успешно осуществила криоконсервирование бычьих сперматозоидов при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ с использованием глицерина в качестве криопротектора. Достижения в области криоконсервирования были внедрены в фермерство. Первое успешное применение замороженных сперматозоидов в медицинской практике датировано 1964 г., однако широкое применение криоконсервирования эякулята началось в 70-е гг. прошлого столетия. С развитием технологии замораживания эякулята стали применять криопротекторы нового поколения, такие как диметилсульфоксид, этиленгликоль, пропиленгликоль, которые обладают высокой растворимостью в воде и быстро проникают в клетки. Благодаря усовершенствованию оборудования и автоматизации процесса контроля заморозки во многих странах созданы банки спермы, а использование криоконсервированных сперматозоидов стало повседневной практикой.

Первое успешное культивирование ооцита человека и его оплодотворение в условиях *in vitro*, или экстракорпоральное оплодотворение, приведшее к развитию двухклеточного эмбриона, было осуществлено в 1944 г. (Menken and Rock, 1948).

Существенную роль в развитии эмбриологических исследований сыграла оптимизация технологий работы с клетками: были разработаны питательные среды, условия для культивирования гамет и эмбрионов *in vitro*. Оплодотворением *in vitro* названа процедура оплодотворения ооцитов предварительно обработанными сперматозоидами вне организма, завершающим этапом которой является перенос эмбрионов в полость матки.

Основоположниками современной технологии оплодотворения *in vitro*, или ЭКО, являются акушер-гинеколог П. Стептоу и эмбриолог Р. Эдвардс. В 1971 г. в клинике Борн Холл (Кембридж, Великобритания) ученые начали совместную разработку методик получения ооцитов во время лапа-

роскопии, определения наступления овуляции, совершенствования условий, необходимых для культивирования гамет и эмбрионов. Ученые поставили перед собой задачу решения проблемы трубного бесплодия и разработки метода предотвращения рождения детей с МВПР. В 1967 г. Р. Эдвардс получил первый в истории случай оплодотворения ооцита человека в лабораторных условиях. Совместной работе способствовало выявление Р. Эдвардсом в 1966 г. свойства ооцитов созревать *in vivo* в течение 36-37 ч после пика ЛГ. Ученые впервые провели наблюдение за развитием человеческого эмбриона до стадии бластоцисты в условиях *in vitro* и установили, что образование бластоцист происходит на 5-6-й день после оплодотворения (Stephoe et al., 1971). Специалисты провели 600 переносов эмбрионов, и после нескольких неудачных попыток применения ЭКО в 1976 г. была получена эктопическая беременность. В 1977 г. после переноса восьмиклеточного эмбриона в полость матки усилия ученых увенчались успехом, и 25 июля 1978 г. родилась девочка, Луиза Браун (Олдем, Великобритания).

Параллельно с успешными разработками английских ученых аналогичные технологии внедрялись в США и Австралии с использованием стимулятора овуляции – клостилбегита. Применение этого препарата в лечебной программе ЭКО исследователями К. Вудом и А. Лопата в университете Монаш (Мельбурн, Австралия) позволило в 1980 г. получить беременность и рождение ребенка (Lopata, 1980). В США группа ученых из Норфолка (штат Вирджиния) во главе с супругами Джонс получила беременность, в результате которой 28 декабря 1981 г. родилась двойня.

Следующими странами, в которых были достигнуты успехи в области IVF, были Норвегия и Франция (Cohen et al., 2005). К концу 1984 г. с применением ЭКО в мире родилось более 100 здоровых детей. В середине 80-х гг. центры возникают в разных частях мира, создаются научные общества, среди которых одним из первых – Европейское общество репродукции и эмбриологии человека (ESHRE). С 1986 г. выходит специализированный журнал этого общества – "Human Reproduction". В СССР

в 1986 г. одновременно две группы ученых, в Москве во главе с Б.В. Леоновым и в Ленинграде под руководством А.И. Никитина, сообщили о рождении первых детей в результате применения ЭКО, а в Украине (Харьков) – под руководством В.И. Грищенко и Ф.В. Дахно в 1991 г. (М.Б. Аншина, 2002).

С момента рождения Луизы Браун произошел резкий прорыв в области лечения бесплодия. Первоначально технологию ЭКО использовали в связи с непроходимостью или отсутствием маточных труб в естественных циклах без стимуляции овуляции, в которых ученые осуществляли тщательный мониторинг роста фолликула в яичнике и производили его пункцию в момент, наиболее близкий к овуляции. Восьмидесятые годы прошлого столетия ознаменовались дальнейшим совершенствованием методик культивирования эмбрионов, разработками новых препаратов и протоколов стимуляции овуляции.

Если первоначально пункцию яичников осуществляли трансвезикально, то вскоре широкое распространение получил метод трансвагинальной пункции яичников. Начиная с 1984 г. удается получать ооциты не посредством лапароскопии, как это делали первоначально, а в результате пункции под УЗ-контролем заднего свода влагалища, что позволило достичь 20-25-процентной вероятности наступления беременности на одну попытку ЭКО у женщин моложе 40 лет. УЗИ стали применять на этапе диагностики при оценке нарушений репродуктивной функции у женщины, а также на всех последующих этапах проведения ЭКО (мониторинг роста и созревания фолликулов, пункцию фолликулов и забор ооцитов, перенос эмбрионов, диагностику беременности и ее мониторинг).

В 1983 г. была получена первая беременность после переноса замороженных–оттаянных восьмиклеточных эмбрионов (Trounson and Mohr, 1983). В последние годы лечебные циклы с использованием оттаянных после криоконсервирования гамет и эмбрионов являются рутинной программой ВРТ, их проводят по показаниям.

В 1984 г. была впервые проведена манипу-

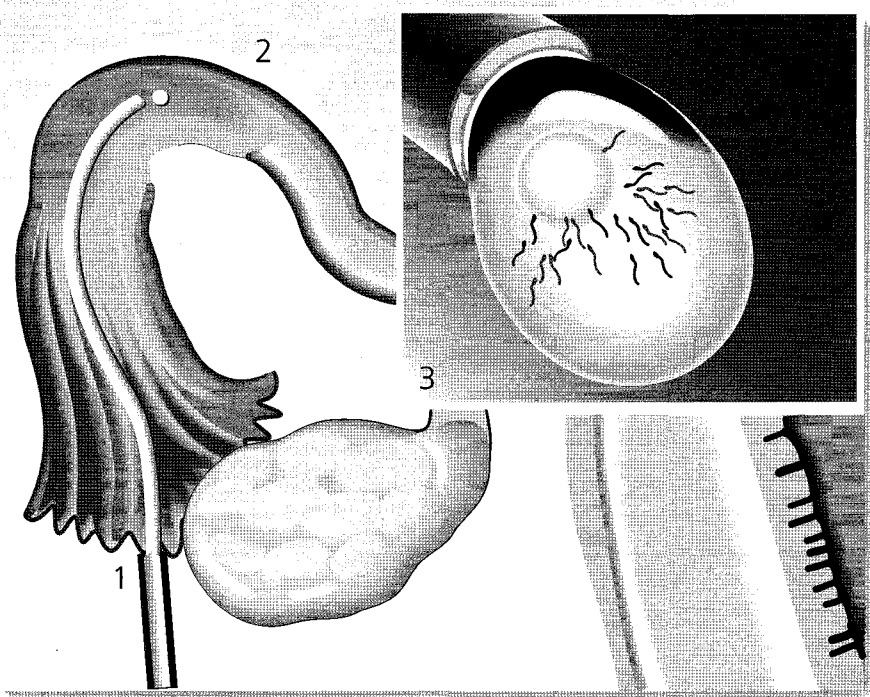


Рис. 4.2. Инtratубарный перенос гамет. Схема:

1 – катетер; 2 – фаллопиева труба; 3 – сперматозоиды и ооцит в фаллопиевой трубе.

ляция инtratубарного переноса гамет (GIFT) женщине с идиопатическим бесплодием. GIFT представляет собой перенос гамет в маточные трубы трансцервикальным путем (катетер с гаметами вводится через шейку матки в фаллопиеву трубу) или во время проведения лапароскопической процедуры (рис. 4.2).

Первоначально GIFT использовали при цервикальном и иммунологическом факторах бесплодия, при эндометриозе органов малого таза. Инtratубарный перенос зигот (ZIFT) и инtratубарный перенос эмбрионов (TET) отличаются от GIFT тем, что в фаллопиеву трубу под УЗИ-контролем или во время проведения лапароскопической процедуры переносят не половые клетки, а зиготы (оплодотворенные в лабораторных условиях, но еще неделяющиеся яйцеклетки) или эмбрионы. В отличие от GIFT эти методы предполагают необходимость контроля над оплодотворением ооцитов и перенос в маточные трубы строго ограниченного количества эмбрионов или зигот – от трех до пяти. ZIFT или TET использовали при цервикальном и иммунологическом факторах бесплодия, при эндометриозе органов малого таза в соче-

тании с мужским бесплодием. Оба метода ВРТ эффективно применялись в период становления и развития ЭКО. Однако совершенствование методов ЭКО позволило получить более высокую частоту наступления беременности. В настоящее время методы GIFT и ZIFT являются устаревшими и практически не применяются.

В 1985 г. основоположники ЭКО П. Стептоу и Р. Эдвардс впервые предложили проведение IVF с применением суррогатного материнства. После интенсивных дебатов с Комитетом по этике Великобритании ученые успешно провели программу суррогатного материнства, в результате которой в 1989 г. после переноса эмбриона в матку сестры генетической матери родился ребенок.

Последующим революционным шагом в совершенствовании технологии ЭКО стала разработка метода интрацитоплазматической инъекции сперматозоида. Этот метод предполагает введение единственного сперматозоида непосредственно в ооцит через зону пеллюцида.

История развития микроманипуляционных технологий, предшествующих ICSI, берет

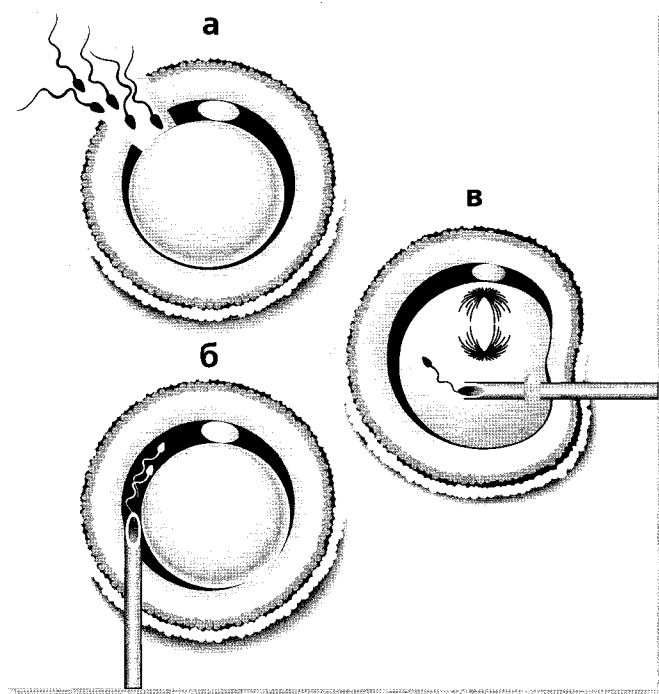


Рис. 4.3. Варианты инъекции сперматозоидов в ооцит. Схема: метод частичного рассечения зоны пеллюцида ооцита (**а**), введение сперматозоидов под зону пеллюцида (**б**), процедура проведения ICSI (**в**).

начало с проведенных в 1976 г. успешных исследований по непосредственному переносу сперматозоида в ооцит на модельных системах (Uehara and Yanagimachi, 1976). Развитие метода ICSI с гаметами человека берет начало с разработки в середине 80-х гг. прошлого столетия методик частичного рассечения зоны пеллюцида ооцита (PZD) и введения сперматозоида под зону пеллюцида ооцита (SUZI) с помощью химического или механического воздействия на ооцит (Malter and Cohen, 1989; Iritani, 1991) (**рис. 4.3а,б**).

Недостаток метода PZD заключается в отсутствии гарантии проникновения сперматозоида в ооцит. В ходе проведения SUZI сперматозоид должен также самостоятельно попасть в ооцит, но шансы на оплодотворение повышались, так как преодолевалось препятствие, связанное с низкой подвижностью сперматозоидов или их малым количеством. В ряде клиник специалисты взяли на вооружение эти микроманипуляционные технологии с гаметами, а в 1988 г. появились первые сообщения о наступлении беременности в результате использования PZD и SUZI (Cohen et al., 1988; Ng et al., 1988). Однако эти методы

не получили широкого распространения в связи с низкой частотой оплодотворения, а применение SUZI сопровождалось высоким процентом случаев полиспермии.

В 1992 г. первая удачная попытка выполнения интрацитоплазматического введения сперматозоида (ICSI) была совершена Д. Палермо (Бельгия) (Palermo et al., 1992) (**рис. 4.3в**). Уже через год, в 1993 г. группа исследователей сообщила о беременности, наступившей в результате применения ICSI (Van Steirteghem et al., 1993). В Украине первый ребенок родился по методике ЭКО с ICSI в 1997 г (ICSI выполнил эмбриолог М.И. Кононенко). В последующие несколько лет ученые во главе с Д. Палермо успешно провели процедуру ICSI не только со сперматозоидами, но и предшественниками сперматозоидов, извлеченными из придатка яичка, а также с предварительно замороженными-оттаянными сперматозоидами (Palermo et al., 1995; Schlegel et al., 1995). Этому предшествовало оплодотворение ооцитов мышей круглыми сперматидами (Ogura et al., 1994). Успешное оплодотворение круглыми (ROSI) и элонгированными (ELSI) сперматидами человека было

одновременно осуществлено в различных медицинских центрах (Fishel et al., 1995a; Vanderzwalmen et al., 1995; Tesarik et al., 1995; Tesarik, 1996). В 1995 г. была получена беременность и родился первый ребенок, зачатый в результате ICSI с использованием круглых сперматид (Tesarik et al., 1995).

Первоначально показаниями к применению технологии ICSI в практике ВРТ были низкие показатели спермограммы мужчины, поскольку данный метод позволяет получить беременность при наличии даже единичных сперматозоидов в эякуляте. До 1994 г. супружеские пары с мужским фактором бесплодия, обусловленным малым количеством или отсутствием сперматозоидов в эякуляте, и с идиопатической формой бесплодия могли рассчитывать только на донорские клетки. В последующие годы были разработаны специальные инструменты, отработаны методики иммобилизации сперматозоидов и инъекции с учетом ориентации ооцита относительно иглы в момент микроманипуляции. После усовершенствования технологии ICSI наступление беременности стало возможным даже в самых тяжелых случаях мужского бесплодия.

Самым высокоэффективным методом ЭКО большинство специалистов считают интрацитоплазматическую инъекцию единственного сперматозоида непосредственно в ооцит, результативность которой достигает 69-74%, в связи с чем ICSI сегодня успешно используют во многих ведущих клиниках мира (Adamson et al., 2006; Practice Committee, 2006). В Клинике проблем планирования семьи (Киев, Украина) с 1998 г. используют исключительно ICSI.

Возможности применения ICSI существенно расширились после разработки и внедрения в практику ВРТ способов получения сперматозоидов и незрелых половых клеток не из эякулята, а с помощью инвазивных манипуляций из яичка или его придатка. Среди этих микроманипуляций следует выделить:

- перкутанную аспирационную биопсию яичка (TESA);
- открытую биопсию тестикулярной ткани

для получения сперматозоидов (TESE);

- микрохирургическую аспирационную биопсию придатка яичка (MESA);
- перкутанную аспирационную биопсию придатка яичка (PESA).

Первые публикации об успешном проведении ICSI с использованием полученных с помощью TESE сперматозоидов мужчин с обструктивной азооспермией датированы 1993-1994 гг. (Schoysman et al., 1993; Devroey et al., 1994; Silber et al., 1994, 1995). Вслед за этими сообщениями в 1995 г. были опубликованы результаты проведения ICSI с использованием полученных посредством TESE сперматозоидов мужчин с необструктивной азооспермией (Silber et al., 1994, 1995; Devroey et al., 1995). Первая лечебная программа с использованием TESA на территории СНГ была проведена специалистами Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина) в 1999 г. с последующим рождением здорового ребенка. Указанные технологии обеспечили отцовство мужчинам с азооспермией, тератозооспермией, олигозооспермией, астенозооспермией, эякуляторными дисфункциями, а также при наличии высокого титра антиспермальных антител.

Успех лечения бесплодия зависит от возраста пациенток (рис. 4.4). Лечение молодой супружеской пары, впервые обратившейся за помощью, протекает более эффективно и экономично, беременность наступает в среднем в течение года с момента первого обращения. По мере увеличения длительности бесплодия и возраста пациенток вероятность положительного исхода лечебной программы снижается.

Достижения в области лечения бесплодия человека связаны еще с одним этапом развития науки конца XX–начала XXI ст. Как известно, в рамках проекта "Геном человека" были расшифрованы 35 000 генов и идентифицированы мутации, определяющие патогенез наследственных заболеваний и/или наследственную склонность к развитию мультифакторных патологических состояний (McKusick, 2001). Благодаря достижениям в области молекулярной биологии, генетики, геномики, протеомики происходит активное сближение биоло-

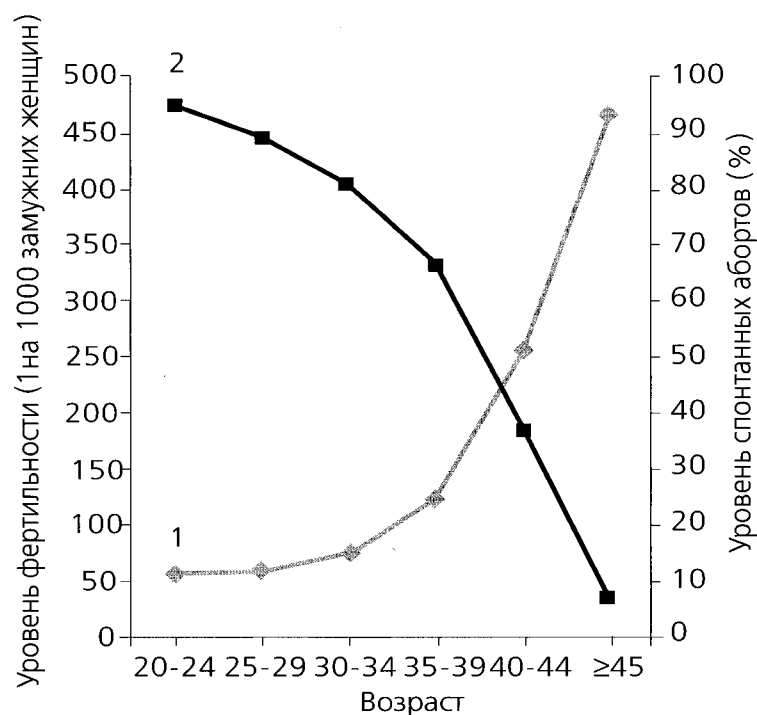


Рис. 4.4. Зависимость уровня фертильности от возраста женщины (цит. по Heffner, 2004): 1 – спонтанные абортот; 2 – фертильность.

гических наук с медицинской практикой. Начало XXI ст. называют эрой зарождения генетической медицины, одним из направлений которой является репродуктивная генетика. В рамках последней проводят генетическое тестирование и генную терапию. Во всем мире пионерами использования достижений в этой области являются центры, применяющие вспомогательные репродуктивные технологии. Генетическое тестирование гамет и эмбрионов (преимплантационная генетическая диагностика) используется для выявления хромосомной и генной патологии у эмбрионов и является альтернативой пренатальной диагностике. Впервые ПГД была проведена в 1990 г. с помощью полимеразной цепной реакции, а разработка метода FISH в 1993-1994 гг. позволила расширить показания к проведению диагностики на преимплантационном уровне (Handyside et al., 1990; Verlinsky et al., 1990). На рис. 4.5 представлены этапы становления и развития ВРТ в мире.

Достижения в области эмбриологии, гинекологии, репродуктивной эндокринологии, генетики способствовали развитию технологий, которые широко используют в

лечении бесплодия. Благодаря инновациям расшифрованы и изучены механизмы процесса фолликулогенеза, синтезированы высококачественные препараты гонадотропинов, агонистов и антагонистов релизинг-факторов, которые успешно применяют для проведения адекватной индукции суперовуляции. Разработаны и внедрены в практику лечения бесплодия методы ультразвукографического сканирования, эндоскопической диагностики, а также методы экстракорпорального оплодотворения, среди которых наиболее результативным является ICSI. В рамках применения ВРТ используют следующие технологии: вспомогательный хэтчинг, *in vitro* дозревание ооцитов, ПГД, криоконсервирование. В программе ЭКО успешно применяют сперматозоиды и сперматиды, полученные микрохирургическим путем (аспирированные из яичка или его придатка), донорские ооциты, сперматозоиды и эмбрионы, а также замороженные–оттаянные гаметы и эмбрионы. Исследования, первоначально проводимые на модельных системах, переросли в целое направление в области лечения бесплодия, в основе которого лежит экстракорпоральное оплодотворение.

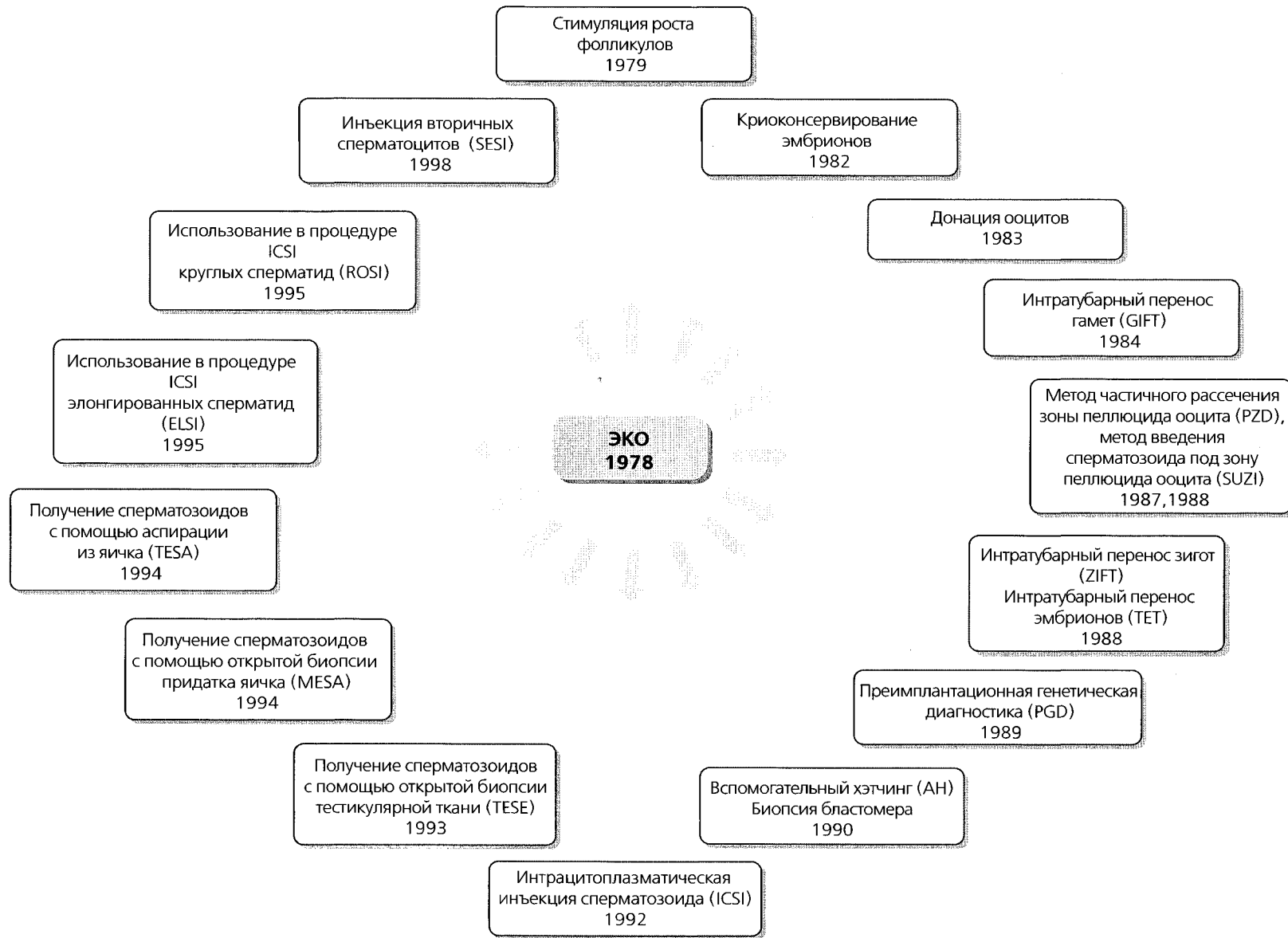


Рис. 4.5. Этапы развития вспомогательных репродуктивных технологий

Ведущими программами ВРТ являются ЭКО и ЭКО с ICSI. Согласно всемирному отчету по ВРТ, представленному в 2006 г. на XXII ежегодной конференции Европейского общества репродукции и эмбриологии человека, начиная с 1978 г. в мире родилось более 3 млн детей, зачатых с помощью ВРТ (Adamson et al., 2006). Следует учитывать тот факт, что этот отчет основывается на данных клиник, участвующих в регистре. Отчет содержит результаты работы клиник 52 стран мира. Только за 2002 г. в мире на свет появилось 200 000 детей, зачатых с использованием ВРТ. Лидирующие позиции занимают страны Европы – около 56% всех проведенных циклов. Наибольшее количество циклов на миллион жителей страны проведено в Израиле (3260), Дании (2040), Франции, Германии и странах Северной Европы (>1000). Процент рождения детей в результате применения ВРТ наиболее высокий в Дании и Нидерландах (более 4%), самый низкий – в странах Латинской Америки (менее 0,1%). Более половины эффективных лечебных циклов были проведены с помощью ЭКО в сочетании с ICSI – 54,8%. Согласно данным отчета проведено 98 000 лечебных циклов с использованием замороженных–оттаянных эмбрионов, 22 000 лечебных циклов с использованием донорских ооцитов. ПГД была осуществлена в 2 500 циклах. При использовании программы ВРТ беременность в расчете на цикл была достигнута в 25,1% случаев, частота завершения лечебных программ родами составляла 18,5%. Эти показатели значительно варьируют в различных странах и составляют от 13,6 до 40,5% по частоте наступления беременности, от 9,1 до 37,1% по частоте завершения циклов родами.

Специалисты Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина) с 1998 г. в программах ЭКО используют исключительно методику ICSI, средняя эффективность которой превышает 70%, а в отдельных группах пациентов составляет более 95% на один цикл. Исходя из опыта работы Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина), можно сделать вывод, что результативность программы ЭКО с ICSI определяют следующие факторы:

- индивидуальный подход к оценке бесплодия у каждой супружеской пары;
- использование тактики совместной работы гинекологов и эмбриологов;
- разработка и внедрение собственных уникальных эмбриологических методик.

Выделяют три основные программы ВРТ: внутриматочную инсеминацию, ЭКО и ЭКО с ICSI, общими этапами которых являются фармакологическая стимуляция работы яичников для получения более чем одного ооцита и обработка сперматозоидов. Отличие программ ЭКО и ЭКО с ICSI от внутриматочной инсеминации заключается в проведении процедуры оплодотворения *in vitro*, во время которой происходит оплодотворение ооцита вне организма матери с последующим переносом преэмбриона в полость матки.

4.2. Внутриматочная инсеминация спермой супруга (донора)

Внутриматочная инсеминация спермой супруга (донора) представляет собой процедуру введения предварительно обработанного эякулята в полость матки во время, близкое к овуляции (рис. 4.6).

Процедура внутриматочной инсеминации эякулятом супруга (донора) является наиболее простой программой ВРТ, которая эффективна для избирательной группы пациентов (например, при цервикальном факторе бесплодия). Ее применяют при наличии и функционировании маточных труб у женщины, достаточном количестве активно подвижных сперматозоидов супруга (донора) после "отмывки" эякулята. Для успешного проведения внутриматочной инсеминации необходимо наличие более 4% нормальных по критериям Крюгера сперматозоидов (Van Waart et al., 2001). Вероятность наступления беременности после применения указанной технологии составляет 15-20% (Duran et al., 2002; Massin et al., 2004). Этот метод ВРТ обеспечивает более высокие показатели

наступления беременности, чем внутривагинальная инсеминация или интрацервикальная инсеминация, поскольку сперматозоиды помещают в непосредственной близости от фаллопиевых труб. Различают также инсеминацию в фаллопиевы трубы и интраперитонеальную инсеминацию, которые не нашли широкого применения в системе ВРТ, так как являются инвазивными методами, а вероятность наступления беременности ниже, чем при использовании внутриматочной инсеминации.

Инсеминацию проводят как в естественном цикле, так и с использованием стимуляции овуляции. Однако эффективность инсеминации в естественном цикле в 2-3 раза ниже, чем при инсеминации после стимуляции. Применение внутриматочной инсеминации с овариальной стимуляцией имеет преимущество перед запланированным половым актом, приближенным во времени к овуляции (контролируемое зачатие). Мониторинг осуществляют с помощью УЗ-сканирования и биохимического скрининга с

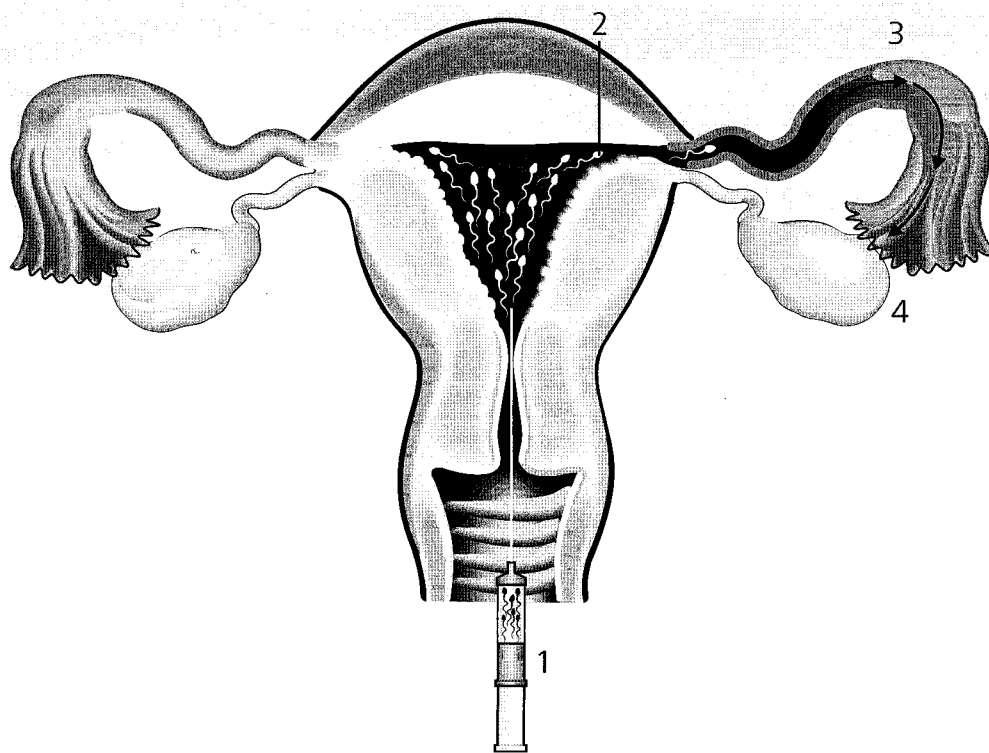


Рис. 4.6. Проведение внутриматочной инсеминации. Схема:

1 – катетер; 2 – обработанные сперматозоиды; 3 – фаллопиева труба; 4 – яичник.

определением уровней содержания эстрадиола, ЛГ, прогестерона. УЗИ позволяет проводить наблюдение за фолликулярным ростом и стимуляцией овуляции.

Проведение программы внутриматочной инсеминации включает следующие этапы: индукцию овуляции, мониторинг фолликулярного роста, выбор времени инсеминации, получение и обработку сперматозоидов, непосредственно процедуру внутриматочной инсеминации, поддержку лютеиновой фазы. В день овуляции производят забор эякулята супруга (донора) с последующей его обработкой. Предварительная обработка эякулята аналогична той, которая производится при ЭКО. Обработанные клетки вводят через шейку матки в ее полость.

Постоянное совершенствование схем овариальной стимуляции и поддержки лютеи-

новой фазы цикла позволяет повысить частоту наступления беременности и избежать нежелательной многоплодной беременности. Наилучшие результаты использования метода внутриматочной инсеминации отмечают в группе женщин моложе 30 лет при наличии одной причины бесплодия на фоне контролируемой индукции суперовуляции при использовании донорского эякулята (Steures et al., 2004; Naagen et al., 2006). Однако следует учитывать, что в рамках этой лечебной программы происходит инсеминация клетками как с нормальной морфологией, так и патологической, что обуславливает низкую результативность.

Развитие новых технологий, ЭКО и ЭКО с ICSI, позволило значительно расширить спектр показаний к их применению при лечении как женского, так и мужского бесплодия.

4.3. Программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО и ЭКО с ICSI)

Наиболее распространенными и эффективными методами вспомогательной репродукции при лечении бесплодия являются программы экстракорпорального оплодотворения – ЭКО и ЭКО с ICSI. Экстракорпоральное оплодотворение, или оплодотворение *in vitro*, предполагает осуществление оплодотворения вне женского организма. Суть программы ЭКО заключается в получении ооцитов, их оплодотворении сперматозоидами супруга (донора), культивировании эмбрионов от 24 до 120 ч с их последующим переносом в полость матки. Если первоначально ЭКО применяли при трубном факторе бесплодия, то сегодня эта программа успешно используется при различных формах нарушения репродуктивной функции, включая бесплодие, обусловленное мужским фактором, сочетанное и идиопатическое бесплодие, а также для женщин с эндокринным фактором бесплодия, эндометриозом и удаленными или нефункционирующими яичниками и при отсутствии матки. Для последних были разработаны и внедрены в практику ВРТ лечебные программы ЭКО с донацией ооцитов и суррогатным материнством. Современные возможности ЭКО выходят далеко за рамки лечения бесплодия, так как позволяют не только получать беременность, но и проводить преимплантационную диагностику эмбриона с целью рождения здорового ребенка.

Показанием к проведению ЭКО является бесплодие, при котором восстановление естественной фертильности медикаментозными или хирургическими методами невозможно, или же вероятность преодоления которого с помощью ЭКО выше, чем другими методами.

Учеными предпринимались попытки оптимизации условий оплодотворения гамет в условиях *in vitro* с помощью различных методов, в том числе за счет увеличения концентрации сперматозоидов, активации их подвижности и др. Однако в большинстве случаев эти методы не приносили желаемых результатов. Разработка и внедрение в практику ЭКО новых микроманипуля-

ционных методов оплодотворения (PZD, GIFT, ZIFT, TET) лишь частично улучшили показатели наступления беременности.

С момента внедрения метода механического введения сперматозоида непосредственно в цитоплазму ооцита – ICSI – наступление беременности стало возможным даже в тех случаях, когда в эякуляте обнаруживают лишь единичные сперматозоиды или их небольшое количество.

Совершенствование данной технологии сопровождалось разработкой медикаментозных подходов к стимуляции яичников для обеспечения адекватного роста фолликулов, содержащих способные к оплодотворению ооциты.

Программы ЭКО и ЭКО с ICSI включают цепь последовательных действий (рис. 4.7):

- обследование супружеской пары;
- в зависимости от результатов обследования выбор естественного менструального цикла или применение индукции суперовуляции;
- проведение гормонального и УЗ-мониторингов для определения момента пункции фолликулов и извлечения ооцитов;
- пункцию фолликулов, аспирацию их содержимого, поиск ооцитов, их помещение в специальные условия и питательную среду;
- получение и обработку спермы или отдельных сперматозоидов для проведения ЭКО или ЭКО с ICSI;
- процесс оплодотворения ооцитов сперматозоидами *in vitro* (инсеминация ооцитов *in vitro*) или путем инъекции единственного сперматозоида непосредственно в цитоплазму ооцита – ICSI – с помощью микротехнического оборудования;
- культивирование эмбрионов *in vitro* в инкубаторе от 24 до 120 ч;
- перенос эмбрионов в полость матки пациентки;
- поддержку лютеиновой фазы;
- диагностику беременности на ранних сроках.

Положительный исход программы ЭКО зависит от многих факторов, среди которых следует выделить возраст женщины, при-

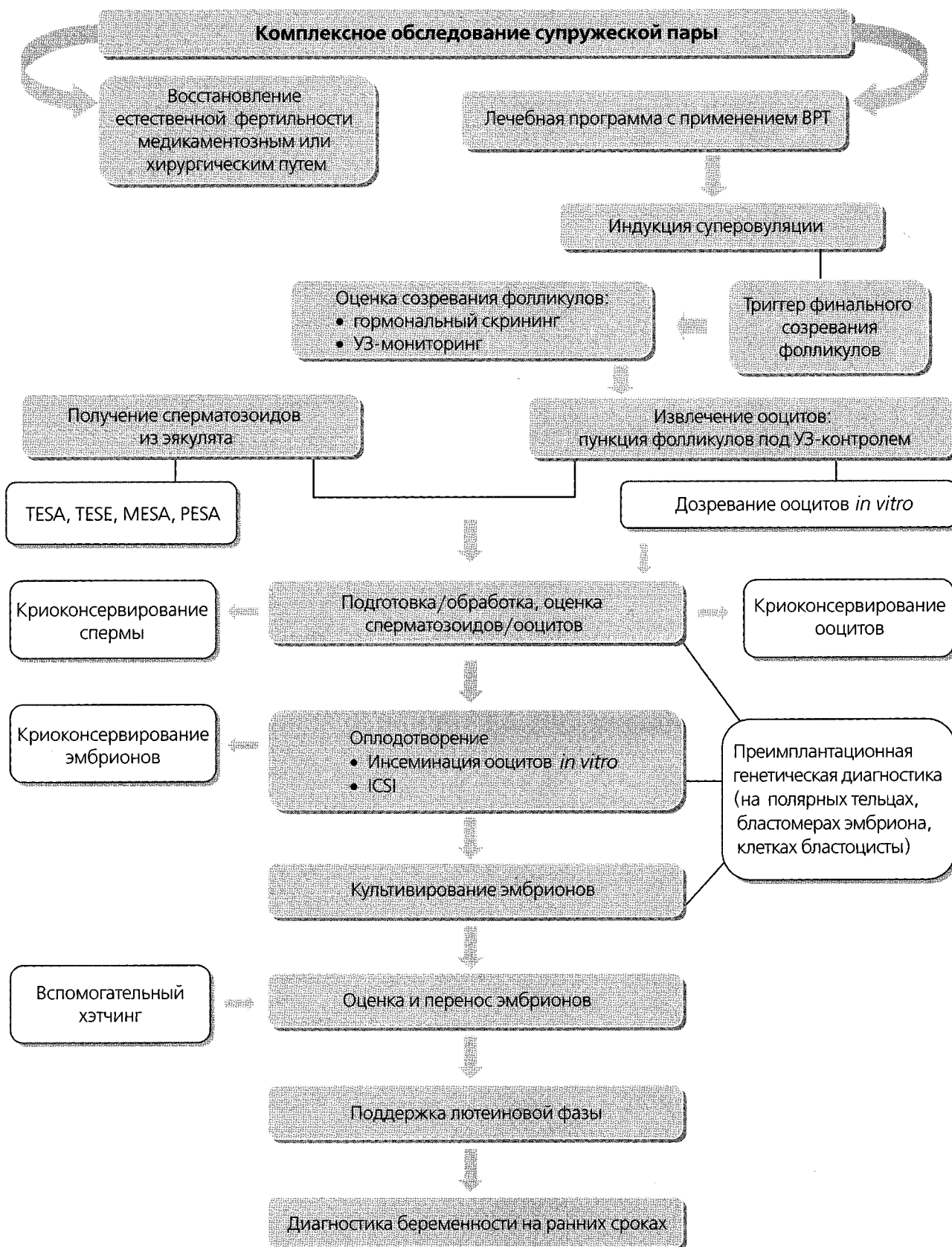


Рис. 4.7. Этапы проведения лечебной программы ЭКО/ЭКО с ICSI

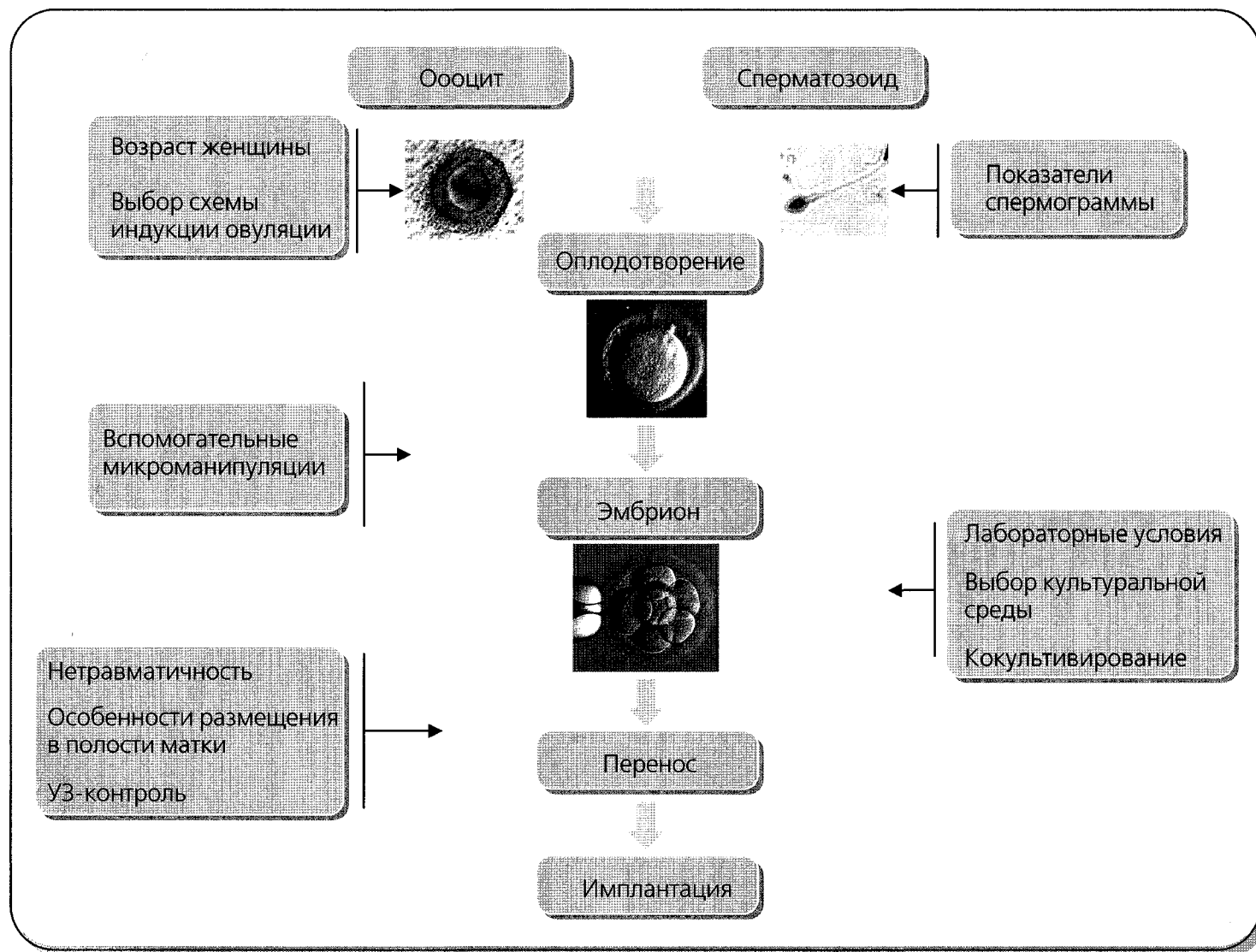


Рис. 4.8. Факторы, которые необходимо учитывать для успешного проведения ЭКО/ЭКО с ICSI

чину бесплодия, схему индукции супер-овуляции, качество аспирированных ооцитов, показатели спермограммы, качество эмбрионов, рецептивность эндометрия к имплантации перенесенных в полость матки эмбрионов (рис. 4.8).

Необходимо запомнить так называемый "закон трех К", который включает факторы, влияющие на благоприятный исход программы ЭКО:

- 1) качество сперматозоидов и зрелых ооцитов;
- 2) качество (готовность, состояние) матки;
- 3) качество микроманипуляционных технологий.

Решающую роль играет степень профессионального мастерства эмбриологов и гинекологов.

Перед специалистами стоит ряд вопросов, решение которых будет способствовать повышению эффективности программ ЭКО и ЭКО с ICSI. К ним относятся разработка дополнительных методов предварительного обследования пациенток, готовящихся к проведению такого лечения, выбор оптимального времени проведения УЗ- и гормонального мониторингов, корреляция ультразвуковых и гормональных параметров, установление критериев зрелости фолликулов и толщины перивульторного эндометрия, подсчет оптимального времени для введения овуляторной дозы ХГ (триггера финального созревания фолликулов), исследование влияния аспирации фолликулярной жидкости на дальнейшее течение лютеиновой фазы, а также роли ассоциирующихся с беременностью белков в процессах оплодотворения и имплантации. Следует учитывать и возможные осложнения после программы ЭКО/ЭКО с ICSI, которые включают синдром гиперстимуляции яичников, эктопическую беременность, многоплодную беременность.

Работы по повышению эффективности программ ЭКО и ЭКО с ICSI проводятся в следующих направлениях: развитие новых микротехнологических процедур, совершенствование методов культивирования эмбрионов, модификация протоколов индукции суперовуляции, разработка новых подходов к снижению частоты репродук-

тивных потерь (усовершенствование тактики мониторинга беременных после лечения в программе ЭКО или ЭКО с ICSI).

Таким образом, цель программы ЭКО – получение в конечном счете одно- и двухплодной беременности. Промежуточным этапом программы может быть многоплодная беременность с последующим проведением процедуры селективной редукции эмбрионов. В зависимости от результатов обследования супружеской паре может быть предложена программа ЭКО или ЭКО с ICSI в естественном или стимулированном цикле. Последующие этапы лечебных программ ЭКО и ЭКО с ICSI аналогичны, кроме непосредственной процедуры оплодотворения: в программе ЭКО оплодотворение производится посредством инсеминации сперматозоидами *in vitro*, в программе ЭКО с ICSI – путем инъекции единственного сперматозоида непосредственно в цитоплазму зрелого ооцита.

4.3.1. Применение естественных и стимулированных циклов в программах ЭКО и ЭКО с ICSI

Первая успешная программа ЭКО, осуществленная П. Стептоу и Р. Эдвардсом, была проведена в естественном (нестимулированном) цикле. Программа ЭКО в естественном цикле подразумевает процесс оплодотворения в условиях *in vitro* без предварительного применения препаратов, стимулирующих одновременный рост нескольких фолликулов. Время предстоящей овуляции прогнозируют по времени пика ЛГ или посредством его имитации с помощью введения ХГ (триггера финального созревания фолликулов) и максимально точного установления времени, наиболее оптимального для проведения пункции фолликула. Размер фолликулов и толщину эндометрия в ходе проведения программы ЭКО в естественном цикле оценивают с помощью гормонального и УЗ-мониторингов. Пункцию фолликулов осуществляют через 36 ч после введения ХГ. При проведении ЭКО в естественных циклах в большинстве случаев удается получить один, реже два зрелых фолликула, кроме того, высока вероятность потери ооцита или получения незрелой клетки. Следует также отметить низкую частоту наступления беременности, а работа лабо-

Таблица 4.1. Основные различия между тонической секрецией и выбросом ЛГ

Характеристика	Тоническая секреция ЛГ	Пик ЛГ
Функция	Стимуляция стероидогенеза	Индукция овуляции
Время возникновения	В течение цикла	1–2 дня в середине цикла
Концентрация ЛГ	Низкая	Высокая
Действие эстрадиола	Ингибирует	Способствует секреции
Действие прогестерона	Ингибирует	Ингибирует

ратории при этом привязана к моменту спонтанной овуляции, наступающей обычно в период между двумя и пятью часами ночи. Одна из проблем, получение незрелого ооцита, может быть в перспективе решена благодаря методике IVM (Cha et al., 2005; Soderstrom-Anttila et al., 2006). В то же время, необходимо учитывать риск возникновения связанных с геномным импринтингом заболеваний, которые возможны при дозревании ооцитов в условиях *in vitro*.

К моменту проведения программы в естественном цикле уже существовали успешные наработки в области индукции суперовуляции у женщин с ановуляторным бесплодием.

Первые попытки ЭКО с применением индукции суперовуляции были предприняты австралийскими учеными, которые стали проводить овариальную стимуляцию кломифенцитратом, что позволило значительно повысить эффективность программы вследствие возможности получения нескольких пригодных для оплодотворения зрелых ооцитов. В 80-х гг. прошлого столетия были разработаны и внедрены в практику ЭКО схемы индукции суперовуляции (Macklon et al., 2006). Овариальная стимуляция предполагает прямое или опосредованное действие гормональных препаратов на яичники, что позволяет подавлять выработку собственных гормонов, предотвращает овуляцию и приводит к приобретению яичниками способности отвечать на гормональную стимуляцию адекватным ростом нескольких фолликулов, иными словами, вызывает одновременное созревание нескольких фолликулов, содержащих способные к оплодотворению ооциты. Успешный исход программы зависит от подбора оптимальной схемы индукции суперовуляции (гормональной стимуляции яичников).

В основе принципа овариальной стимуляции лежит понимание механизма фолликулогенеза в естественном цикле. Как известно, в естественном цикле рост и созревание фолликулов в яичнике женщины происходят под влиянием выработки гормонов ФСГ и ЛГ гипофизом и эстрогенов яичниками. Под воздействием ФСГ фолликулы размером 2-5 мм в диаметре начинают интенсивно расти. В середине фолликулярной фазы происходит селекция доминантного фолликула из числа преовуляторных больших антральных фолликулов размером до 10 мм в диаметре. При достижении лидирующим фолликулом более 10 мм в диаметре на клетках гранулезы появляются рецепторы к ЛГ, под воздействием ароматазы происходит интенсивная секреция эстрадиола, который, действуя по принципу обратной связи, снижает продукцию ФСГ в гипофизе (рис. 4.9а).

Таким образом, действие гормонов ФСГ и ЛГ заключается не только в стимуляции роста фолликула и его подготовке к овуляции, но и в способствовании выработки гормонов яичниками. Под воздействием снижения концентрации ФСГ все фолликулы, которые не достигли 10 мм в диаметре, подвергаются атрезии. В то же время, экспоненциально растущий уровень синтезируемого в доминантном фолликуле эстрадиола строго коррелирует с диаметром фолликула. При достижении фолликулом диаметра 16-23 мм высокий уровень эстрадиола вызывает пик ЛГ (выброс ЛГ) и овуляцию фолликула (по принципу положительной обратной связи). Основные различия в контроле над тонической секрецией ЛГ и выбросом ЛГ представлены в табл. 4.1.

Понимание процесса фолликулогенеза легло в основу теории роста и селекции до-

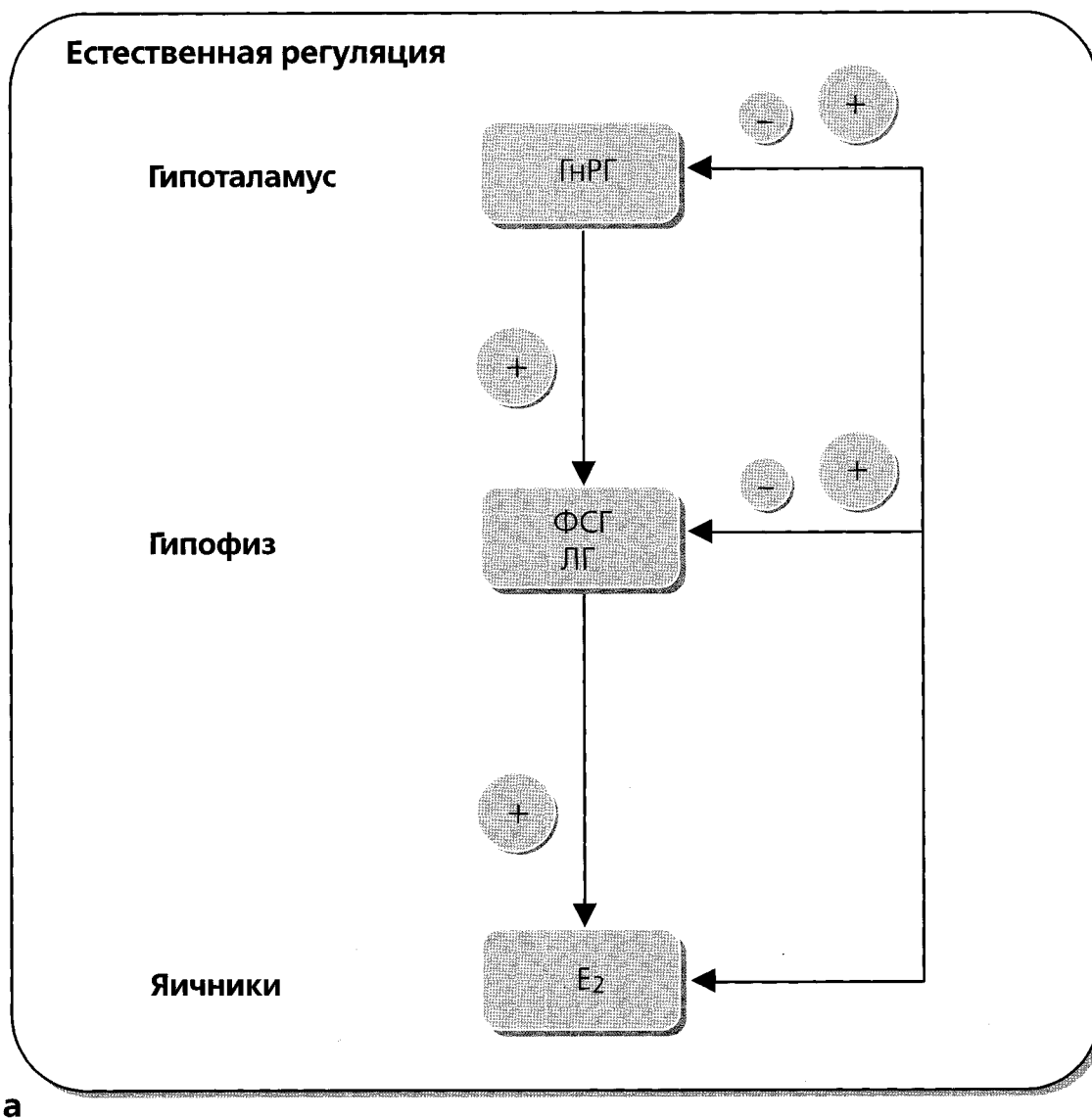
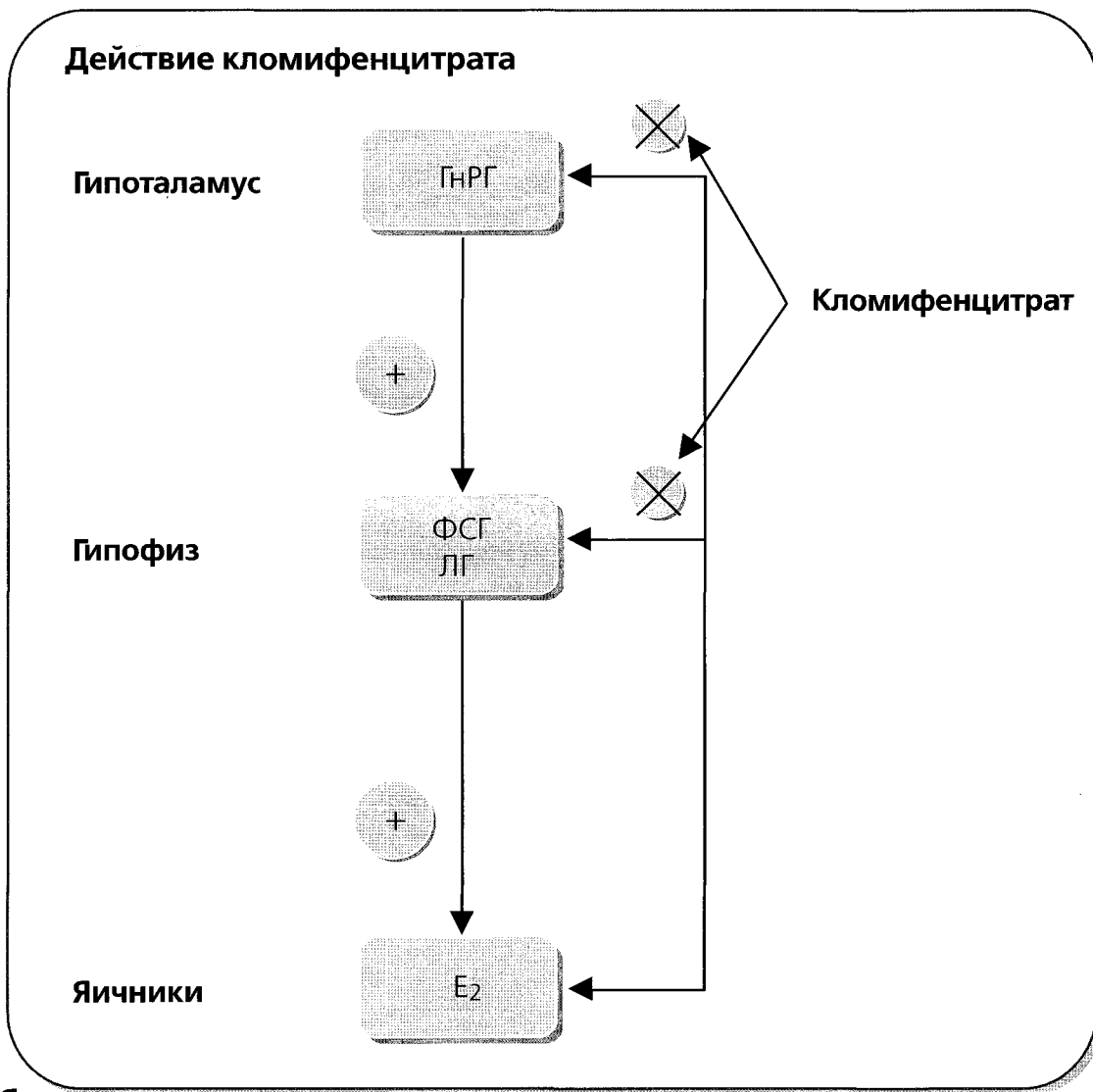
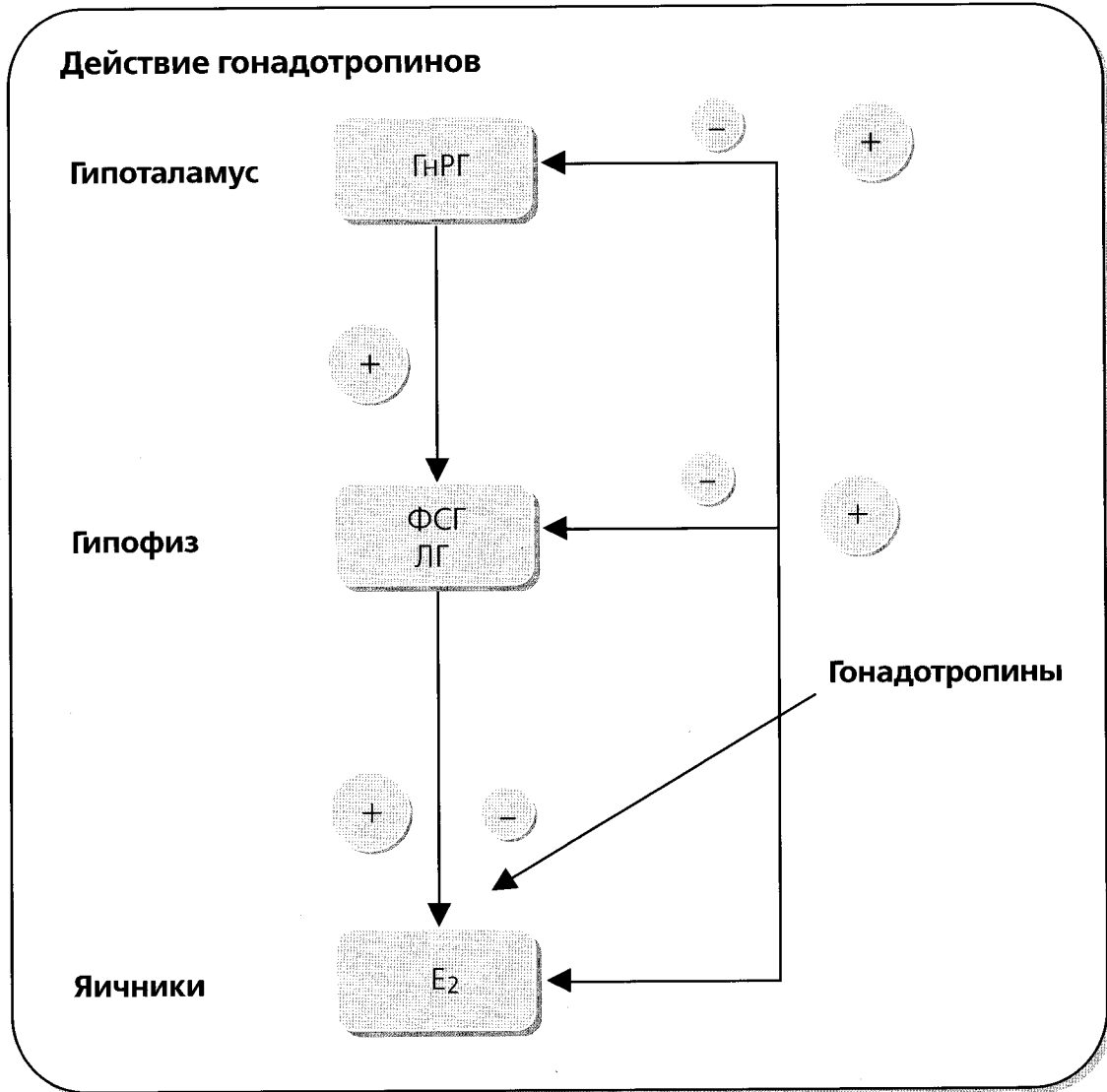


Рис. 4.9. Регуляция выработки гормонов под влиянием гипоталамо-гипофизарно-гонадного тракта (а); механизм действия кломифенцитрата (б) и гонадотропинов (в) для индукции суперовуляции. Схема



6

Рис. 4.9. (продолжение)



В

Рис. 4.9. (продолжение)

минантного фолликула – теория "окна" (теория Брауна), которую используют в индукции суперовуляции (Brown, 1978) (**рис. 4.10**). Согласно этой теории для роста антральных фолликулов диаметром 3-5 мм уровень ФСГ в начале фолликулярной фазы цикла должен преодолеть определенное значение, так называемый пороговый показатель. Уровень порога строго индивидуален и зависит от овариального резерва.

Дальнейшие исследования показали, что длительное (хроническое) ежедневное введение низких доз ФСГ вызывает образование нескольких преовуляторных фолликулов (Schipper et al., 1998; Hillier, 2000). Расширение "окна" для индукции овуляции более важно, чем превышение порога, при котором наблюдается бурный рост преобладающих фолликулов. При воздействии высокой дозой ФСГ получают превышение порога, тогда как хроническое воздействие низкими дозами ФСГ позволяет расширить "окно" (**рис. 4.10б**).

Три стадии развития антральных фолликулов являются потенциальными мишенями при проведении контролируемой стимуляции яичников (**рис. 4.11**). Стадия 1 представляет теоретический интерес, тогда как стадии 2 и 3 имеют практическое значение, поскольку современные фармакологические препараты могут оказывать на них непосредственное влияние, подавляя процесс селекции фолликулов, с последующей поддержкой их развития до момента пункции фолликулов.

Знания закономерностей процесса фолликулогенеза позволили ученым в течение последних десятилетий прошлого столетия сначала на модельных объектах, а затем и у человека разработать программу контролируемой гормональной овариальной стимуляции (индукции овуляции) (Hillier, 2000; Macklon et al., 2006). Овариальная стимуляция нацелена на сохранение недоминантных фолликулов и предотвращение их атрезии.

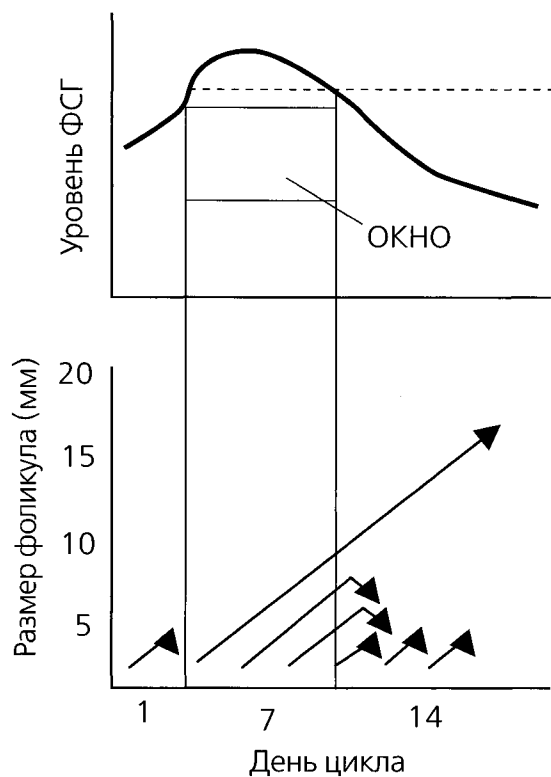
Первые успешные исследования стимуляции работы яичников у женщин с ановуляторным бесплодием были проведены в 1941 г. (Fevold, 1941). Однако до начала 60-х гг. эффективного средства для лече-

ния этой формы женского бесплодия не существовало. В 1961 г. Р. Гринблатт и соавт. опубликовали первые результаты успешного применения с целью овариальной стимуляции кломифенцитрата, синтезированного в 1956 г. (Greenblatt et al., 1961). Данный препарат является производным нестероидных синтетических эстрогенов. Кломифенцитрат обладает слабыми эстрогенными и выраженными антиэстрогенными свойствами, вызывая по механизму обратной связи усиление секреции ГнРГ и опосредуя свое действие не через яичники, а через гипоталамус (**рис. 4.9б**).

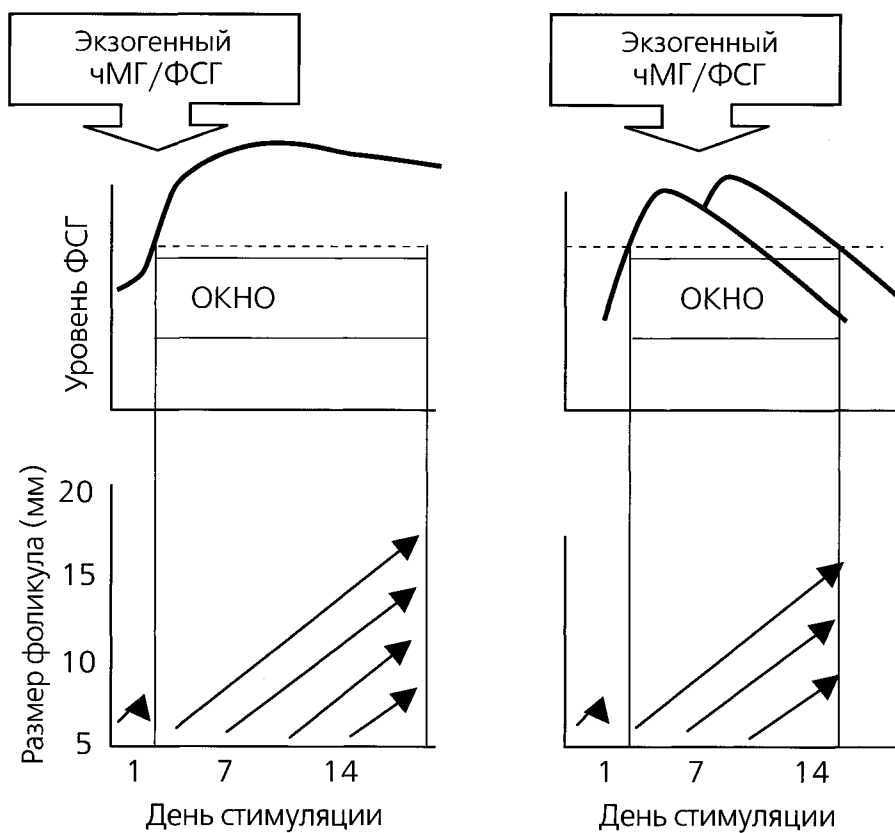
На протяжении последующих четырех десятилетий кломифенцитрат использовали для лечения ановуляторных состояний, что позволяло в 60-90% случаев восстанавливать овуляцию, однако количество получаемых ооцитов составляло 1-2, частота наступления беременности была низкой, уровень эктопической беременности – высоким (Homburg and Insler, 2002; Holzer et al., 2006; Macklon et al., 2006).

Впервые гонадотропины человека были использованы для стимуляции яичников у женщин с ановуляторным бесплодием в 1958 г., спустя два года была получена беременность и родился ребенок (Gemzell et al., 1958, 1960). В 1961 г. беременность наступила после лечения ановуляторного бесплодия с помощью чМГ (Lunenfeld, 1963). Первоначально препараты гонадотропинов получали из мочи жеребых кобыл, позже – из мочи женщин, находящихся в состоянии менопаузы. В середине 80-х гг. прошлого столетия были разработаны технологии очистки мочевых препаратов, получили распространение высокоочищенные мочевые препараты ФСГ, а с конца 80-х гг. в распоряжение клиницистов поступил агонист ГнРГ. Механизм действия гонадотропинов представлен на **рис. 4.9в**.

В 70-е гг. наиболее распространенными гонадотропинами были препараты, полученные из мочевого чМГ, однако в ходе индукции суперовуляции наблюдалось явление преждевременного ("паразитического") подъема уровня ЛГ, приводящего к преждевременной лютеинизации. При проведении в лечебном цикле индукции суперову-



а



б

Рис. 4.10. Теория "окна" (а); использование "окна" в индукции овуляции (б).
 Схема (цит. по Macklon et al., 2006)

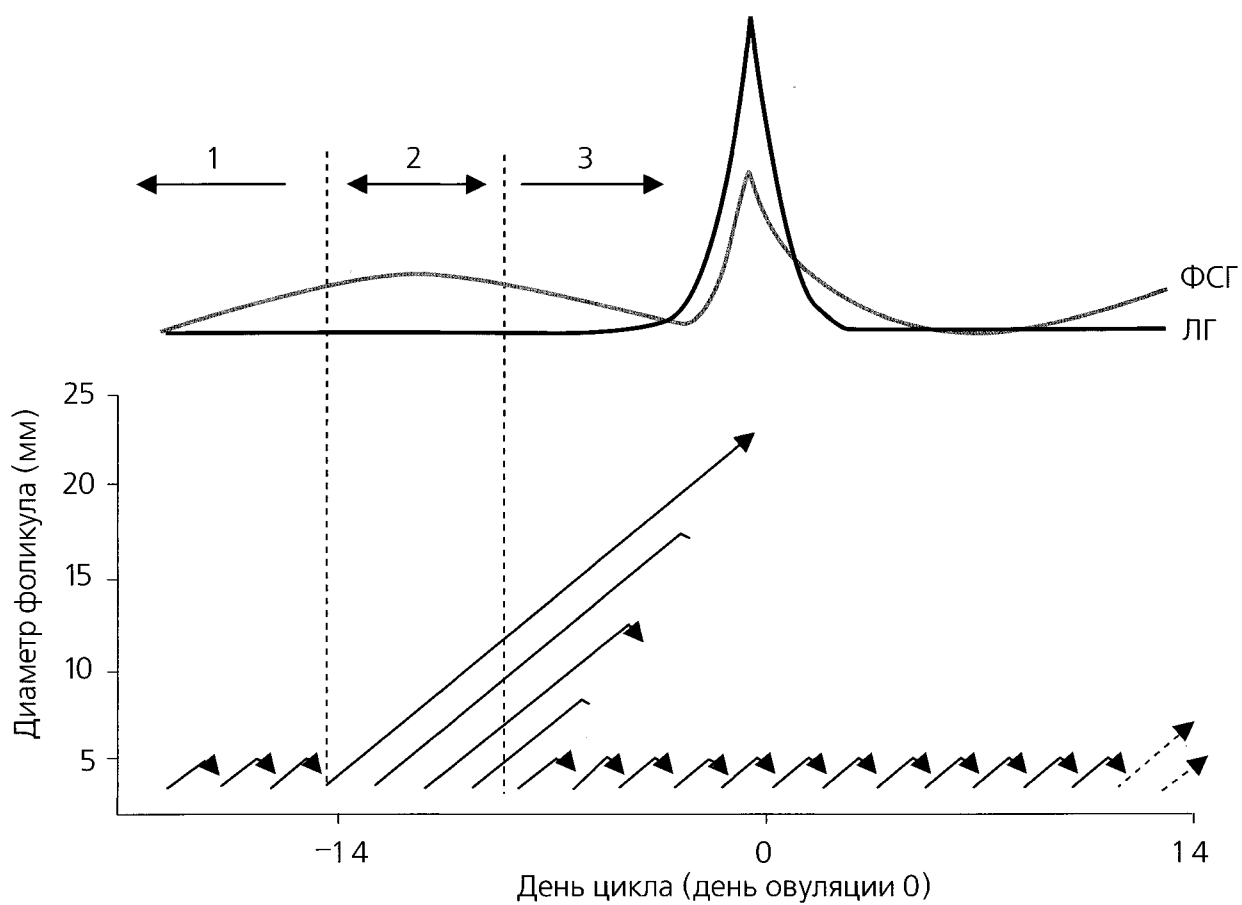


Рис. 4.11. Три стадии, потенциальные мишени для проведения контролируемой стимуляции яичников: 1 – стадия лютеиновой фазы; 2 – первая половина фолликулярной фазы; 3 – преовуляторная стадия во время секреции эстрогенов.

Таблица 4.2. Сравнительная характеристика степени фертильности (%) в зависимости от возраста женщины, места и времени проживания (цит. по Maroulis et al., 1991)

Возраст, годы	Европа, XVI–XIX вв.	США, современные данные
20–24	100*	100*
25–29	95	80–100
30–34	80	50–55
35–39	55–70	18–25
40–44	35–40	5–7
45–49	3–20	?

* Фертильность в возрасте 20-24 лет условно обозначена как 100%.

ляции с помощью кломифенцитрата, чМГ или их комбинации клиницисты отмечали высокую частоту случаев спонтанной овуляции или лютеинизации фолликулов в связи с преждевременным пиком ЛГ.

Последующим шагом в разработке и применении препаратов для индукции суперовуляции явилось достижение в области генно-инженерной технологии – успешный синтез рекомбинантных препаратов ФСГ. Эти препараты не содержат белковых, углеводных и стероидных примесей, а также обладают высокой биохимической однородностью. С 1982 г. в распоряжение клиницистов поступил аналог ГнРГ, использование которого в практике ВРТ было предложено в трех различных протоколах: длинном (наиболее распространенный), коротком и ультракоротком. В конце 90-х гг. в лечебных циклах с индукцией суперовуляции стали применять препараты, антагонисты ГнРГ, которые подобно а-ГнРГ способны предотвращать преждевременный пик ЛГ, однако в отличие от а-ГнРГ действуют мгновенно. Следует отметить, что агонисты и антагонисты ГнРГ были получены одновременно в 1972 г., тем не менее внедрение антагонистов ГнРГ в практику задержалось до 90-х гг. прошлого столетия в связи с недостаточно выраженным эффектом и аллергической реакцией в отдельных случаях. Препараты ант-ГнРГ третьего поколения лишены этих недостатков.

Успех процедуры индукции суперовуляции в значительной степени зависит от состояния эндокринной системы женщины. Вы-

бор схемы стимуляции яичников основывается на данных об индивидуальных особенностях пациентки, результатах оценки овариального резерва. Овариальным резервом женщины называют количество фолликулов, потенциально способных отвечать на стимулирующее действие гонадотропинов. Оценивают овариальный резерв по следующим критериям: возраст женщины, концентрация ФСГ, ингибина В, эстрадиола и АМГ на 2-3-й день цикла (базальная концентрация), данные УЗ-обследования, результаты динамических тестов (тест с нагрузкой кломифенцитратом, тест с а-ГнРГ и проба с экзогенным ФСГ). Среди этих критериев наиболее важными являются возрастной показатель, концентрация ФСГ на 2-3-й день цикла, концентрация эстрадиола и результаты УЗИ.

Возрастной показатель следует учитывать, так как первые симптомы угасания репродуктивной функции появляются у женщин в возрасте 27-28 лет, когда статистически достоверно начинает повышаться базальный уровень ФСГ и снижается вероятность зачатия, рассчитанная на один менструальный цикл. После 30 лет происходит постепенное снижение фертильности, которое быстро прогрессирует после 36 лет (**табл. 4.2**). Физиологическое возрастное снижение фертильности объясняется уменьшением числа примордиальных фолликулов, которые закладываются во внутриутробном периоде. Пик потери ооцитов приходится на 37-38 лет.

Уровень ФСГ отражает секрецию ингиби-

Таблица 4.3. Показатели концентрации ФСГ в качестве маркера овариального резерва (ответ яичников)

Концентрация ФСГ на 2–3-й день цикла, МЕ/л	Возможный ответ яичников
3–8	Хороший ответ на стимуляцию
8–10	Ответ может колебаться от нормального до умеренно сниженного
10–12	Сниженный ответ на стимуляцию
12–17	Плохой ответ на стимуляцию и низкая частота наступления беременности
>17	Крайне плохой ответ на стимуляцию или его отсутствие

на В и эстрадиола в фолликулах. При низких концентрациях ингибина В и эстрадиола секреция ФСГ повышается по принципу обратной связи. Концентрацию ФСГ измеряют на 2-3-й день менструального цикла. Повышенная концентрация ФСГ может свидетельствовать о сниженном овариальном резерве и качестве ооцитов; при нормальном уровне ФСГ может наблюдаться как нормальный, так и недостаточный ответ яичников на стимуляцию. Впервые измерение концентрации ФСГ было предложено в качестве критерия оценки овариального резерва в 1988 г. Измерение уровня ФСГ – рутинный анализ при оценке овариального резерва (Т.А. Назаренко и А.А. Смирнова, 2004) (табл. 4.3).

УЗ-обследование – высокоинформативный метод оценки функционального состояния яичников, позволяет получить сведения о состоянии внутрияичникового кровотока с помощью доплерометрических показателей. Во время УЗ-обследования проводят оценку следующих показателей овариального резерва: структуры яичников, их объема, количества антральных фолликулов, показателей внутрияичникового кровотока. Отмечена положительная корреляция между объемом яичников и риском развития синдрома гиперстимуляции яичников, который может сопутствовать в некоторых случаях программе ЭКО. Увеличение объема яичников может выступать одним из симптомов синдрома поликистозных яичников, при котором их средний объем составляет более 10 см³. Снижение объема яичников не позволяет получить достаточного количества ооцитов, что уменьшает вероятность наступле-

ния беременности после программы ЭКО.

С помощью УЗИ устанавливают количество антральных фолликулов перед проведением индукции суперовуляции. Общее количество антральных фолликулов диаметром 2-10 мм является одним из точных показателей, отражающих репродуктивный возраст женщины. Отмечена строгая корреляция между числом антральных фолликулов диаметром 2-5 мм перед стимуляцией и числом извлеченных ооцитов (табл. 4.4).

В ходе проведения УЗИ принимают во внимание показатели доплерометрии, что позволяет прогнозировать ответ яичников на стимуляцию. Впервые анализ кровотока в яичниковой артерии в разные фазы менструального цикла был предложен в 1985 г.: установлено снижение пульсационного индекса и индекса резистентности, а также увеличение скорости кровотока в яичниковой артерии, кровоснабжающей яичник, содержащий доминантный фолликул (Taylor et al., 1985). В настоящее время проводят цветовое картирование кровотока в яичнике (доплерометрию), которое позволяет получить характеристики кривых скоростей кровотока в яичниковой артерии в области ее вхождения в ворота яичников, стромальных артериях, сосудах стенки фолликула или желтого тела. Допплерометрический анализ включает следующие параметры: форму кривой, скорость или объем кровотока (пиковая систолическая скорость кровотока, максимальная конечная диастолическая скорость кровотока, усредненная по времени максимальная скорость кровотока), а так-

Таблица 4.4. Число антральных фолликулов в качестве маркера овариального резерва (ответ яичников)

Количество антральных фолликулов диаметром 2–10 мм в обоих яичниках	Возможный ответ яичников
<5	Отрицательный ответ
5–7	Возможен отрицательный ответ, требуется высокая доза ФСГ
8–12	Умеренный ответ, умеренная частота наступления беременности
13–30	Положительный ответ на небольшие дозы ФСГ, умеренный риск синдрома гиперстимуляции яичников
30	Чрезмерный ответ, высокий риск синдрома гиперстимуляции яичников

же индексы, отражающие сопротивление сосудистой стенки (пульсационный индекс, индекс резистентности, систолическое отношение) (**фото 4.1**).

Допплерометрический анализ позволяет получить представление о состоянии сосудистой системы внутренних половых органов в различные фазы менструального цикла, соответственно, проанализировать функциональный резерв яичников и прогнозировать их ответ на действия стимуляторов во время индукции суперовуляции. С помощью ультразвукового и доплерометрического обследований яичников проводят диагностику некоторых форм бесплодия, а также мониторинг фолликулогенеза в процессе лечения, что позволяет прогнозировать ответ яичников на стимуляцию (оценка овариального резерва) в программе ЭКО.

У пациенток с недостаточным ответом на стимуляцию и нормальным уровнем ФСГ отмечено повышение пульсационного индекса и индекса резистентности перифолликулярных сосудов яичников. Соответственно, современные методы оценки овариального резерва позволяют индивидуально подходить к выбору протокола индукции суперовуляции и устанавливать дозы препаратов, необходимые для стимуляции яичников.

Индукцию суперовуляции контролируют с помощью ультразвукового и гормонального мониторингов. Степень зрелости ооцитов, полученных в результате стимуляции в программе ЭКО, варьирует в каждом индивидуальном случае: у одной и той же пациентки могут быть получены ооциты раз-

личной степени зрелости, что обусловлено возрастным фактором или неадекватным ответом организма на стимуляцию.

Под ультразвуковым мониторингом понимают серию УЗИ, которые выполняют в определенные дни стимуляции с целью оценки динамики роста фолликулов и эндометрия, а также выбора тактики лечения. УЗИ позволяет визуализировать фолликулы с момента, когда их размер составляет 3–5 мм.

С помощью ультразвукового мониторинга проводят контроль над созреванием фолликулов, что дает возможность при необходимости внести коррективы в схему лечения, своевременно избежать такого побочного эффекта, как синдром гиперстимуляции яичников.

Благодаря определению размеров фолликула(-ов) посредством УЗИ устанавливают дату однократного введения разрешающей дозы триггера финального созревания фолликулов, что наиболее оптимально при достижении фолликулами размеров не менее 15–18 мм. Препараты, содержащие чХГ, а-ГнРГ, рЛГ, рчХГ, вводят во всех протоколах в момент созревания доминантного фолликула с целью запуска овуляции в расчетное время.

УЗ-мониторинг включает контроль над объемом яичников и над количеством фолликулов, измерение среднего диаметра фолликулов (по сумме двух измерений), толщины эндометрия.

Объем яичников определяют на основании трех измерений, проведенных в двух перпендикулярных плоскостях: длина, ширина

и толщина яичника.

Измерение среднего диаметра каждого фолликула производят на основании как минимум двух (в одной плоскости сканирования) или трех (в двух перпендикулярных плоскостях сканирования) измерений. При правильной округлой форме фолликула достаточно измерить диаметр двух перпендикулярных друг другу плоскостей и вычислить среднее. Если фолликул деформирован другими фолликулами и имеет неправильную форму, производят три измерения и вычисляют среднее.

При УЗ-наблюдении можно констатировать равномерный и неравномерный рост фолликулов. При неравномерном росте наблюдают фолликулы различного размера, поэтому в таком случае ориентируются на фолликул наибольшего размера или на группу (когорта) фолликулов одного диаметра. При равномерном росте фолликулов визуализируется когорта доминантных фолликулов приблизительно одного размера.

Определение толщины эндометрия (среднего эха, М-эха) подразумевает измерение суммарной толщины эндометрия на передней и задней стенках матки. Объективная интерпретация ультразвуковых характеристик эндометрия (его толщины, структуры) является одним из важнейших факторов для определения "окна" имплантации, поскольку известно, что одним из главных условий успешного проведения процедуры ЭКО является готовность эндометрия принять эмбрион – имплантационная способность эндометрия (или рецептивность эндометрия).

Впервые использование данных о минимальной толщине эндометрия (6 мм) в качестве прогностического критерия для возможного развития беременности в естественном цикле было предложено в 1989 г. (Gonen et al., 1989). Последующее усовершенствование ультразвуковых приборов позволило не только получать информацию о толщине эндометрия, но и оценивать его структуру.

Как известно, циклические гормональные изменения, связанные с фолликулогенезом, происходят и на уровне эндометрия –

изменение его толщины и структуры. В ранней пролиферативной (фолликулярной фазе) на 5-7-й день менструального цикла отмечают утолщение М-эха до 3-6 мм, эндометрий характеризуется низкой эхогенностью и имеет однородную структуру, в центре М-эха может наблюдаться тонкая (толщиной до 1 мм) гиперэхогенная полоска. В этот же период на периферии М-эха отмечают появление анэхогенной зоны толщиной около 1 мм, которая может сохраняться на протяжении всего менструального цикла. На 8-10-й день цикла (средняя стадия пролиферации) толщина эндометрия увеличивается до 6-10 мм. В ранней секреторной (или лютеиновой) фазе толщина эндометрия колеблется от 8-10 до 16 мм, возрастает эхогенность эндометрия предположительно вследствие повышения содержания слизи и гликогена в железах. В середине секреторной фазы эндометрий становится еще более эхогенным, а его толщина достигает максимума, составляя 10-20 мм. В поздней пролиферативной и преовуляторной фазах развития эндометрия наблюдают его многослойную структуру и гиперэхогенность.

Помимо УЗ-оценки толщины и эхогенности эндометрия, производят доплерометрическую оценку кровотока в маточной артерии, субэндометриальных и эндометриальных сосудах, которые наряду с эхоструктурой эндометрия позволяют оценить его имплантационный потенциал. Пульсационный индекс маточной артерии является одним из показателей успешности имплантации.

В некоторых случаях необходимо проведение гормонального мониторинга, однако в настоящее время он используется реже в связи с высокой информативностью УЗ-мониторинга. Гормональный мониторинг включает динамическое определение концентрации эстрадиола и иногда прогестерона в крови, дополняет данные ультразвукового исследования в оценке функциональной зрелости фолликулов. Некоторые специалисты практикуют одновременное использование показателей концентрации эстрадиола с ультразвуковыми данными для назначения времени введения разрешающей дозы триггера

финального созревания фолликулов.

Таким образом, обычно к 10-12-у дню стимуляции (12-14-й день цикла) фолликулы достигают финальной стадии созревания. При мониторинге суперовуляции отмечают следующие критерии зрелости фолликулов: средний диаметр доминантного фолликула ≥ 17 мм, толщина эндометрия 8 мм и более, уровень E_2 до 3000-5000 пг/л или примерно 300 пг/л в расчете на каждый фолликул диаметром более 15 мм.

Финальное созревание фолликулов, в результате которого происходит овуляция, характеризуется зрелостью не только всех структур фолликула, окружающих ооцит, но и созреванием цитоскелета, структур ооплазмы ооцита, определяющих развитие преэмбриона в случае оплодотворения.

В соответствии с критериями зрелости фолликулов для завершения созревания ооцитов пациентке в момент созревания доминирующего фолликула для запуска овуляции в расчетное время назначают однократное введение разрешающей дозы триггера финального созревания фолликулов (чХГ, а-ГнРГ, рЛГ, рчХГ). Введение овуляторной дозы препарата чХГ (а-ГнРГ, рЛГ, рчХГ) позволяет предупредить преждевременный рост уровня ЛГ.

Под триггером финального созревания фолликулов понимают запуск гормональных, биохимических, генетических механизмов овуляции. В естественном цикле при достижении фолликулом овуляторной стадии высокий уровень эстрадиола вызывает по принципу положительной обратной связи пик ЛГ и овуляцию. Таким образом, при достижении во время менструального цикла фазы овуляции триггер финального созревания фолликула (реже двух фолликулов) проявляется в виде обратной положительной связи между ЛГ и E_2 , при этом наблюдается выброс ЛГ.

В стимулированных же циклах в рамках программы ЭКО уровень эстрогенов повышается преждевременно, что вызывает непрогнозируемый значительный рост уровня ЛГ. Таким образом, при проведении программы ЭКО возникает необходимость предпринять определенные меры,

которые позволили бы избежать пика ЛГ и получить зрелый ооцит. Первоначально с целью определения времени для получения зрелых ооцитов при пункции фолликулов 2-3 раза в сутки проводили измерение уровня эндогенного ЛГ в сыворотке крови или моче, а пункцию фолликулов осуществляли через 24-36 ч после выявления пика ЛГ (>10 мЕд/л). Однако отмечено, что при созревании нескольких фолликулов пик ЛГ может не наступать (Macklon et al., 2006).

В современных лечебных программах используют различные препараты, действие которых вызывает финальное созревание фолликулов. Первоначально применяли чХГ. Дозировка разрешающей дозы триггера финального созревания фолликулов была разработана австралийскими учеными в конце 60-х гг. прошлого века. Согласно этим разработкам финальное созревание преовуляторных фолликулов и овуляция после стимуляции ФСГ могут быть достигнуты дозой ХГ от 5000 до 80 000 мЕд (Brown, 1978). В настоящее время доза ХГ обычно варьирует от 5000 до 10 000 мЕд. Впервые же введение чХГ в качестве триггера финального созревания фолликулов было предложено в 1938 г. (Engle, 1938). К препаратам, которые оказывают действие, вызывающее финальное созревание фолликулов, относятся чХГ, рХГ, рЛГ, ГнРГ, а-ГнРГ. Внедрение а-ГнРГ в качестве триггера привело к минимизации риска синдрома гиперстимуляции яичников.

Индукция овуляции может сопровождаться определенными осложнениями, среди них: преждевременная лютеинизация неовулировавших фолликулов и синдром гиперстимуляции яичников.

Следующим этапом программ ЭКО и ЭКО с ICSI после введения триггера финального созревания фолликулов является пункция фолликулов, с помощью которой осуществляют забор ооцитов путем аспирации содержимого фолликулов.

4.3.2. Пункция фолликулов, получение и оценка ооцитов

Гормональная стимуляция яичников позволяет получить не один, а несколько, иногда более десятка фолликулов. Получение нескольких ооцитов, их оплодотворение в условиях *in vitro* и последующий перенос нескольких эмбрионов в полость матки женщины повышают вероятность успешного исхода программ ЭКО и ЭКО с ICSI.

Процедуру пункции фолликулов производят через 35-38 ч после введения триггера финального созревания фолликулов при индукции суперовуляции с учетом данных УЗ- и гормонального мониторингов. Пункцию проводят через свод влагалища (область наименьшего количества кровеносных сосудов и нервных окончаний) под кратковременной внутривенной анесте-

зией и УЗ-контролем, при этом к яичнику подводят специальную пункционную иглу, с ее помощью производят прицельный прокол каждого из фолликулов, из которых в стерильный шприц аспирируют содержимое вместе с находящимися в них ооцитами (рис. 4.12).

Первоначально получение ооцитов производили во время лапароскопии, которую позже заменила трансвагинальная пункция фолликулов под УЗ-контролем, что упрощает процедуру получения ооцитов. Использование этого метода возможно даже при наличии спаечного процесса, его можно применять амбулаторно. Получение ооцитов лапароскопическим путем производят только по показаниям – в случае невозможности выполнения трансвагинальной пункции, например, при атипич-

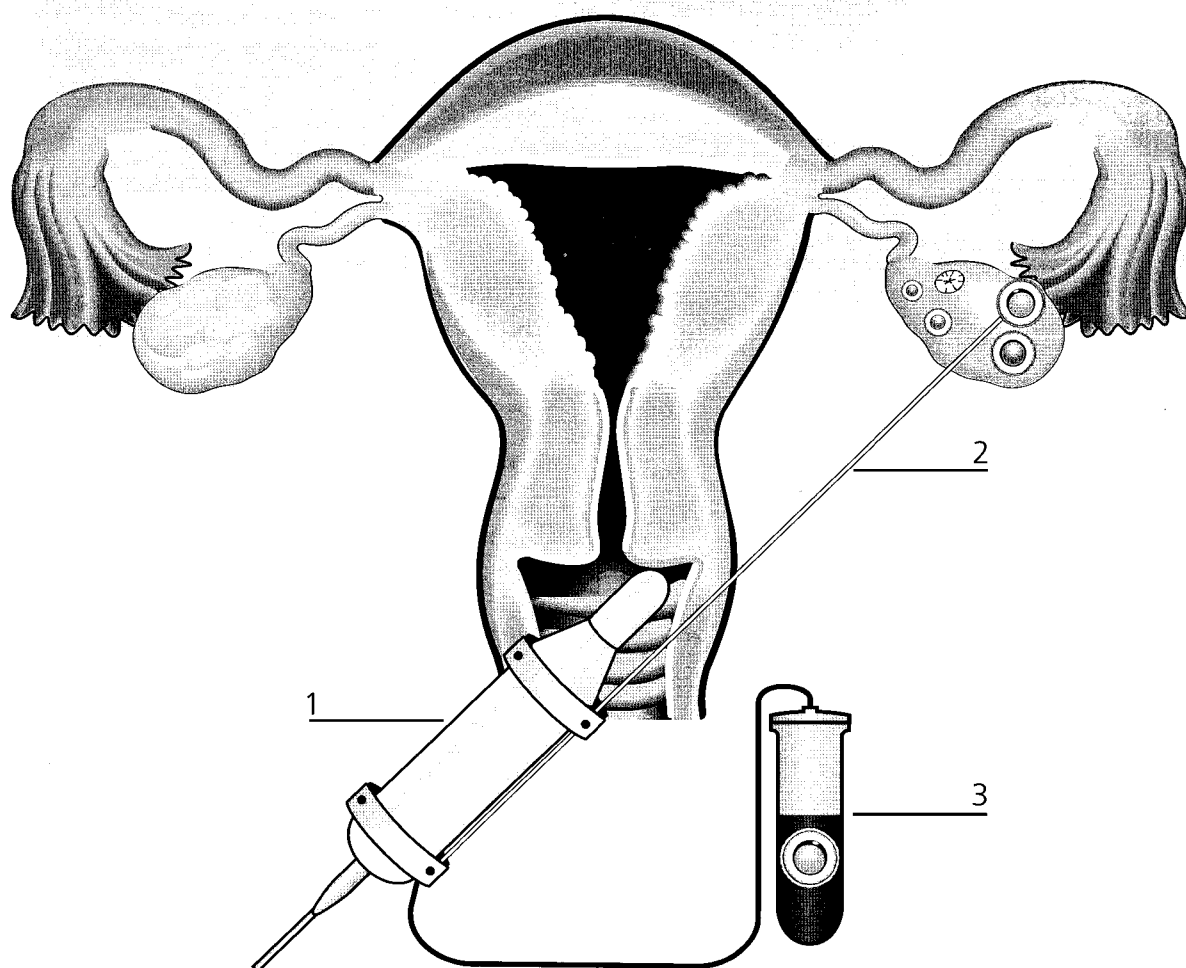


Рис. 4.12. Процедура пункции фолликулов. Схема: 1 – ультразвуковой датчик; 2 – игла для аспирации фолликулярной жидкости; 3 – контейнер с полученным материалом.

ном расположении яичников.

Аспирированное содержимое одного или нескольких фолликулов в стерильном шприце передают в эмбриологический бокс. Вся процедура пункции занимает 10-15 мин.

Одним из важнейших этапов успешного проведения программы ЭКО/ЭКО с ICSI является эмбриологический, который включает извлечение и оценку ооцитов, культивирование ооцитов, получение и обработку эякулята, оценку сперматозоидов, проведение процедуры искусственной инсеминации в условиях *in vitro* или ICSI, установление факта оплодотворения ооцитов, проведение при наличии показаний манипуляции замораживания ооцитов, сперматозоидов, эмбрионов, проведение при необходимости следующих микроманипуляций: вспомогательного хэтчинга, продленного культивирования эмбрионов, извлечения бластомера с целью преимплантационной диагностики по показаниям.

Стандартная работа с извлеченными ооцитами в эмбриологическом боксе включает следующие этапы. Аспирированную фолликулярную жидкость вместе с ооцитами помещают в чашки Петри. Анализ аспирированной жидкости осуществляют с помощью стереомикроскопа с 10-50-кратным увеличением, что позволяет выявить все ооцит-кумулюсные комплексы, размер которых варьирует (иногда очень значительно). Ооцит-кумулюсные комплексы аккуратно переносят в среду для отмывания, после чего помещают в отдельную лунку специальной четырехлунной чашки с питательной средой. Манипуляции с клетками производят с помощью стерильных пастеровских пипеток или специальных стеклянных (пластиковых) капилляров. Во время микроскопирования проводят морфологическую оценку полученных ооцит-кумулюсных комплексов (процедура неинвазивной селекции). После определения степени зрелости извлеченных ооцитов и их инкубации в течение 3-4 ч в CO₂-инкубаторе (содержащий 5% CO₂ и 95% воздуха) ооциты освобождают от клеток кумулюса, помещая их сначала в раствор HEPES-EBSS, содержащий гиалуронидазу (тип VIII) при

+37 °C, затем производят ферментативную (посредством гиалуронидазы) и механическую обработку ооцитов, удаляя лучистый венец (*corona radiata*). Ооциты промывают несколько раз в культуральной среде, что позволяет избавиться от ферментов и скопления оставшихся клеток кумулюса, затем их инкубируют в CO₂-инкубаторе до момента инсеминации *in vitro* или микроинъекции сперматозоида.

После оценки ооцитов и до момента инсеминации *in vitro* или микроинъекции сперматозоида чашку Петри с ооцитами в культуральной среде помещают в CO₂-инкубатор, условия в котором максимально приближены к условиям в организме женщины. Обычно ооциты оставляют в инкубаторе на 4-6 ч.

Следует учитывать, что в ходе проведения программы ЭКО/ЭКО с ICSI соотношение между количеством наблюдаемых при УЗ-мониторинге фолликулов и количеством качественных ооцитов с последующим их оплодотворением и переносом эмбрионов различается. Около 80% извлеченных ооцитов находятся на стадии метафазы II, тогда как примерно 10% – в процессе атрезии, остальные 10% не достигли стадии метафазы II (Mandelbaum, 2000; Hussein, 2005). Из 10 фолликулов, визуализированных при УЗИ, получают 7-8 ооцитов. После проведения неинвазивной оценки ооцитов количество клеток, пригодных для оплодотворения, сокращается до 5-6, а последующая оценка качества эмбрионов, полученных в результате инсеминации в условиях *in vitro* или микроинъекции сперматозоида, позволяет выбрать 1 (2-3) эмбриона для переноса в полость матки.

Зрелый преовуляторный фолликул содержит ооцит второго порядка на стадии метафазы II, получивший почти всю цитоплазму ооцита первого порядка, и первое полярное тельце. Зрелый ооцит заключен в оболочку из фолликулярных клеток (ооцит-кумулюсный комплекс). Диаметр клетки составляет 110-120 мкм, клетка имеет овальную, изредка сферическую форму, окружена зоной пеллюцида (*zona pellucida*), непосредственно над зоной пеллюцида расположены клетки лучистого венца (*corona radiata*), окруженные

клетками яйценосного бугорка (*cumulus oophorus*) (фото 4.2).

Как известно, развитие эмбриона в значительной степени зависит от качества ооцита. Еще в начале XX ст. эмбриолог Э. Уилсон сформулировал положение, согласно которому оогенез определяет эмбриогенез, а если дословно – "эмбриогенез начинается во время оогенеза" (Coticchio et al., 2004). Во время оогенеза женская половая клетка созревает, претерпевая целый ряд молекулярных изменений, которые позволяют ей пройти стадии мейотического деления, подготовиться к оплодотворению единственным сперматозоидом, деконденсировать головку сперматозоида и завершить стадии развития после оплодотворения, в которых задействованы запасы материнских мРНК и белков, а также пройти этап преимплантационного развития. Качество зрелого ооцита зависит как от факторов внешнего воздействия, к которым относится в первую очередь клеточное окружение, так и от нормального функционирования внутриклеточных механизмов. Преобразование ооцита включает созревание ядерного аппарата (с изменением количества хромосом) и цитоплазмы. В естественном цикле вытеснение первого полярного тельца происходит, как правило, через 32 ч после стимуляции яичников, за 6-8 ч до начала овуляции. Зрелость ядра зависит от степени активности различных факторов в том числе: фактора, способствующего образованию метафазы (MPF); митоген-активирующего белка киназы (серин/треонин киназа) (MAP kinase (serine/threonine kinase)) и др. (Hashimoto and Kishimoto, 1988; Verde et al., 1992; Sun et al., 1999; Matzuk et al., 2002; Miyara et al., 2003; Juengel and McNatty, 2005; Hernandez-Gonzalez et al., 2006). Белок MPF прямо или опосредованно контролирует такие процессы, как фосфорилирование гистонов, полимеризация микротрубочек веретена деления (Charrasse et al., 2000; Miyara et al., 2003). Белок MAP участвует в регуляции клеточного цикла, его активация происходит после растворения ядра.

В процессе созревания ядерного аппарата ооцит дважды останавливается в разви-

тии, претерпевая I и II остановки процесса созревания. I блок созревания снимается достижением пика ЛГ во время финального созревания фолликулов, образуются ооцит второго порядка и первое полярное тельце. Завершение мейотического деления происходит только в случае оплодотворения ооцита. При оплодотворении проникающий в клетку сперматозоид стимулирует завершение мейотического деления – стадии анафазы и телофазы II мейотического деления, образование второго полярного тельца. Ооцит второго порядка в результате оплодотворения и окончания мейоза превращается в яйцеклетку, а после слияния пронуклеусов образуется зигота.

Созревание цитоплазмы в ооците подразумевает структурные и биохимические преобразования. Последние включают активный синтез и накопление необходимых для развития ооцита и будущего эмбриона веществ: белков, АТФ, молекул РНК. Структурные преобразования включают перераспределение в цитоплазме клеточных органелл: кортикальные гранулы мигрируют к периферии клетки, располагаясь по ее диаметру под оолеммой. Кортикальные гранулы представляют собой маленькие (размером 0,2-0,6 мкм) секреторные гранулы, содержат мукополисахариды и ферменты (протеазы, пероксидазы, фосфатазы). При оплодотворении роль гранул заключается в предотвращении полиспермии.

Митохондриальная активность в различных участках цитоплазмы варьирует, что обусловлено различным распределением митохондрий в цитоплазме клетки. Как известно, митохондрии играют центральную роль в обеспечении АТФ во время оплодотворения и на ранних этапах развития эмбрионов.

Остановимся более подробно на процедуре неинвазивной селекции ооцитов. Полученные во время пункции фолликулов в лечебном цикле с индукцией суперовуляции ооциты представляют собой гетерогенную группу, так как находятся на разных стадиях мейотической зрелости, включая антральные или незрелые ооциты, а также дегенеративные клетки. Соот-

ношение зрелых и незрелых ооцитов зависит от следующих параметров: причины бесплодия, возраста, состояния овариального резерва, особенностей используемого в лечебном цикле протокола стимуляции. Метод культивирования незрелых ооцитов в условиях *in vitro* позволяет получать зрелые ооциты на стадии MII и использовать их в программе ЭКО с ICSI (Smith et al., 2000; Soderstrom-Anttila et al., 2006). Целесообразность применения метода дозревания ооцитов *in vitro* широко дискутируется, так как существуют противоречивые данные о результативности применения метода дозревания ооцитов вне организма женщины (De Vos et al., 1999; Kim et al., 2000; Strassburger et al., 2004). В отдельных случаях отмечают нарушение развития эмбрионов, получаемых в результате оплодотворения ооцитов, культивированных в условиях *in vitro*, что может свидетельствовать о нарушении созревания цитоплазмы или асинхронности созревания ядра и цитоплазмы (Mikkelsen and Lindenberg, 2001).

Процедура неинвазивной селекции предусматривает отбор под микроскопом наиболее зрелых и качественных ооцитов и включает оценку ооцит-кумулюсных комплексов и непосредственно ооцитов. Оценка качества ооцит-кумулюсного комплекса производят после процедуры промывания клеток от фолликулярной жидкости. Помещенные в четырехлунные чашки с культуральной средой ооцит-кумулюсные комплексы оценивают: учитывают количество и качество зрелых, незрелых и перезрелых ооцитов, анализируют состояние клеток кумулюса.

Следующий этап неинвазивной селекции заключается в оценке очищенных от клеток кумулюса ооцитов, что позволяет выделить среди них зрелые; изучают морфологические особенности клетки, а в последние годы – состояние ядерного аппарата и ооплазмы. С внедрением технологии ICSI в практику ЭКО появилась возможность получать более полную информацию о морфологических изменениях ооцитов, так как для проведения этой манипуляции из ооцит-кумулюсного комплекса необходимо удалить клетки кумулюса, что позволяет наблюдать за процес-

сом оплодотворения каждого ооцита. Таким образом, следующий этап включает оценку ооцитов под микроскопом с позиции степени их зрелости и производится после ферментативной и механической обработки клеток. Удаление клеток кумулюса позволяет исследователям получить информацию непосредственно об ооцитах – форме клеток, окраске и степени грануляции ооплазмы, целостности и толщине зоны пеллюцида, размере перивителлинового пространства, наличии вакуолизации, наличии/отсутствии ядра, наличии/отсутствии первого полярного тельца, а также провести морфологическую оценку полярного тельца. Влияние этих параметров на частоту оплодотворения, качество эмбриона и имплантацию исследуется. Достижения в области функциональной геномики и протеомики позволят в ближайшем будущем расшифровать механизмы запуска созревания ооцитов и идентифицировать гены, экспрессия которых происходит на различных стадиях фолликулогенеза.

Рассмотрим более детально каждый из имеющихся в распоряжении исследователей параметров оценки ооцита. Эмбриологи, проводя оценку ооцитов, принимают во внимание данные УЗИ о состоянии фолликулов, их размере и васкуляризации.

При оценке фолликулов учитывают их размер и васкуляризацию. Связь между характеристиками фолликулярной жидкости и качеством ооцита в настоящее время всесторонне исследуется (Mendoza et al., 2002; Combelles and Albertini, 2003; Combelles et al., 2005; Thomas et al., 2005). Показатели уровней содержания стероидных гормонов и таких белков, как цитокины и факторы роста, могут отражать состояние функционирования клеток гранулезы и, соответственно, ооцитов. Такую оценку производят в большинстве случаев в научных целях. Синхронность созревания цитоплазмы и ядра в ооците может нарушаться в результате недостаточного кровоснабжения фолликула при контролируемой гиперстимуляции яичников, вследствие чего возникает дефицит кислорода. У ооцитов, созревающих в условиях гипоксии, снижена жизнеспособность, наблюдают повреждение веретена

деления, приводящее к хромосомным аномалиям, нарушение интрацитоплазматического содержания АТФ, структурной организации самой цитоплазмы (Van Blerkom et al., 1997, 2003; Van Blerkom, 2004).

При оценке ооцит-кумулюсного комплекса экспансия кумулюса указывает на зрелость ооцита. Как известно, клетки кумулюса представляют собой клетки гранулезы, расположенные вокруг ооцита в виде эпителиального слоя и связанные с ним с помощью щелевых контактов, посредством которых осуществляется связь между половой клеткой и ее окружением, что обеспечивает развитие и рост гаметы. В ооцит-кумулюсных комплексах различают кумулюс следующей степени зрелости: зрелый (полная экспансия, многослойный, компактный кумулюс, плотно прилегающий к зоне пеллюцида), средней степени зрелости (меньшая степень экспансии, частично отслоившийся кумулюс) и незрелый (отсутствие экспансии, отсутствие кумулюса). Исследователи отмечают корреляцию между зрелостью кумулюса и ядра ооцита, но она достаточно неточна. Частота оплодотворения ооцитов, полученных из зрелых ооцит-кумулюсных комплексов, выше по сравнению с ооцитами, заключенными в кумулюс с меньшей степенью экспансии или ее отсутствием (Coticchio et al., 2004). Этот параметр может быть ценным критерием успешного исхода оплодотворения.

Около 3% извлеченных ооцит-кумулюсных комплексов демонстрируют дегенеративные признаки: темная или неравномерная ооплазма, неравномерное окружение клетками кумулюса зоны пеллюцида (Mandelbaum, 2000).

Работы на модельных системах и исследования незрелых ооцитов человека во время их дозревания в условиях *in vitro* показали, что во время фолликулогенеза между ооцитом и клетками гранулезы кумулюса существует тесное взаимодействие. Успешное созревание ооцитов зависит от присутствия фолликулярных клеток (Combelles et al., 2002; Sutton et al., 2003; McKenzie et al., 2004; Pangas and Matzuk, 2005). Ооцит подвергается влиянию со

стороны цАМФ, стероидных гормонов, простагландинов и других факторов, которые не только регулируют его рост и развитие, но и ингибируют мейотическое деление (Hess et al., 1999; Matzuk et al., 2002; Calvert et al., 2003; Sutton et al., 2003; McKenzie et al., 2004; Pangas and Matzuk, 2005; Pangas and Rajcovic, 2006). Степень способности клеток кумулюса продуцировать стероидные гормоны может отражать способность эмбриона к имплантации и его последующему внутриутробному развитию (Thomas et al., 2003; Combelles et al., 2005). Соответственно, растущий ооцит также оказывает влияние на окружающие его клетки (McKenzie et al., 2004; Pangas and Matzuk, 2005; Pangas and Rajcovic, 2006). Как было детально рассмотрено выше, после преовуляторного всплеска ЛГ клетки кумулюса проходят процесс экспансии, что обеспечивает связь клеток кумулюса с ооцитом на протяжении процесса овуляции и при последующем оплодотворении. Во время экспансии клетки кумулюса секретируют матрикс, богатый гиалуроновой кислотой, а также экспрессируют ряд других белков, необходимых для формирования и сохранения матрикса. Экспансия кумулюса необходима для нормального развития ооцита в условиях *in vivo* – эмбрионы, полученные в результате оплодотворения ооцитов, лишенных клеток кумулюса, не способны к имплантации (McKenzie et al., 2004). Регуляцию пролиферации клеток кумулюса обеспечивает фактор роста 9 (GDF9), который является одной из сигнальных молекул ооцита (McKenzie et al., 2004; Thomas and Vanderhyden, 2006). После индукции овуляции во время лечебного цикла или пика ЛГ в естественном цикле GDF9 индуцирует работу нескольких генов в клетках кумулюса, участвующих в процессе экспансии кумулюса. Роль фактора Gdf9 в экспансии кумулюса исследуется на экспериментальных моделях (Pangas and Matzuk, 2005). Так, у мышей под воздействием Gdf9 находятся ген синтетазы гиалуроновой кислоты (*Has2*), гены циклооксигеназы 2 (*Cox2*, *Ptgs2*), CREM1 и регуляторный белок стероидогенеза Star, а также ген, кодирующий рецептор ЛГ (Pangas et al., 2004). Эти данные представляют интерес для дальнейшего изучения нарушения

репродуктивной функции у человека (Pangas and Matzuk, 2005).

Оценку ооцитов производят с помощью микроскопирования, учитывая состояние зоны пеллюцида, перивителлинового пространства, цитоплазмы, а также морфологию первого полярного тельца. Эмбриологи дифференцируют ооциты на следующих стадиях: диплотена профазы I, метафаза I и метафаза II. Ооциты на стадии диплотены профазы I являются незрелыми, содержат ядро сферической формы с одним большим ядрышком, смещенным к периферии. К моменту пика ЛГ и перед растворением ядерной оболочки ядро смещается от центральной позиции в ооплазме к периферии. Ооциты на стадии метафазы I определяются как таковые, у которых не визуализируется ни ядро, ни первое полярное тельце. Для ооцитов на стадии метафазы II характерно наличие первого полярного тельца, находящегося под зоной пеллюцида в перивителлиновом пространстве. Первое полярное тельце представляет собой овальную ооплазматическую структуру (диаметром примерно 15 мкм) и содержит 23 хромосомы.

Ооциты второго порядка характеризуются следующими морфологическими признаками: наличием первого полярного тельца и веретена деления, отсутствием клеточного ядра, рыхлым и вязким состоянием кумулюса (**фото 4.3а**). Отмечают также прозрачную умеренно зернистую ооплазму, малое перивителлиновое пространство, бесцветную зону пеллюцида. В некоторых случаях эмбриолог может наблюдать асинхронность созревания ядра, ооплазмы и кумулюса. Морфологические аномалии, которые наблюдают при оценке ооцитов, включают аномальную форму ооцита, аномалии зоны пеллюцида, которые могут заключаться в многослойности, неоднородности (разрывы и разная толщина), наличие пигментации, ворсистой поверхности; полярные тельца разного размера и/или формы, фрагментированное полярное тельце, аномалии ооплазмы (**фото 4.3б,в**).

Для проведения ICSI пригодны лишь ооциты на стадии метафазы II с визуализируемым первым полярным тельцем. Ооциты

на стадии метафазы I могут быть использованы после проведения дозревания *in vitro*, так как уровень оплодотворения ооцитов на стадии метафазы I достаточно низкий (Mikkelsen et al., 2000). Ооциты в профазе I не могут быть использованы из-за диплоидного набора хромосом. Эмбриологи исключают также ооциты на стадии метафазы II увеличенного размера, поскольку они могут содержать двойной набор хромосом, что в дальнейшем после оплодотворения приводит к образованию трехпронуклеарной зиготы и возникновению дигеноидной триплоидии.

Более чем у половины извлеченных ооцитов выявляют одну морфологическую аномалию, наиболее часто встречается грануляция ооплазмы. Извлеченные ооциты могут иметь множественные нарушения: фрагментацию полярного тельца, вакуолизацию, рефрактильные тельца. Для клеток с аномалиями характерна сниженная жизнеспособность, отмечают корреляцию между наличием цитоплазматической грануляции и аномальным набором хромосом в ядре таких клеток (Van Blerkom and Henry, 1992; Sousa and Tesarik, 1994; Staf et al., 2002; Sanfins et al., 2004; Combelles and Racowsky, 2005; Sun and Schatten, 2006). Морфологические аномалии ооцита подразделяют на цитоплазматические и экстрацитоплазматические. При оценке морфологии ооплазмы зрелого ооцита на стадии метафазы II принимают во внимание степень вязкости, цвет, гомогенность ооплазмы, наличие грануляции, вакуолей и включений. Вязкость ооплазмы можно оценить при проведении манипуляции микроинъекции сперматозоида. Сохранение воронки в ооците после инъекции является неблагоприятным признаком дальнейшего развития эмбриона. Аномалии ооплазмы включают ее зернистость, аккумуляцию гладкого эндоплазматического ретикулума, вакуолизацию ооплазмы, аномальное распределение внутриклеточных органелл, поляризацию, при которой кортикальная ооплазма свободна от органелл, возможно наличие рефрактильных телец, некротических вакуолей (Van Blerkom and Henry, 1992; Mikkelsen and Lindenberg, 2001; Miyara et al., 2003; Otsuki et al., 2004).

Результаты эмбриологической оценки половых клеток рекомендуют сообщать супружеским парам, так как отмечено, что для клеток с аномальной морфологией характерен сниженный уровень оплодотворения, низкое качество эмбриона. Кроме того, возможен повышенный риск преждевременного прерывания беременности в связи с анеуплоидным набором хромосом у плода.

Экстрацитоплазматическая оценка зрелого ооцита на стадии метафазы II включает оценку зоны пеллюцида, размера перивителлинового пространства и наличия/отсутствия включений в перивителлиновом пространстве, оценку первого полярного тельца. Среди возможных морфологических нарушений зоны пеллюцида отмечают ее деформацию, многослойность, пигментацию, различную толщину (Pelletier et al., 2004; Combelles and Racowsky, 2005). Перивителлиновое пространство содержит экстрацеллюлярный матрикс, богатый гиалуроновой кислотой, роль которой до конца не выяснена, предполагают, что она блокирует полиспермию при оплодотворении ооцита (Talbot and Dandekar, 2003; Combelles and Racowsky, 2005). В аномальных ооцитах отмечают увеличение перивителлинового пространства, наличие включений в нем (Hassan-Ali et al., 1998; Mandelbaum, 2000; Combelles and Racowsky, 2005). При визуализации полярного тельца отмечают наличие фрагментации, неровности поверхности, а также изменение его размера или формы. Учет морфологических особенностей имеет прогностическое значение для оценки уровня имплантации и наступления беременности (Xia, 1997; Ebner et al., 2000; Verlinsky et al., 2003; Combelles and Racowsky, 2005).

Анализ с помощью поляризационного микроскопа и системы компьютерной обработки изображения (Polscope system) позволяет проводить неинвазивную прижизненную оценку ооцитов с их последующей селекцией, а именно визуализировать локализацию веретена мейотического деления в клетке, производить его оценку (Cohen et al., 2004; Li et al., 2006). Ранее визуализацию веретена деления проводили с помощью иммунофлюорес-

центного окрашивания и конфокального микроскопа (Coticchio et al., 2004). При оценке ооцитов через 5-6 ч после их извлечения веретено деления визуализируют в 74-84% ооцитов MII. Для ооцитов с визуализируемым веретенном характерна гораздо более высокая частота оплодотворения с последующим достижением стадии бластоцисты по сравнению с ооцитами, у которых веретено деления не визуализируется, тогда как относительное положение веретена не оказывает влияния на способность преэмбриона к развитию (Wang et al., 2001a; Moon et al., 2003; Cohen et al., 2004; Coticchio et al., 2004). Прижизненная визуализация веретена деления позволяет оценить качество ооцита, а также снизить риск его повреждения в ходе процедуры ICSI (Scott, 2003; Cohen et al., 2004; Sanfins et al., 2004). По мнению отдельных ученых, такие параметры, как состояние ооцит-кумулясного комплекса и морфология ооцитов, являются неточными индикаторами качества последних (Miyara et al., 2003; Cohen et al., 2004). Именно в связи с этим во многих лабораториях акцент делают на визуализацию веретена деления, так как этот анализ способствует выбору качественных ооцитов и, соответственно, качественных эмбрионов. Такая оценка позволяет отбраковать ооциты, потерявшие способность формировать веретено деления и не достигшие мейотической зрелости (Wang et al., 2001b; Cohen et al., 2004; Trounson, 2006).

Связь между качеством ооцитов и исходом программ ЭКО и ЭКО с ICSI до конца не изучена. По мнению одних ученых, морфология ооцитов является важным прогностическим фактором исхода программы ВРТ в случаях применения ЭКО с ICSI, и существует закономерность между наличием фрагментированного полярного тельца и сниженным уровнем имплантации эмбриона (Ebner et al., 2000, 2002; Kahraman et al., 2000b; Verlinsky et al., 2003). В то же время, другие авторы не находят связи между морфологией ооцитов и результативностью программы ЭКО с применением ICSI (De Sutter et al., 1996; Ciotti et al., 2004). По-видимому, следует учитывать и другие факторы, в том числе

возраст женщины.

Специалисты уделяют внимание не только морфологическим характеристикам ооцита, но и особенностям функционирования клетки. Как известно, ооцит контролирует завершение мейоза после оплодотворения, первые этапы дробления, а также модулирует эпигенетическое развитие эмбрионального генома. Нарушение цитоплазматического созревания ооцита и, соответственно, его функциональных параметров на стадии метафазы II отражается на способности эмбриона к развитию. Некоторые причины идиопатического бесплодия в настоящее время ученые объясняют именно фактором потери способности ооцита к созреванию и переходу на стадию метафазы II. Существует ряд факторов, влияющих на способность ооцита к оплодотворению и дальнейшему развитию эмбриона.

Значительная доля случаев потери эмбрионов после их переноса в полость матки являются результатом хромосомных аномалий ооцита и тонких цитоплазматических дефектов ооцита, негативные последствия которых проявляются только после оплодотворения. Как было рассмотрено выше, процессы созревания ядра и ооплазмы в ооците взаимосвязаны. Среди внутриклеточных компонентов следует выделить материнские РНК, белки, антиоксиданты, а также внутриклеточные органеллы, в первую очередь митохондрии. Предположение о том, что митохондриальные нарушения ооцитов могут быть решающим фактором способности человеческого эмбриона к развитию, получило подтверждение благодаря исследованиям, которые позволили выявить структурные дефекты органелл и дефекты на уровне мтДНК (Steuerwald et al., 2000; Takeuchi et al., 2005).

Нарушение функционирования митохондрий в ооцитах без явных морфологических аномалий может быть наследственным или приобретенным, выступая одной из причин необъяснимой потери беременности у женщин после проведения лечебной программы ЭКО или ЭКО с ICSI.

Митохондрии играют ключевую роль в ци-

топлазматической активности клетки, являясь ее основным источником энергии. Главная функция митохондрий связана с окислением органических соединений и использованием освобождающейся при распаде этих соединений энергии для синтеза молекул АТФ. Митохондрии снабжают клетки АТФ и являются также местом хранения внутриклеточных молекул кальция и преапоптозных факторов.

В связи с перечисленными функциями митохондрий особый интерес вызывают исследования их структуры и функционирования (Chen et al., 1995; Jansen and de Boer, 1998; Van Blerkom et al., 1998, 2003, 2006; Reynier et al., 2001; Acton et al., 2004; Van Blerkom, 2004; May-Panloup et al., 2005; Santos et al., 2006; Spikings et al., 2006). Оценивая активность митохондрий в ооцитах, исследователи установили их различное содержание в клетке во время оогенеза и выявили закономерность распределения митохондрий в ооцитах разной степени зрелости. С использованием показателя $\Delta\Psi_m$ стало возможным определение "здоровья" митохондрий. Этот показатель отражает потенциал митохондриальной мембраны и является ключевым индикатором жизнеспособности клетки. Измеряя потенциал митохондриальной мембраны, оценивают ее целостность и метаболическую активность.

Структурные, пространственные и генетические дефекты, которые лежат в основе нарушения способности митохондрий продуцировать АТФ, оказывают плеiotропное влияние на развитие преэмбриона и эмбриона на ранних стадиях. Такие аномалии проявляются в нарушении организации веретена деления и сегрегации хромосом, в сдвиге временных рамок клеточного цикла и в нарушении таких морфодинамических процессов, как компактизация, кавитация и хэтчинг бластоцисты. Митохондриальные дефекты могут стать причиной активации апоптоза или опосредованно участвовать в его активации, что также приводит к потере ооцитов и ранней гибели эмбрионов (Van Blerkom, 2004). Количество митохондрий и их расположение в клетке влияют не только на ооцит, но и на раннее развитие эмбриона (Van Blerkom et al., 2002; Fulka, 2004; Van

Blerkom, 2004). Так, количество митохондрий в эмбрионах, остановившихся в развитии, снижено (Reynier et al., 2001; Poulton and Marchington, 2002; Au et al., 2005). Значительное колебание содержания АТФ в клетке оказывает влияние на потенциал эмбриона к развитию (Van Blerkom et al., 1998; Reynier et al., 2001).

На протяжении оогенеза количество митохондрий в клетке стремительно увеличивается, составляя 10 митохондрий в ооците I порядка в примордиальном фолликуле до более 100 000 в зрелом ооците на стадии метафазы II преовуляторного фолликула (Reynier et al., 2001; Santos et al., 2006) (рис. 1.16). На момент овуляции общее количество митохондрий уменьшается на треть в связи с интенсивным процессом их слияния, митохондрии не дифференцированы и продуцируют малое количество АТФ (Van Blerkom, 2004).

Ооциты с большим количеством копий мтДНК ассоциируются с высокими показателями наступления оплодотворения (Spikings et al., 2006). Преждевременная остановка мейотического деления и отсутствие оплодотворения после стандартной программы IVF предположительно напрямую связаны с малым количеством мтДНК в ооцитах (от 20 000 до 60 000) (Reynier et al., 2001). Установлена значительная разница в количестве копий мтДНК между двухклеточными эмбрионами, которые остановились в развитии, и эмбрионами, продолжившими свое развитие (Reynier et al., 2001).

Распределение митохондрий в ооците по мере его созревания характеризуется определенными особенностями. Митохондрии в ооците первого порядка располагаются в перинуклеарном районе. Для митохондрий преовуляторного ооцита характерно опосредованное микротрубочками веретена деления перемещение в клетке, при этом нарушение расположения рассматриваемых органелл в клетке может негативно отражаться на сегрегации хромосом (Rawe et al., 2000; Cummins, 1991, 2001; Van Blerkom et al., 2002; Van Blerkom, 2004). В ооците на стадии метафазы II митохондрии распределяются по

периферии или по центру (Wilding et al., 2001). Непропорциональное распределение митохондрий во время первого деления может подавлять дальнейшее дробление, приводя к его остановке (Ebner et al., 2003a). С использованием лазерной сканирующей микроскопии и прижизненной флюоресцентной окраски клеток появилась возможность подтвердить связь распределения и активности митохондрий в клетке с качеством ооцита и эмбриона (Au et al., 2005; Thouas et al., 2006).

Нарушение функционирования митохондрий в результате различных факторов, среди которых следует назвать генетические аномалии, гипоксию, окислительный стресс, могут в значительной степени влиять на уровень выработки АТФ как в ооцитах, так и преэмбрионах и эмбрионах на первых стадиях развития, что приводит к аномальной сегрегации хромосом или остановке развития (Van Blerkom, 2004). Отмечают также снижение активности митохондрий в ооцитах с возрастом (Cummins, 2001; Wilding et al., 2001).

С помощью измерения уровня АТФ в зрелом ооците определяют потенциал клетки к дальнейшему развитию в случае ее оплодотворения. Между ооцитами существуют значительные различия в чистом содержании АТФ. Сниженное содержание АТФ не нарушает способности клетки к оплодотворению, но в дальнейшем может снижать темпы развития эмбриона. В кортах неоплодотворенных ооцитов человека на стадии метафазы II, полученных у женщин, проходящих процедуры IVF и GIFT, содержание АТФ в одинаковых на вид ооцитах может значительно варьировать (Van Blerkom, 2004).

Таким образом, нарушение функционирования митохондрий в ооцитах может быть одной из причин отсутствия имплантации эмбриона, что наблюдается в отдельных случаях при использовании ВРТ. В настоящее время рассматривается возможность применения инвазивной коррекции ооцитов путем донации митохондрий в ооциты реципиентки при дисфункции ооплазмы (Nagai et al., 2004; Van Blerkom, 2004).

4.3.3. Получение, обработка эякулята и оценка сперматозоидов. Инвазивные методы получения сперматозоидов и их незрелых форм

Тактика получения сперматозоидов для проведения программ ЭКО или ЭКО с ICSI определяется результатами спермограммы. Объем эякулята и уровень pH дают возможность оценить функционирование семенных пузырьков и предстательной железы. Концентрация, подвижность и морфология сперматозоидов в основном характеризуют функционирование яичек и в меньшей степени – пост-тестикулярных половых путей (в частности, придатка яичка) (Kruger et al., 1986, 1988). Показатель подвижности сперматозоидов позволяет оценить их фертильные качества, этот параметр напрямую зависит от морфологической зрелости клетки, ее функциональных резервов, наличия/отсутствия влияния аутоантител. Сперматозоиды с высокой скоростью прямолинейного движения и траекторией движения, близкой к прямолинейной, обладают высоким потенциалом к оплодотворению. Показатель концентрации высокоподвижных сперматозоидов и процент клеток с нормальной морфологией позволяют оценить фертильность пациента, а в дальнейшем выбрать при необходимости одну из программ ВРТ.

Согласно руководству ВОЗ по спермиологическим исследованиям эякулят фертильного мужчины содержит не менее 30% морфологически нормальных сперматозоидов (WHO, 1999). Остальные 70% могут составлять атипичные формы, среди которых встречаются формы с аномалиями головки, шеи, жгутика в различном количестве в соотношении. Многообразие морфологических типов сперматозоидов может включать не только различия в размерах и форме головки, акросомы, но и степень вакуолизации ядра, размер цитоплазматических капель, нарушение средней части и хвоста.

В большинстве клиник именно на показателях спермограммы основывается диагностика нарушения репродуктивной функции у мужчины. Вместе с тем, продолжается развитие и внедрение в медицинскую практику альтернативных методов, кото-

рые позволяют исследовать целостность и структуру ДНК сперматозоидов, а также центриолей, митохондрий. Выделяют следующие характеристики зрелого сперматозоида, наличие которых определяет его способность к оплодотворению:

- функционирование органелл в клетке;
- наличие стабильной ДНК, способной к деконденсации в процессе оплодотворения;
- присутствие акросомных ферментов, которые находятся в состоянии профермента до момента капацитации;
- наличие белков, необходимых для узнавания и связывания сперматозоида с зоной пеллюцида;
- наличие белков плазматической мембраны, которые защищают сперматозоиды от воздействия факторов, присутствующих в женских репродуктивных путях;
- функционирование метаболитов в клетке для обеспечения подвижности и поддержания мембранного потенциала, ионной среды, pH и других клеточных функций;
- способность сперматозоидов к беспрепятственному проникновению и продвижению по женским половым путям;
- готовность плазматической и акросомной мембран к реакции во время оплодотворения.

В зависимости от результатов спермиологического анализа для проведения программы ЭКО/ЭКО с ICSI используют как нативный, так и криоконсервированный эякулят супруга или донора. В случае отсутствия (например, при обструктивной азооспермии) или недостаточного количества сперматозоидов в эякуляте клетки могут быть извлечены непосредственно из семявыносящего протока, яичка, придатка яичка. Получение эякулята, биопсию яичка или придатка яичка с целью извлечения сперматозоидов производят в день осуществления аспирации ооцитов.

Перед проведением программы ЭКО/ЭКО с ICSI мужчине рекомендуют половое воздержание в течение 2-3 дней, получение эякулята осуществляется путем мастурбации. Эякулят помещают в маркированную стерильную емкость. При необходимости и по показаниям сперматозоиды могут быть заморожены для отсроченного ис-

пользования. Криоконсервирование позволяет сохранять сперматозоиды в течение длительного времени, после оттаивания все их свойства восстанавливаются.

Эякулят представляет собой студенистую массу беловатого цвета, щелочной реакции, имеющую специфический запах, и является смесью секрета яичек, предстательной, куперовских желез и семенных пузырьков, содержит сперматозоиды в среднем в количестве 200-500 млн. Объем эякулята варьирует и зависит от возраста, интенсивности половой жизни, питания и других факторов. Эякулят состоит из следующих компонентов: семенной жидкости, сперматозоидов, эпителиальных и иммунных клеток, клеточного дебриса, возможно также наличие вирусов, бактерий.

Лабораторная обработка эякулята в программах ЭКО/ЭКО с ICSI позволяет получить взвесь активно подвижных сперматозоидов в концентрации, необходимой для оплодотворения в условиях *in vitro* (Д.М. Морелл и П.В. Холмз, 2002). Для успешного проведения программы ЭКО необходимым условием является получение 5-15 млн сперматозоидов на 1 мл с подвижностью более 25%.

Обработка эякулята включает очистку сперматозоидов от семенной плазмы и получение фракции морфологически нормальных и наиболее подвижных клеток. В ходе развития вспомогательных репродуктивных технологий были предложены различные методы обработки эякулята для получения сперматозоидов и их использования в программах ВРТ. Так, с применением программы ЭКО появилась возможность оценивать связь между морфологическими показателями сперматозоидов и вероятностью оплодотворения в условиях *in vitro*, частотой наступления беременности. В связи с этим одним из направлений повышения эффективности программ ЭКО стала оптимизация методов, позволяющих выделить из эякулята фракцию прогрессивно подвижных сперматозоидов с наилучшими показателями морфологии и кинематики.

Процедура обработки полученных из эяку-

лята сперматозоидов занимает около двух часов. Образец эякулята в течение первого часа проходит процесс разжижения в термостате, по истечении которого проводится его обработка. Как нативные, так и замороженные-оттаянные сперматозоиды перед использованием отмывают от семенной плазмы.

Первым методом обработки эякулята, использованным в практике ВРТ, была процедура промывания, во время которой взвесь сперматозоидов растворяли в культуральной среде, а затем центрифугировали. Позднее были предложены технологии, основанные на центрифугировании эякулята в градиенте плотности. Наиболее распространенными методами обработки эякулята и подготовки сперматозоидов для ЭКО являются:

- центрифугирование-флотация, при которой полученный эякулят центрифугируют, осадок помещают в среду для обработки сперматозоидов, наиболее жизнеспособные сперматозоиды всплывают, их извлекают и используют в программе ВРТ, этот метод называют "всплыванием", или "всплытием" – "swim up";
- фракционирование эякулята в градиенте плотности – переосаждение сперматозоидов методом центрифугирования в градиенте плотности.

Центрифугирование-флотацию осуществляют следующим образом: среду для всплытия наслаивают на аликвоту уже разжиженного эякулята в центрифужной пробирке, которую переносят в термостат под углом 45° с последующим инкубированием в термостате в течение 1 ч при +37 °С, после чего отделяют около 1 мл суспензии и центрифугируют. Образованный в результате центрифугирования осадок из сперматозоидов ресуспендируют в культуральной среде. Указанную технологию обработки сперматозоидов впервые предложили А. Лопата и коллеги в 1976 г. (Lopata et al., 1976). Описанный метод позволяет отделить сперматозоиды от остального состава эякулята на основании их подвижности, однако в готовую взвесь попадают наряду с подвижными сперматозоидами и малоподвижные, а также сперматозоиды с морфологическими дефектами и даже бактерии.

Окончательный вариант метода центрифугирования в градиенте плотности был предложен в 1996 г., до этого в качестве коллоида использовали бычий и человеческий альбумин. Слои раствора градиента альбумина располагают в порядке возрастания концентрации альбумина от 7,5 до 17%. Эякулят промывают и центрифугируют один раз, а затем наносят слоем на поверхность альбумина. После инкубации на протяжении 30 мин при +37 °С слой эякулята удаляют. Градиенты альбумина инкубируют далее на протяжении 1 ч, а затем собирают 17-процентный слой, который содержит подвижные сперматозоиды. Этот слой промывают в культуральной среде, после чего ресуспендируют.

В конце 70-х гг. XX ст. альбумин заменили перколлом, при этом образец эякулята центрифугируют через градиент(-ы) для отделения подвижных сперматозоидов (Pertoft et al., 1978). В настоящее время используют среды, содержащие силикон-связанные частицы двуокиси кремния в HEPES-забуференном сбалансированном растворе солей, что позволяет поддерживать жизнеспособность сперматозоидов во время центрифугирования. Присутствие HEPES в качестве буфера оказывает антиоксидантное действие. В ходе обработки эякулят осторожно, не нарушая разделения слоев, наслаивают на градиент. Полученный после центрифугирования осадок со сперматозоидами визуализируется на дне конической пробирки. Верхний и большую часть нижних слоев градиента, а также эякулят осторожно убирают пастеровской пипеткой, а осадок переносят в новую порцию раствора. Метод центрифугирования в градиенте плотности позволяет фракционировать клеточные популяции в соответствии с их плотностью, "отсеивая" неподвижные, аномальные сперматозоиды и бактериальную микрофлору.

Применяют также комбинированный метод выделения фракции подвижных клеток, при использовании которого количество морфологически нормальных сперматозоидов увеличивается в среднем в 2,3 раза, пограничных сперматозоидов – в 1,6 раза, а суммарная доля нормальных и пограничных форм – в 2 раза (О.А. Леонтьева и О.А. Воробьева, 1999).

Не существует единого мнения о преимуществе одного метода над другим (Van der Zwahlen et al., 1991; Ng et al., 1992; Chen et al., 1995; Henkel and Schill, 2003). Согласно рандомизированному исследованию группы авторов, которые сравнили результаты программ внутриматочной инсеминации сперматозоидами, обработанными различными методами, частота наступления беременности одинакова (Dodson et al., 1998).

Полученные после обработки эякулята сперматозоиды сохраняют в термостате в культуральной среде до проведения процедуры инсеминации ооцитов в условиях *in vitro* в программе ЭКО или микроинъекции сперматозоида в программе ЭКО с ICSI. В рамках программы ЭКО с ICSI проводят оценку подвижности и морфологии сперматозоида, выбранного для инъекции, что позволяет избежать использования мужских половых клеток с нарушением морфологических и/или функциональных характеристик. В случае отсутствия сперматозоидов в эякуляте используют их незрелые формы – круглые и элонгированные сперматиды, а также ядра круглых сперматид (ROSI, ELSI, ROSNI, соответственно). Сперматиды получают с помощью инвазивных методов непосредственно из семявыносящего протока, яичка, придатка яичка (MESA, PESA, TESA, TESE). В связи с этим необходимо рассмотреть заключительный этап сперматогенеза – процесс созревания сперматозоидов (спермиогенез).

Процесс формирования характерных морфологических особенностей, присущих зрелому сперматозоиду, в том числе приобретение им подвижности, происходит именно во время спермиогенеза. Спермиогенез, или этап дифференцировки гаплоидных мужских половых клеток, является финальным этапом созревания сперматозоидов, во время которого круглые сперматиды, содержащие гаплоидный набор хромосом, трансформируются в подвижные сперматозоиды; деление клеток не происходит. Процесс спермиогенеза протекает в семенных канальцах при активном участии клеток Сертоли и включает серию последовательных морфологических, молекулярных и функциональных преобразова-

ний от наименее дифференцированных форм (круглые сперматиды) через формы промежуточной зрелости (элонгирующие сперматиды и элонгированные сперматиды) до зрелых сперматозоидов.

Окончанием спермиогенеза является потеря связи между созревающим сперматозоидом и клетками Сертоли. Этот процесс называется спермиацией и завершается высвобождением зрелых половых клеток в просвет канальцев. С этого момента поздние сперматиды называются сперматозоидами.

Согласно классификации стадий спермиогенеза, основанной на степени зрелости сперматид, круглые сперматиды до появления каких-либо признаков элонгации условно обозначают Sa, Sb и Sc – ранние сперматиды (промежуточная стадия зрелости) (De Kretser and Kerr, 1988). Элонгированные сперматиды, или поздние сперматиды, обозначают Sd. Большинство половых клеток с морфологическими признаками сперматозоидов, идентифицируемые в образцах биопсии яичка, составляют элонгированные сперматиды Sd.

В ходе спермиогенеза происходят изменения, затрагивающие как ядерный аппарат, так и цитоплазму клетки. Во время дифференциации клеток (процесс занимает приблизительно четыре недели) ДНК хромосом плотно упаковывается, объем ядра уменьшается примерно в 30 раз. Происходит компактизация хроматина за счет замещения гистонов протаминами. Постепенно ядро смещается к полюсу клетки и выдвигается из нее, образуя основу головки будущего сперматозоида, форма клетки меняется от круглой до более продолговатой. На стадии ранних сперматид возле ядра из аппарата Гольджи образуется акросома, которая вначале имеет вид мембранной гранулы, впоследствии прилегает к ядру и превращается в уплотненный пузырек, который в виде двойной шапочки окутывает переднюю часть ядра. Изменения происходят и с цитоплазмой, объем которой резко сокращается путем внутриклеточного распада и утилизации ее компонентов. Остатки цитоплазмы отшнуровываются в виде капли (так называемое резидуальное тельце), скапливаясь в

промежуточной области хвоста, в цитоплазме концентрируются рибосомы, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и другие органеллы. Небольшое количество цитоплазмы в виде тонкого слоя сохраняется перед акросомой в головке и вокруг аксонемы в хвосте. Следует отметить, что после окончания спермиогенеза в сперматозоидах белки не синтезируются вследствие отсутствия рибосом и эндоплазматической сети.

В ходе спермиогенеза формируются цитоплазматические структуры, характерные только для сперматозоидов: в поздних сперматиде с противоположной стороны ядра или головки из одной центриоли (дистальной) формируется длинный жгутик, образованный системой микротрубочек, которая включает девять пар периферических и одну пару центральных микротрубочек. Одновременно с формированием жгутика происходит процесс образования комплекса митохондрий, которые, выстраиваясь по спирали вокруг начального отдела аксонемы, образуют митохондриальный шар в промежуточной части (в теле) сперматозоида. Процесс спермиогенеза завершается формированием акросомы и приобретением клетками способности к движению.

Как известно, в сперматозоиде выделяют головку, среднюю часть, которая включает шею и тело сперматозоида, хвост, или жгутик, который заканчивается тонкой концевой нитью (**рис. 4.13**). Для зрелого сперматозоида характерно поступательное прямолинейное движение, благодаря которому происходит его восхождение по женским половым путям к ооциту.

Сперматозоид покрыт плазматической мембраной, которая представляет собой высокополяризованную и строго регионально организованную структуру. В состав мембраны входят следующие компоненты: фосфолипиды – 70%, нейтральные липиды – 25%, гликолипиды – 5% (сезинолипиды).

Головка сперматозоида имеет уплощенную грушевидную (овальную) форму, ее длина составляет около 6 мкм, ширина – 4 мкм в экваториальной плоскости; содер-

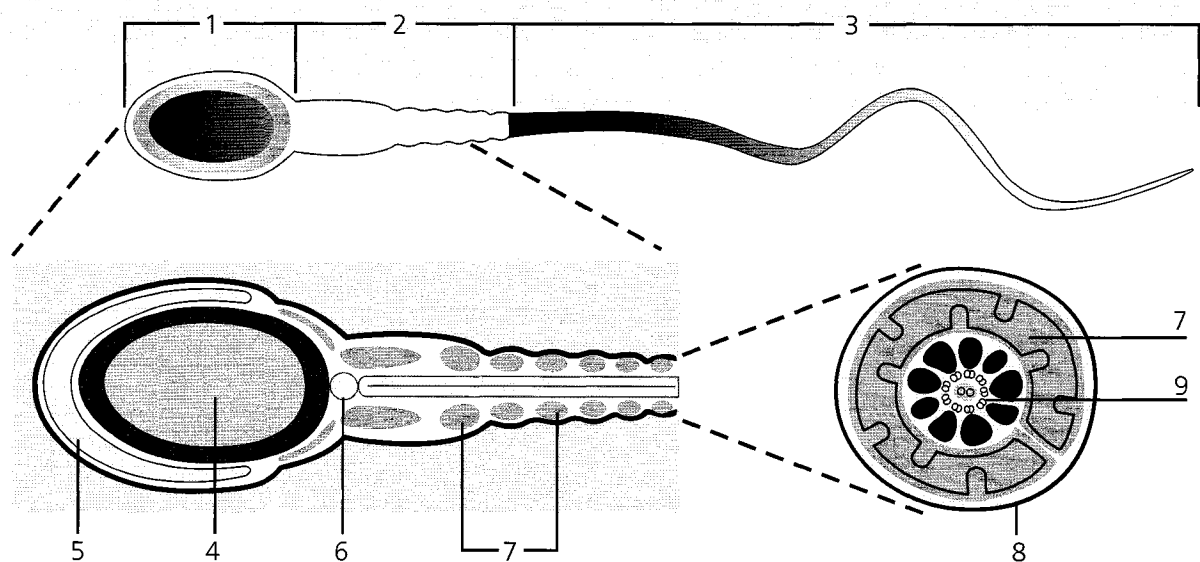


Рис. 4.13. Тонкое строение сперматозоида. Схема:

1 – головка; 2 – средняя часть (шея, промежуточный отдел); 3 – хвост; 4 – ядро; 5 – акросома; 6 – центриоли; 7 – митохондрии; 8 – поперечный срез сперматозоида в области промежуточной части, видны две центральные микротрубочки, а также пары радиальных микротрубочек; 9 – микротрубочки аксонемы.

жит ядро с гаплоидным набором хромосом и акросому. Последняя занимает 40-70% объема головки и расположена в виде шапочки на верхней ее половине, содержит белки, которые принимают участие в оплодотворении: способствуют проникновению сперматозоида в ооцит непосредственно перед оплодотворением. В некоторых случаях головка может быть слегка заострена в постакросомном районе.

Ядро зрелого сперматозоида имеет плохо различимую ядерную оболочку, хроматин значительно конденсирован и представляет собой однородную гиалиноподобную массу, ядрышки отсутствуют. Центромерные районы хромосом располагаются внутри ядра, а теломерные участки – по периферии.

Ядро характеризуется завершенными процессами элиминации РНК, замещения соматических гистонов протаминами, богатыми аргинином; наличием дисульфидных связей между протаминами. Именно эти особенности ядра позволяют сперматозоиду сохранять целостность вне организма и делают его устойчивым к неблагоприятным воздействиям внешней среды, в том числе повышению температуры и окислению. Плотная упаковка хроматина

и его стабильность обусловлены наличием в хроматине протаминов, богатых аргинином и цистеином, однако до 15% ДНК остается упакованной гистонами (Zini and Libman, 2006) (рис.4.14).

Ассоциация ядерной ДНК с гистонами приводит к менее плотной упаковке хроматина, именно эти последовательности ДНК вовлечены в процесс образования мужского пронуклеуса (О.А. Воробьева и др., 1998; Wykes and Krawetz, 2003; Seli and Sakkas, 2005; Zini and Libman, 2006). Участки ДНК, обогащенные гистонами, локализованы в теломерных районах хромосом и в ядре располагаются по периферии (Gineitis et al., 2000; Zini and Libman, 2006). Хроматин, богатый протаминами, размещен в центре ядра.

Процесс замещения гистонов протамином и процесс компактизации хроматина осуществляются во время спермиогенеза, в ходе которого нуклеосомные гистоны, присутствующие в сперматогониях, постепенно замещаются транзитными белками (TNP1 и TNP2) в круглых сперматиде, а в элонгированных сперматиде и сперматозоидах – протаминами (PRM1 и PRM2). Эти белки ответственны за организацию высококонденсированного хро-

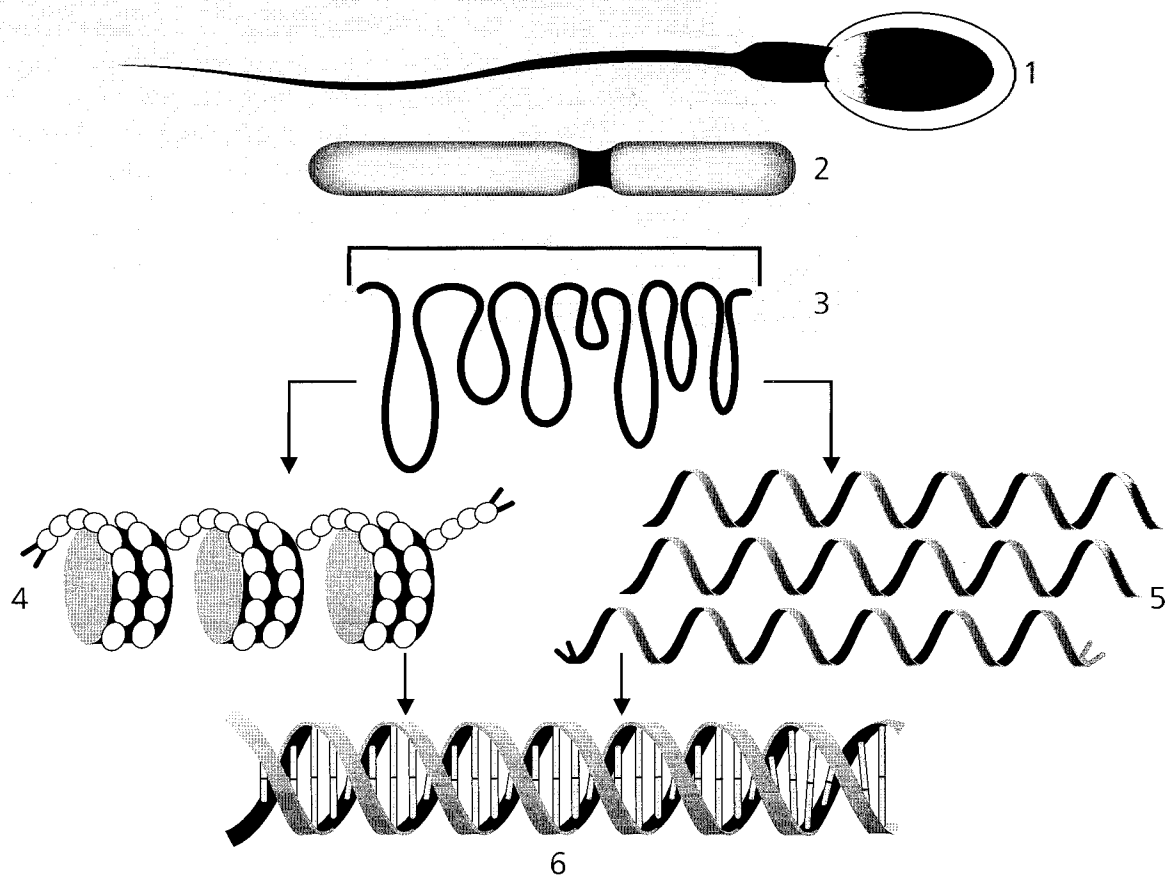


Рис. 4.14. Модель упаковки ДНК хроматина в сперматозоидах. Схема:
 1 – головка сперматозоида; 2 – хромосома; 3 – хроматин; 4 – гистоновый комплекс (<15%);
 5 – протаминовый комплекс (>85%); 6 – ДНК.

тина, что обуславливает отсутствие транскрипционной активности генома сперматозоида. Природа протаминов установлена. У человека различают протамины 1 (PRM1) и 2 (PRM2) и белок транзиции TNP2, кодирующие их гены объединены в кластер в участке p13.13 хромосомы 16 (Wykes and Krawetz, 2003). Гены, кодирующие протамины, экспрессируются в круглых сперматидях, после транскрипции в гаплоидных круглых сперматидях мРНК протаминов сохраняется в виде рибонуклеопротеинового комплекса до окончания трансляции в элонгированных сперматидях (Kramer and Krawetz, 1997). Таким образом, хроматин сперматозоида организован специфическим образом, отличным от такового в соматических клет-

ках (рис. 4.14).

Помимо преобразований ДНК, во время спермиогенеза происходят процессы, затрагивающие РНК. Как известно, для зрелого сперматозоида трансляция и транскрипция не характерны вследствие плотной упаковки хроматина, именно поэтому сперматозоиды часто называют "спящими" клетками. Благодаря внедрению высокочувствительных молекулярных методов стало возможным выявление специфической популяции РНК (Goodwin et al., 2000; Miller and Ostermeier, 2006; Zhao et al., 2006). Открытие РНК в сперматозоиде перевернуло представление ученых о функции мужской половой клетки. Если ранее считалось, что единственной функцией сперматозоида является перенос отцов-

ского генома в ооцит во время оплодотворения, то исследования последних лет показали, что сперматозоиды содержат ооцит-активирующий фактор (фосфолипазы из группы гидролитических ферментов), а также центросому, участвующую в образовании зиготы и последующем митотическом делении.

Несмотря на то, что активные процессы транскрипции и трансляции в сперматозоидах отсутствуют в связи с плотной упаковкой хроматина и заменой гистонов протаминами, ученые выявили сохранение низкого уровня транскрипции в зрелых сперматозоидах (Kramer and Krawetz, 1997; Miller and Ostermeier, 2006; Zhao et al., 2006). В сперматозоидах человека во время капацитации и акросомной реакции наблюдают транскрипционную и трансляционную активность, что также свидетельствует о наличии мРНК в зрелых сперматозоидах. Изучение роли РНК в функционировании сперматозоида продолжается, известно, что РНК транскрипты сперматозоидов играют важную роль в развитии мужских гамет, повторной упаковке хроматина (гераскагинг), геномном импринтинге и даже развитии зиготы (Miller and Ostermeier, 2006). Помимо ядерной ДНК, в сперматозоидах содержится мтДНК.

Акросома зрелого сперматозоида локализована между плазматической мембраной и ядром, имеет одинаковую толщину по всей протяженности (0,1 мкм), но утончается в каудальной части, известной как экваториальный сегмент, образуется из аппарата Гольджи во время спермиогенеза. В ранних сперматиде акросомный пузырек и гранула из внутренней части комплекса Гольджи постепенно приближаются к ядру сперматиды и прикрепляются к нему в участке, на котором произошли изменения ядерной оболочки. Этот контакт определяет передний, или краниальный, полюс ядра сперматиды (будущая верхушка зрелого сперматозоида). После прикрепления акросомный пузырек и гранула распределяются в виде шапочки на поверхности ядра, которое элонгируется на этапе начала конденсации хроматина. Акросома имеет свою мембрану, в которой выделяют три слоя: наружный, промежуточный и внутренний, прилегающий к ядру. В

последнем слое визуализируют инвагинационные трубочки, общее количество которых составляет 15. Акросома зрелого сперматозоида покрывает передние 2/3 поверхности ядра и представляет собой уплощенный мешочек, наполненный густым содержимым (акросомный матрикс), богатым гидролитическими ферментами (гиалуронидаза, протеаза). Внутри акросомы находится гранула, которая не имеет своей мембраны. Перечисленные ферменты задействованы в акросомной реакции, т. е. принимают участие в проникновении сперматозоида через оболочки ооцита во время оплодотворения (акрозин, гиалуронидаза, коллагеназа, кислая фосфатаза, трипсин и др.).

Средняя часть состоит из короткой шеи промежуточного отдела (тело сперматозоида); ее длина составляет 6-10 мкм, ширина – менее 1 мкм. В короткой шее сосредоточен клеточный центр – центросома, которая представляет собой участок цитоплазмы, окружающий пару центриолей. Как органелла клетки, центросома располагается возле ядра и является главным центром организации микротрубочек и регулятором течения клеточного цикла эукариот. Помимо участия в делении ядра, центросома играет важную роль в формировании жгутиков и ресничек: расположенные в ней центриоли выполняют функцию центров организации микротрубочек аксонем жгутиков.

Две центриоли, расположенные под прямым углом друг к другу, представляют собой цилиндрические структуры, каждая из которых состоит из девяти симметрично ориентированных троек микротрубочек 0,5 мкм в длину и 0,2 мкм в диаметре. Микротрубочки центриолей и фиброзное перичентриольное вещество содержат более 100 различных белков, среди которых наиболее изучены γ -тубулин комплексы (γ TuRC), непосредственно участвующие в нуклеации микротрубочек (Manandhar et al., 2005).

В круглых сперматиде присутствует интактная центросома, содержащая центриоли и белки центросомы. При последующем созревании половой клетки микротрубочки одной из центриолей – дисталь-

ной – удлиняются, формируя осевую нить (аксонему) хвоста сперматозоида, которая проходит вдоль всего жгутика. Происходит сокращение центросомы – число микротубулярных триплетов, расположенных в зрелом сперматозоиде, составляет 50% их общего количества, содержащегося в сперматиде (Manandhar et al., 2000, 2005).

Роль каждой из центриолей сперматозоида является строго специфичной: доминантная формирует после оплодотворения астросферу сперматозоида и первое митотическое веретено во время эмбриогенеза, дистальная центриоль формирует аксонему сперматозоида.

Центросома сперматозоида – структура, ответственная за организацию первого митотического деления эмбрионов человека (Palermo et al., 1994, 1997; Terada, 2004). Иммунофлюоресцентное окрашивание микротрубочек веретена деления в зиготах подтвердило отцовское происхождение центросомы в эмбрионе (Simerly et al., 1995; Moomjy et al., 1999). При оплодотворении центросома сперматозоида играет важную роль в каскаде событий, во время которых формируются центр и микротрубочки веретена деления, необходимые для пронуклеарного движения и объединения мужского и женского геномов. Центриоли зрелого сперматозоида обеспечивают в случае оплодотворения митотическое деление во время дробления эмбриона. Если бы центросомы обеих гамет оставались функциональными, зигота вступала бы в первое митотическое деление с двумя наборами центросом и четырьмя центриолями, следствием чего было бы образование аномального многополюсного веретена и, соответственно, анеуплоидии или мозаицизма. Такие явления наблюдают в случае диспермии даже при устранении мужского пронуклеуса. Центросома одной из гамет "выключается" во избежание подобного аномального развития. У большинства биологических видов именно сперматозоид при слиянии гамет привносит функциональную центросому.

Несмотря на то, что центросома была впервые обнаружена Т. Бовери еще в 1888 г.,

вопрос о ее структуре, процессе репликации и механизме участия в клеточном цикле до сих пор остается открытым. Независимость дупликации центросомы от ядра позволяет предположить возможность действия механизма саморепликации, который присутствует у таких органелл, как митохондрии и хлоропласты. Исследователей волнует вопрос о том, являются ли нуклеиновые кислоты компонентом центросомы. Поскольку данные, полученные с использованием разных методов окрашивания ДНК и РНК, свидетельствуют о том, что ДНК в центросоме отсутствует, большинство ученых считают, что в центросоме присутствует РНК. Тем не менее, требуются дополнительные исследования, которые позволят с точностью идентифицировать присутствие РНК в центросоме и определить ее роль в центросомной репликации.

В средней части сперматозоида выделяют также тело сперматозоида, которое расширено за счет содержащегося в нем митохондриального комплекса – митохондриальная капсула (рис. 4.13). Митохондрии (в среднем 50-75) собраны в спираль (11-15 витков) вокруг аксонемы жгутика. Для сперматид характерно кластерное расположение митохондрий. Помимо митохондрий, в средней части клетки может быть видна цитоплазматическая капля (остаток цитоплазмы сперматиды), размер которой в нормальном сперматозоиде не превышает половины объема головки. Именно такие сперматозоиды составляют большую часть клеточной популяции эякулята.

Окислительные и дыхательные процессы осуществляются с помощью митохондрий, которые являются источником энергии, обеспечивая сократительные движения жгутика, а следовательно, и подвижность всего сперматозоида. Как известно, после эякуляции сперматозоиды находятся в непрерывном движении, поэтому потребность в энергии у них чрезвычайно велика. Нарушение дыхательной функции митохондрий может вызывать снижение подвижности сперматозоидов, а впоследствии – бесплодие. Таким образом, подвижность сперматозоидов связана с количеством митохондрий в средней части

сперматозоида, а любые генетические нарушения мтДНК приводят к снижению подвижности мужских половых клеток.

Именно за счет митохондриальной капсулы, образованной дисульфидными мостиками между цистеином и пролин-богатыми белками, митохондрии в сперматозоиде устойчивы к внешним воздействиям и обладают сопротивляемостью к гипоосмотической среде. Один из белков, входящих в состав митохондриальной капсулы, именуемый фосфолипид гидропероксид-глутатионпероксидазой (PHGPx), выполняет антиокислительную функцию во время сперматогенеза, а в зрелом сперматозоиде участвует в формировании митохондриальной капсулы.

В сперматозоидах мтДНК находится в активном состоянии и представляет собой маленькую кольцевую ДНК (Cummins et al., 1998). Во время спермиогенеза происходит интенсивное сокращение количества мтДНК, в результате чего остается лишь десятая часть их первоначальной численности. Снижение количества мтДНК происходит во время превращения круглых сперматид в элонгированные формы и сопровождается уменьшением количества цитоплазмы. На молекулярном уровне сокращение содержания мтДНК происходит вследствие "выключения" кодированного ядром митохондриального транскрипционного фактора А (TFAM), который является основным фактором, контролирующим численность копий мтДНК. Резкое снижение содержания мтДНК вместе с действием специфического убиквитин-опосредованного механизма разрушения отцовских митохондрий в раннем эмбриогенезе объясняет отсутствие наследования отцовских мтДНК. Как известно, к митохондриям сперматозоидов присоединяется белок убиквитин, который маркирует отцовские митохондрии таким образом, что в случае оплодотворения эмбрион до восьмиклеточной стадии избавляется от них. Тем не менее, в отдельных случаях отцовские мтДНК могут быть выявлены в эмбрионах человека на стадии бластоцисты, это позволяет предположить, что отцовские мтДНК способны избегать элиминации, негативно влияя на здоровье будущего ребенка, при этом возможен как немед-

ленный, так и отдаленный эффект.

Наличие двигательного аппарата, который представляет собой специализированный клеточный органоид – жгутик, обеспечивает подвижность зрелого сперматозоида. Движение сперматозоида осуществляется с помощью равномерных ударов хвоста путем вращения вокруг своей оси по направлению часовой стрелки. В норме сперматозоид движется против тока жидкости, что и позволяет ему передвигаться вверх по женскому половому тракту до встречи с ооцитом со скоростью 2-3 мм/мин. Жгутик состоит из аксонемы и добавочных парааксонемных структур, его длина составляет примерно 50 мкм, диаметр – 0,4-0,5 мкм. Двигательной основой жгутика является аксонема, которая берет начало в дистальной центриоли шейки сперматозоида. Аксонема организована по универсальной схеме, свойственной большинству типов ресничек и жгутиков эукариот, и состоит из центральной пары микротрубочек и девяти периферических пар (дуплетов) микротрубочек, расположенных по окружности (рис. 4.13). Только одна микротрубочка каждого дуплета имеет законченное строение и содержит 13 протофиламентов, вторая микротрубочка каждого дуплета состоит из 11 протофиламентов. В состав обеих микротрубочек входит димерный белок тубулин, при помощи которого происходит гидролиз молекул АТФ и преобразование химической энергии в механическую, обеспечивающую подвижность сперматозоида. От каждого периферического дуплета микротрубочек на разных его уровнях по направлению к соседнему дуплету отходят две так называемые "ручки", состоящие из белка динеина, а по направлению к двум центральным микротрубочкам отходят радиальные мостики.

Микротрубочки взаимодействуют таким образом, что происходит скольжение соседних дуплетов друг относительно друга, что приводит к биению хвоста. Плазматическая мембрана (плазмолемма) хвоста сперматозоида, как и мембрана нервных клеток, способна к проведению возбуждения, которое инициируется ацетилхолином, вырабатываемым в самом жгутике. Ацетилхолин действует на рецепторы, расположенные в мембране, чем обусловлено

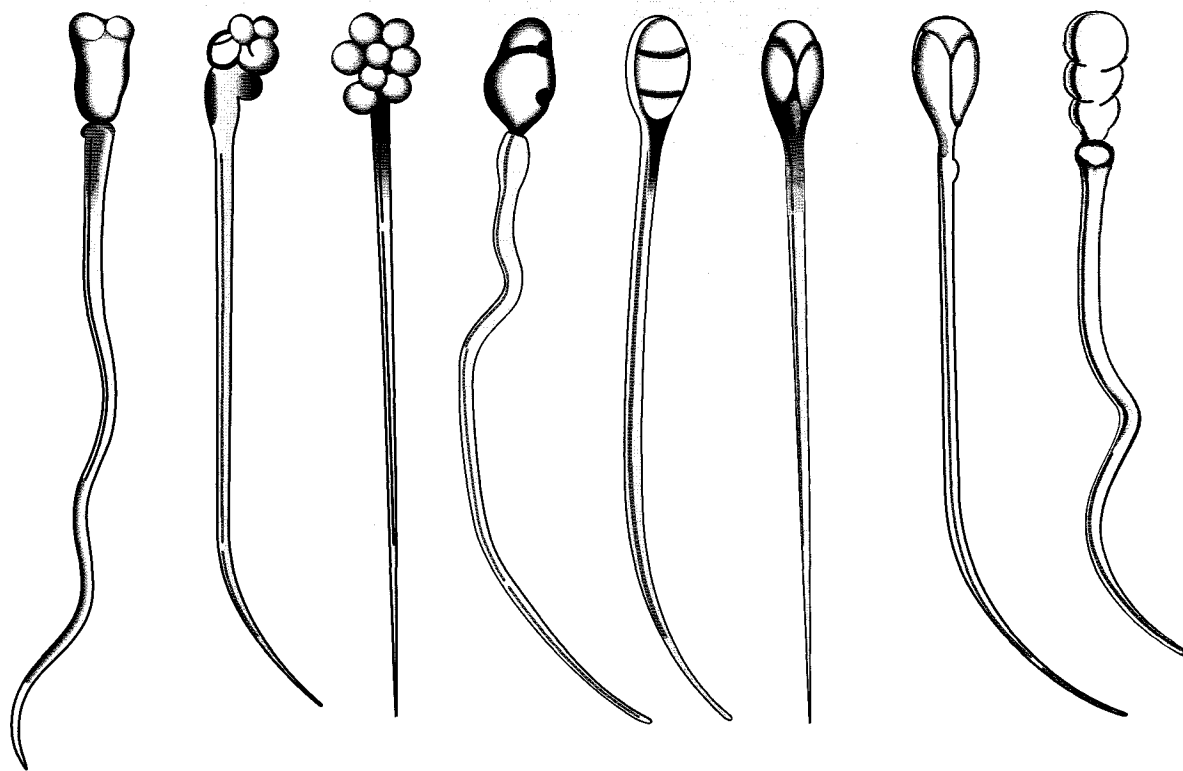


Рис. 4.15. Первые рисунки сперматозоидов, выполненные Левенгуком (цит. по Chemes and Rawe, 2003)

резкое повышение проницаемости для ионов натрия и кальция, что и представляет собой возбуждение мембраны. С мембраной связана также система протеинкиназ, с помощью которой возбуждение мембраны вызывает скольжение микротрубочек аксонемы, что приводит к биению хвоста.

В основе деления жгутика на средний, основной и концевой отделы лежат особенности строения парааксонемных структур. В среднем отделе аксонема окружена слоем из девяти дополнительных фибрилл (9+9+2), снаружи от которых по спирали расположены митохондрии. В основном отделе морфологически нормального жгутика дополнительные фибриллы заменены фиброзным слоем, тогда как в концевом отделе остается только аксонема, а фиброзный слой исчезает. Фиброзный слой окружает аксонему сплошным кольцом, слегка утолщенным в двух участках, обра-

зая экзоскелет жгутика. Первоначально на модельных системах (мышь), а затем у человека был изучен белковый состав фиброзного слоя, выделены и определены белки семейства АКАР: АКАР4, АКАР3 и ТАКАР80 (Carrera et al., 1994; Turner et al., 1998; Mandal et al., 1999; Eddy et al., 2003). Белки АКАР3 и АКАР4 содержатся в наибольшем количестве. Функция этих белков заключается в присоединении цАМФ-зависимой протеинкиназы А к фиброзному слою посредством регуляторной субъединицы киназы.

Ознакомившись с ультраструктурным строением зрелого сперматозоида, перейдем к морфологическим и функциональным anomalies мужских половых клеток, которые встречаются при проведении оценки сперматозоидов в программах ЭКО и ЭКО с ICSI.

Следует отметить, что морфологическая неоднородность сперматозоидов была

описана задолго до установления роли аномальных показателей спермограммы в нарушении репродуктивной функции у мужчины. Впервые сперматозоиды были описаны в XVII ст. А. Левенгуком в семенной жидкости человека и животных. В своем письме Королевскому научному обществу Великобритании в 1677 г. ученый с точностью отобразил основные морфологические особенности сперматозоидов и показал их неоднородность, по сути, впервые описав тератозооспермию (**рис. 4.15**).

В течение XVIII-XIX ст. была доказана роль сперматозоидов в процессе оплодотворения. На протяжении XX ст. накапливались данные о различных морфологических аномалиях сперматозоидов, была обнаружена взаимосвязь между аномальными показателями спермограммы и мужским бесплодием и предложена терминология для обозначения различных патологических состояний эякулята (тератозооспермия, астенозооспермия, некрозооспермия и др.).

Современные биохимические и молекулярные технологии, а также электронное микроскопирование позволяют не только проводить оценку морфологических характеристик клеток, но и анализировать их субмикроскопическую структуру, выявлять функциональные нарушения (Е.Е. Брагина и др., 2000; В.С. Петрищев и А.М. Щелочков, 2002; Guzick et al., 2001) (**фото 4.4**).

Традиционно при анализе морфологии сперматозоидов первостепенное внимание уделяют патологиям головки, затем шеи и промежуточного отдела и в последнюю очередь – хвоста. Среди морфологических аномалий сперматозоидов выделяют дефекты головки, шеи и средней части, хвоста, а также отмечают незрелые формы (наличие у основания головки цитоплазматической капли, объем которой составляет более 30% размера нормальной головки) (**рис. 4.16**).

У морфологически аномальных мужских половых клеток может быть нарушена реакция гиперактивации при капацитации, акросомная реакция. В таких клетках чаще выявляют аномалии хроматина, а при не-

которых морфологических отклонениях головки наблюдают повышение уровня хромосомных aberrаций. Наличие аномальных показателей спермограммы и морфологических отклонений сперматозоидов может быть причиной отсутствия оплодотворения, аномального развития эмбриона и отсутствия беременности.

Аномальные морфологические показатели сперматозоидов не отражают клеточной природы функциональной компетентности, за исключением видимых нарушений акросомы. Только ультраструктурная оценка тератозооспермии совместно с иммуоцитохимическим исследованием и молекулярным анализом позволяет установить и охарактеризовать в каждом конкретном случае природу патологического состояния сперматозоидов. Согласно существующей концепции патологии сперматозоидов отклонения спермограммы условно делят на две основные группы (Chemes and Rawe, 2003). Первая (наиболее часто встречающаяся группа) – сочетание различных отклонений в спермограмме. Вторая группа – наличие определенной, характерной аномалии (системные аномалии) у большого количества сперматозоидов. Для системных нарушений характерно семейное накопление и генетическое происхождение.

Развитие ВРТ, а особенно технологии ICSI, позволило проводить детальное исследование подвижности и морфологии каждого сперматозоида, используемого для микроинъекции. Строгие морфологические критерии позволяют прогнозировать способность сперматозоидов, применяемых во вспомогательной репродукции, к оплодотворению. Поскольку в основе аномальных показателей спермограммы могут лежать генетические факторы, их следует учитывать при прогнозе исхода программы ВРТ. Несмотря на успехи применения в программе ЭКО с ICSI незрелых половых клеток, необходимо проведение тщательной оценки таких клеток не только на основе морфологических критериев, но также функциональных. Остановимся на морфологических и функциональных нарушениях каждого из структурных компонентов сперматозоида, начиная с головки (**рис. 4.16**).

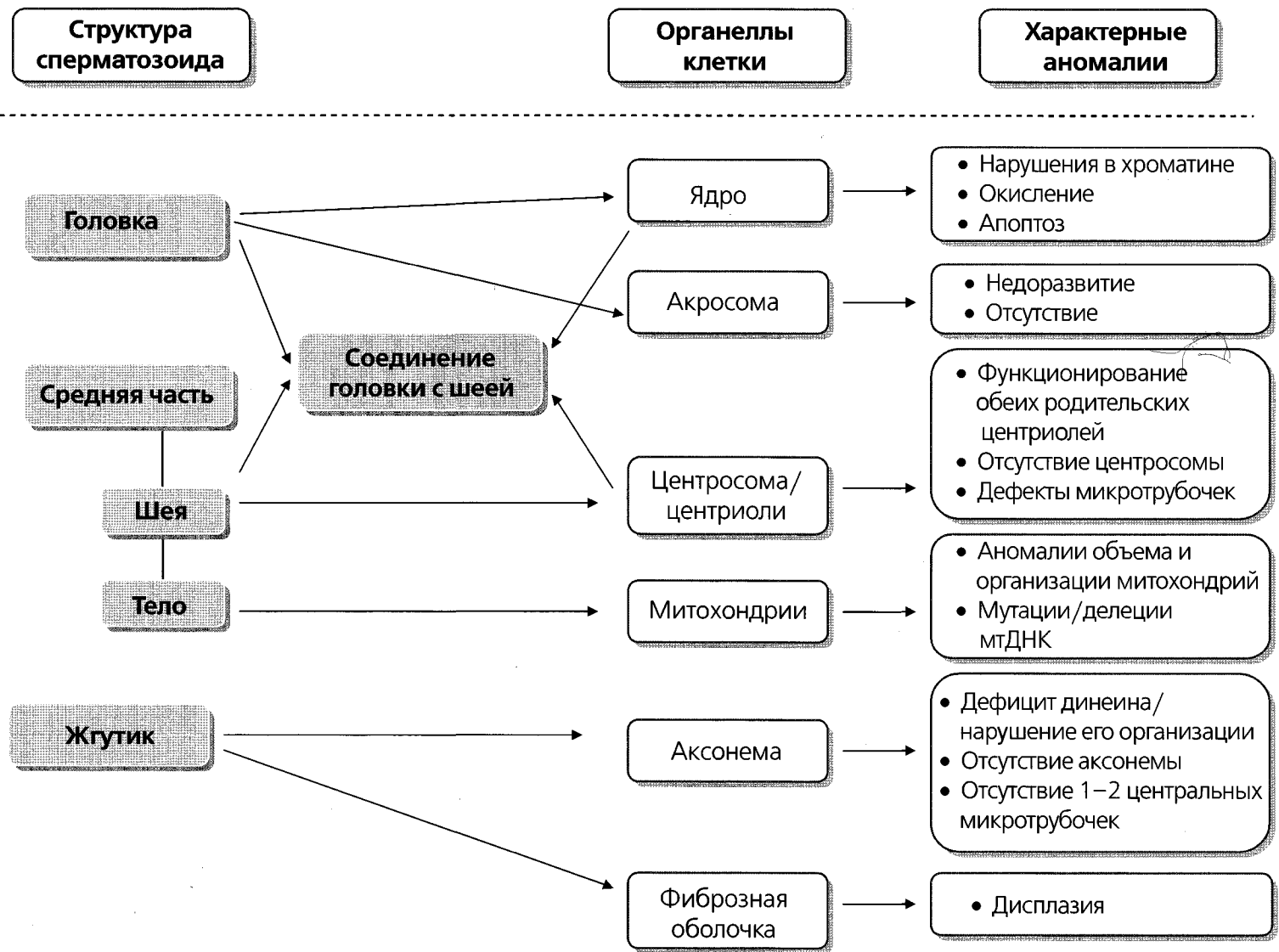


Рис. 4.16. Характерные аномалии сперматозоидов

Оценка целостности ядерной ДНК сперматозоида может служить дополнительным показателем потенциала мужской фертильности (Cummins et al., 1994; Zini et al., 2001; Lewis et al., 2004; Seli and Sakkas, 2005). Под нарушением целостности ядерной ДНК сперматозоида подразумевают фрагментацию ДНК и нарушение упаковки (компактизации) хроматина в ядре. Причины, ведущие к нарушениям ДНК в сперматозоидах, до конца не изучены. По-видимому, наиболее часто эти аномалии обусловлены не наследственными факторами, а нарушением сперматогенеза в результате патологических процессов или неблагоприятных воздействий факторов окружающей среды.

Среди первых методов оценки состояния хроматина сперматозоида было электронное микрофотографирование, которое позволяет визуализировать "незрелый хроматин" – грубо гранулированное ядро, характерное для сперматид на стадии удлинения ядер. Помимо электронного микрофотографирования, разработан ряд методов, позволяющих оценить функциональное состояние ДНК и хроматина в сперматозоидах (тесты на выявление нарушений организации хроматина в сперматозоидах): анализ структуры хроматина сперматозоидов (SCSA), анализ белкового состава ядра, анализ Comet (гель-электрофорез одной клетки), анализ TUNEL (мечение концов фрагментированных ДНК), анализ окисления ДНК, полимеразная цепная реакция. Следует отметить, что параметры анализа структуры хроматина сперматозоидов не всегда коррелируют с показателями спермограммы. Анализ SCSA можно использовать в качестве независимого фактора прогноза состояния репродуктивной системы у мужчины, помимо методов, рекомендованных ВОЗ, этот метод эффективен в программах внутриматочной инсеминации, ЭКО и ЭКО с ICSI (Evenson et al., 1999; Larson et al., 2000; Spano et al., 2000; Voe-Hansen et al., 2006).

Оценить степень повреждения ДНК сперматозоида можно напрямую (такие нарушения, как фрагментация, окисление) или косвенно (компактизация хроматина сперматозоида). Прямую оценку степени

нарушения организации хроматина сперматозоида проводят посредством анализов Comet и TUNEL, жидкостной хроматографии, которая позволяет измерить степень окисления ДНК. Косвенную оценку повреждения ДНК сперматозоидов осуществляют с помощью различных методов анализа целостности хроматина сперматозоидов и путем оценки уровня содержания ядерных белков. Целостность хроматина анализируют после окрашивания ДНК (с помощью акридинового оранжевого выявляют денатурированные или однонитевые ДНК), протаминов (окрашивание хромомиицином), гистонов (анилиновым синим и толуидиновым синим) (Bianchi et al., 1993). Фрагментацию ДНК оценивают методом SCSA и фиксируют с помощью так называемого индекса фрагментации ДНК. Анализ структуры хроматина сперматозоида предполагает также использование проточной цитометрии для оценки количества сперматозоидов с денатурированной ДНК.

Аномалии организации хроматина в сперматозоидах влияют на начальные этапы развития эмбрионов и частоту наступления беременности в программах ЭКО или ЭКО с ICSI (Sun et al., 1997; Esterhuizen et al., 2000; Morris et al., 2002; Lewis et al., 2004). При наличии фрагментации ДНК у мужчин наблюдают субфертильность и бесплодие в 27 и 40%, соответственно (Evenson et al., 1999; Larson et al., 2000; Spano et al., 2000; Voe-Hansen et al., 2006). Однако благодаря технологии ICSI даже при наличии индекса фрагментации ДНК более 40% стало возможным наступление беременности и рождение здорового ребенка (Gandini et al., 2004; Voe-Hansen et al., 2006).

У мужчин с бесплодием аномалии хроматина встречаются чаще, чем в контрольной группе здоровых мужчин, имеющих детей, и группе доноров (Sakkas et al., 1996; Zini et al., 2001; Lewis et al., 2004). При идиопатическом бесплодии также выявляют сниженную конденсацию хроматина сперматозоидов, обусловленную нарушением соотношения протаминов к гистонам в составе хроматина (Е.Е. Брагина и др., 2004; Nijs et al., 1996; Sakkas et al., 2004). Избыток ядерных гистонов (более

15%) приводит к снижению степени компактизации хроматина и повышению чувствительности к внешним факторам (Steger et al., 2000; Oliva, 2006; Zini and Libman, 2006). Примерно у 5-15% бесплодных мужчин наблюдают полное отсутствие протаминов (Carrell and Liu, 2001; Oliva, 2006; Zini and Libman, 2006). Повреждение ДНК сперматозоидов в связи с отсутствием протаминов может возникать в результате нарушения спермиогенеза (Sakkas et al., 1999). Как показывают результаты исследований на лабораторных животных с индуцированным дефицитом протаминов, существует связь между сниженным количеством протаминов, повреждением ДНК сперматозоидов и нарушением их способности к оплодотворению в условиях *in vitro* (Cho et al., 2003; Zini and Libman, 2006). Повышенный уровень повреждения ДНК сперматозоидов отмечают у мужчин старшей возрастной группы, у мужчин с нарушением процесса сперматогенеза, а также лейкоспермией.

Взаимосвязь между наличием фрагментированной ядерной ДНК в сперматозоидах и исходом применения программы ЭКО с ICSI изучается (Lewis et al., 2004). Наличие в эякуляте сперматозоидов с фрагментацией ДНК оказывает влияние на частоту оплодотворения и имплантации эмбрионов (Benchaib et al., 2003; Fernandez et al., 2005). Отдельные исследователи не выявляют связи между повреждением ДНК сперматозоидов и результатами программ ЭКО и ЭКО с ICSI (Zini and Libman, 2006). Предположительно причиной этому является тот факт, что в случае оплодотворения все события до четырехклеточной стадии эмбриона контролируются материнской ДНК.

Окислительные процессы привлекают особое внимание исследователей в связи с их важной ролью в физиологии и патологии репродуктивной функции человека. Подобно всем другим клеткам, живущим в аэробных условиях, сперматозоиды продуцируют активные формы кислорода (ROS). Сперматозоиды и семенная жидкость содержат целый ряд утилизаторов ROS (супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу), а также ряд веществ, обладающих активностью

супероксиддисмутазы или каталазы, таких как α -токоферол, аскорбиновая кислота, глутатион, пируват, таурин и альбумин.

При отсутствии четкого баланса между продуцированием и утилизацией активных форм кислорода, а также точной координации времени их продуцирования нормальное функционирование сперматозоидов нарушается. Высокая концентрация активных форм кислорода, продуцируемых самими сперматозоидами, индуцирует токсичное перекисное окисление липидов, в результате чего нарушается жизнеспособность мужских гамет. Избыточное продуцирование ROS может быть одной из причин мужского бесплодия. Спонтанная гиперактивация сперматозоидов наблюдается в 18% образцов пациентов, показатели спермограммы которых рассматриваются как нормальные в соответствии с критериями ВОЗ (De Lamirande et al., 1997). У этих пациентов способность к утилизации активных форм кислорода в семенной жидкости и сперматозоидах на 37 и 40% ниже по сравнению с аналогичными показателями у здоровых мужчин. Такая спонтанная гиперактивация способна нарушить транспорт сперматозоидов и привести к преждевременной капацитации. Наблюдают также сниженное содержание ROS, что вызывает обратимое снижение подвижности сперматозоидов вследствие истощения внутриклеточного содержания АТФ и недостаточного фосфорилирования белка аксонемы (Agarwal et al., 2003). Таким образом, активные формы кислорода выступают одной из причин повреждения ДНК сперматозоидов.

Известен еще один фактор, вызывающий повреждение ДНК сперматозоидов, – апоптоз. Во время сперматогенеза вследствие апоптоза погибает до 75% потенциальных сперматозоидов. Селективный апоптоз незрелых половых клеток предупреждает избыточную пролиферацию и селективно устраняет аномальные формы сперматозоидов. Одним из следствий процесса апоптоза является наличие разрывов нитей ДНК в сперматозоидах, что отмечают менее чем в 5% половых клеток здорового мужчины. Повышенный уро-

вень разрывов нитей ядерных ДНК выявляют в тестикулярных половых клетках и сперматозоидах из эякулята мужчин с аномальными параметрами спермограммы. В то же время, описаны случаи наличия аномальной структуры хроматина сперматозоидов при нормальных показателях спермограммы (Evenson and Jost, 2000; Seli and Sakkas, 2005). С возрастом, а также под влиянием токсических препаратов (например, при лечении онкозаболеваний) уровень апоптоза половых клеток в яичках снижается – в эякуляте содержится повышенное количество сперматозоидов с поврежденной ДНК (Brinkworth and Nieschlag, 2000; Singh et al., 2003; Zini and Libman, 2006).

При аномалиях акросомы наблюдают характерную круглую форму головки сперматозоида. Описаны два типа аномалий акросомы, наличие которых обуславливает нарушение репродуктивной функции у мужчины, – отсутствие акросомы и ее неполное развитие (Schill, 1991). При оценке морфологических особенностей сперматозоидов отсутствие акросомы (глобозоспермия) в большинстве случаев визуализируется в виде специфической круглой формы головки сперматозоида. Однако не у всех сперматозоидов, лишенных акросомы, головка имеет круглую форму, поэтому более целесообразно называть такое состояние аплазией или агенезией акросомы. Акросомная гипоплазия характеризуется маленькой и самостоятельно расположенной акросомой. Иммуногистохимические исследования позволяют выявлять наличие/отсутствие акросомных белков. Для сперматозоидов с отсутствием акросомы характерен недостаточно конденсированный хроматин, что обусловлено нарушением замещения гистонов протаминами и повышенным уровнем фрагментации ДНК.

Исследования образцов биопсии яичка способствовали определению морфогенеза этой аномалии. На очень раннем этапе спермиогенеза отмечают нарушение прикрепления аппарата Гольджи к ядру, что совпадает с неадекватной секреторной активностью и аномальным развитием акросомной гранулы. Формирующаяся акросома не распространяется по поверх-

ности ядра. Отсутствие акросомы ассоциируется с аномалиями перинуклеарной теки, субакросомной структуры головки сперматозоида, которая содержит различные белки, участвующие в изменениях формы головки, стыковке акросомы с ядром и активации ооцита после оплодотворения. Ультраструктурные и иммуноцитохимические исследования сперматозоидов, лишенных акросомы, демонстрируют отсутствие перинуклеарной теки и калицина (основного белка перинуклеарной теки). Эти аномалии, очевидно, объясняют aberrантное моделирование головки во время спермиогенеза и нарушение активации ооцита после микроинъекции в него лишенного акросомы сперматозоида.

Как известно, роль акросомы при естественном зачатии заключается в осуществлении пенетрации сперматозоида в оболочки ооцита. При использовании ВРТ, а именно во время проведения микроинъекции сперматозоида в ооцит, была отмечена опасность негативного влияния акросомы на ооцит. Ученые предполагают, что ферменты, содержащиеся в акросоме (акрозин и гиалуронидаза), могут быть губительными для ооцита (Morozumi and Yanagimachi, 2005). Цитоплазма ооцитов у некоторых женщин с нарушением репродуктивной функции является чрезвычайно чувствительной к повреждениям, вызываемым экзогенными ферментами гидролиза. В таких случаях проведение ICSI может способствовать аномальному развитию или даже гибели эмбрионов. Предупредить такой исход возможно благодаря предварительной строгой селекции сперматозоидов (с использованием параметров качества), а также устранению акросомы с помощью растворения оболочки сперматозоида, после чего следует тщательная промывка и немедленное выполнение ICSI. Таким образом, устранение акросомы перед проведением ICSI может повысить эффективность данной технологии. Во время проведения такой манипуляции важным моментом является сохранение целостности ядра сперматозоида.

Соединительный участок между головкой сперматозоида и его шейей содержит центросому с парой центриолей. Во вре-

мя спермиогенеза жгутик сперматозоида образуется из дистальной центриоли, которая приближается к ядру и прикрепляется к его каудальному полюсу, обеспечивая расположение по одной линии хвоста с продольной осью головки. Ультраструктурные исследования зрелого сперматозоида позволяют наблюдать конфигурацию хвоста с правильно структурированной проксимальной центриолью и другими элементами соединительного участка, окруженного цитоплазматической каплей различного размера.

Аномалии соединения головки с шейкой включают разную степень нарушения взаимосвязи между этими двумя структурами. Нарушения взаимосвязи между головкой и шейкой сперматозоида могут быть результатом дисфункции проксимальной центриоли сперматозоида, которой не удается мигрировать к каудальному полюсу ядра сперматиды. Сперматозоиды, лишенные головки, развиваются в результате аномалии присоединения зачатка центриоли-хвоста к ядру сперматиды: головка и хвост развиваются независимо друг от друга и разъединяются в момент спермиации, при этом головка обычно подвергается фагоцитозу клетками Сертоли.

Первые сообщения об "обезглавленных" сперматозоидах датируются 1979-1981 гг. (Le Lannou, 1979; Perotti et al., 1981; Vaccetti et al., 1984). Для обозначения сперматозоидов с отсутствием головки было предложено понятие "ацефалические сперматозоиды" (Holstein et al., 1986; Chemes et al., 1987, 1999; Vaccetti et al., 1989; Toyama et al., 2000). У некоторых мужчин с тератозооспермией 90-100% популяции сперматозоидов составляют сперматозоиды с отсутствием головки, которые заканчиваются краниально в нормальной средней части или в глобулярных цитоплазматических каплях (1-5 мкм в диаметре). Такие капли можно ошибочно принять за головку сперматозоида, однако хроматин в этих клетках отсутствует. Помимо обезглавленных сперматозоидов, в эякуляте этих пациентов часто наблюдают сперматозоиды без жгутика, при этом их количество может различаться. Отмечают также наличие в эякуляте как сперматозоидов, лишенных головки, так и

других аномальных форм, в том числе сперматозоидов, у которых головки аномально имплантированы в среднюю часть. Возможны случаи повышенной ломкости участка соединения головки с хвостом (Chemes et al., 1999; Kamal et al., 1999). В основе возникновения нарушений соединения головки с шейкой сперматозоида могут лежать генетические факторы, которые требуют дальнейшего исследования.

Помимо нарушений в ядре сперматозоида, ученые выявляют аномалии клеточных органелл шейки и тела сперматозоида, а именно центросомы и митохондрий. Нарушение функционирования центросомы может быть причиной отсутствия оплодотворения (Van Blerkom, 1996; Rawe et al., 2002). Повышенная частота аномалий центриолей и даже их отсутствие выявляют в неподвижных сперматозоидах, сперматозоидах с непоступательной подвижностью, а также с аномальной формой головки (Sathananthan, 1994; Schatten, 1994; Palermo et al., 1997; Terada, 2004). Для большинства эмбрионов, полученных в результате оплодотворения в программе ЭКО с ICSI сперматозоидами с аномальной морфологией и нарушенной подвижностью, характерно низкое качество, а также хаотическое деление. Известны отдельные случаи наступления беременности у супружеских пар, сперматозоиды супруга в которых характеризуются аномальной подвижностью, нарушением морфологии, но нормальной концентрацией в эякуляте (Emery et al., 2004). Электронная микроскопия фиксирует хаотическое расположение микротрубочек и отсутствие центросомы в сперматозоидах с аномальными морфологией и подвижностью.

Следующими внутриклеточными структурами сперматозоида, аномалии которых могут быть причиной нарушения репродуктивной функции у мужчины, являются аномалии средней части. Аномалии ультраструктуры двигательного аппарата сперматозоида и митохондрий чаще всего наблюдают у мужчин с астенозооспермией и некрозооспермией (Cummins et al., 1994; Kao et al., 1995, 1998).

Как известно, подвижность сперматозоидов обеспечивается за счет большого количества АТФ, которая стимулирует движения жгутика. Нарушение дыхательной функции митохондрий может приводить к снижению подвижности сперматозоидов и, соответственно, к бесплодию. Соответственно, подвижность напрямую связана с количеством и расположением митохондрий в теле (средней части) сперматозоида, а также с нормальным функционированием мтДНК. Так, у некоторых пациентов с бесплодием отмечают нарушение формирования митохондриальной спирали, которое выражается в сохранении расположения митохондрий, характерного для незрелых половых клеток – кластерного расположения органелл (Liu and Baker, 1992). Различают два варианта аномального количества митохондрий. При первом митохондрии отсутствуют вокруг аксонемы, средняя часть сперматозоида очень тонкая с частыми изгибами, что наблюдается в отдельных случаях при астенозооспермии. Данное состояние встречается чрезвычайно редко. Второй вариант – отсутствие митохондрий в сперматозоидах при дисплазии фиброзного слоя (аномальная фиброзная оболочка распространяется вплоть до района шеи).

МтДНК кодирует разные гены, продукты которых участвуют в окислительном фосфорилировании и продуцировании АТФ, используемой в качестве источника энергии для подвижности сперматозоидов. Мутации мтДНК приводят к нарушению либо потере функционирования белков, изменяя таким образом подвижность сперматозоидов, что ассоциируется с аномальными показателями спермограммы. Изучение мтДНК в сперматозоидах актуально в связи с выяснением ее роли в возникновении бесплодия у мужчины. Для мтДНК характерна высокая частота мутаций. Делеции мтДНК приводят к нарушению окислительного фосфорилирования и потере подвижности сперматозоидов. Известны различные типы мутаций мтДНК в сперматозоидах, среди них выявлена связь между делецией 4977 п.н. мтДНК и снижением подвижности сперматозоидов и, соответственно – бесплодием (Као et

al., 1995, 1998). Делеции мтДНК были выявлены в сперматозоидах, полученных при биопсии яичка у мужчин с азооспермией и тяжелой олигозооспермией (O'Connell et al., 2002). Описана делеция двух нуклеотидов в гене, кодирующем цитохромоксидазу II митохондрий сперматозоидов, которая привела к возникновению стоп-кодона и "усечению" белка, который предположительно обуславливает аномальную подвижность сперматозоидов у этого пациента (Thangaraj et al., 2003). В то же время, выявляют делеции мтДНК у мужчин с нормальными параметрами спермограммы (Cummins et al., 1998). Эти наблюдения требуют дальнейшего исследования генома мтДНК сперматозоидов.

Несмотря на то, что наследование мтДНК является прежде всего материнским, известны случаи передачи мутаций мтДНК от отца (но не более 1% наследования). Исследование мтДНК имеет значение для оценки мужской фертильности, особенно в контексте применения вспомогательных репродуктивных технологий. Отмечают наличие множественных перестроек мтДНК у мужчин с олигоастенозооспермией (Lestienne et al., 1997; O'Connell et al., 2002).

Выявлена связь между гаплотипом мтДНК, функционированием дыхательной цепи в сперматозоидах и астенозооспермией. Подтверждение этому получено благодаря сообщению о связи между мужским бесплодием и полиморфным вариантом гена в САG микросателлитном повторе митохондриальной ДНК полимераза γ. Мутации мтДНК приводят к снижению подвижности сперматозоидов, соответственно, – к снижению репродуктивной способности у мужчины, которое наблюдается с возрастом. Несмотря на привлекательность этой гипотезы, нет прямого свидетельства, подтверждающего связь мутаций в мтДНК с нарушением подвижности сперматозоидов.

Аномалии структуры и функционирования сперматозоидов выявлены также у мужчин с митохондриальными заболеваниями (Spiropoulos et al., 2002).

Отдельные публикации, в которых впервые были детально описаны морфологические аномалии жгутика сперматозоида, датированы 1950 и 1963 гг. (Williams, 1950; Kagan, 1963). Системные исследования аномалий жгутиков стали проводить с 70-х гг. прошлого столетия (Pedersen et al., 1971; Pedersen and Rebbe, 1974, 1975; Le Lannou, 1979). В основе патологий жгутика сперматозоида могут лежать нарушения сперматогенеза, которые приводят к снижению подвижности или полной неподвижности сперматозоидов (астенозооспермия). Согласно рекомендациям ВОЗ на основе подвижности сперматозоиды классифицируют на четыре группы: А – активно подвижные (быстрое поступательное движение), В – слабо подвижные (медленное поступательное движение), С – подвижные на месте, D – неподвижные. По стандартам ВОЗ нормальным может считаться образец эякулята, в котором более 20% сперматозоидов принадлежат к группе А, более 50% сперматозоидов соответствуют в сумме группам А+В. Выделяют следующие морфологические аномалии жгутика сперматозоида: количественные изменения (отсутствие жгутика, наличие двух жгутиков), изменение локализации (смещение расположения жгутика), изменение формы жгутика (закрученный жгутик, изменение его толщины). Перечисленные аномалии встречаются у некоторых мужчин с нормальным функционированием репродуктивной системы, однако в большинстве случаев такие морфологические изменения сопряжены со структурными аномалиями аксонемы жгутиков всех или большинства сперматозоидов в эякуляте (Neugebauer et al., 1990). При естественном зачатии сперматозоиды с дефектами строения аксонемы не способны проходить через женские половые пути и достигать ооцита. Поврежденные жгутики сперматозоидов при обычном светомикроскопическом анализе могут выглядеть нормальными, и только анализ с помощью электронной микроскопии позволяет оценить клеточные органеллы сперматозоида, выявить ультраструктурные нарушения строения аксонемы и наружного волокнистого слоя.

Ультраструктурные аномалии аксонемы

приводят к нарушению подвижности сперматозоидов у 70% пациентов с тяжелой астенозооспермией. Установление количества аномальных сперматозоидов в каждом конкретном случае имеет большое значение для диагностики нарушения репродуктивной функции у мужчины, поскольку в малых количествах (до 40%) эти аномалии присутствуют также и у фертильных мужчин. Одним из факторов нарушения строения жгутика сперматозоида является генетический (например, синдром Картагенера).

Таким образом, связь между повышением доли аномальных сперматозоидов в эякуляте и снижением частоты наступления беременности отмечают как в условиях естественного зачатия, так и при использовании лечебных программ ВРТ. Критерии, разработанные Т. Крюгером, являются важным прогностическим показателем для оценки вероятности оплодотворения в культуре, а также частоты наступления беременности (Kruger et al., 1987). С внедрением в практику ВРТ технологии ICSI появилась возможность селекции сперматозоидов с нормальными морфологическими и функциональными показателями. Как показывает опыт работы Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина), нарушение или даже отсутствие подвижности сперматозоида при его адекватной морфологии и нормальной жизнеспособности не влияет на исход ICSI.

В рамках проведения ЭКО с ICSI используют не только сперматозоиды, полученные после обработки эякулята, но и сперматозоиды или их незрелые формы, извлеченные при помощи инвазивных микрохирургических процедур из яичка, придатка яичка и семявыносящего протока (**рис. 4.17, фото 4.5**). Данные технологии применяют при азооспермии и некрозооспермии.

До недавнего времени эффективное лечение для мужчин с обструктивной и необструктивной азооспермией отсутствовало, а единственными вариантами преодоления бесплодия и получения желаемого отцовства было использование донорских сперматозоидов или усыновление. В течение последнего десятилетия достигнуты

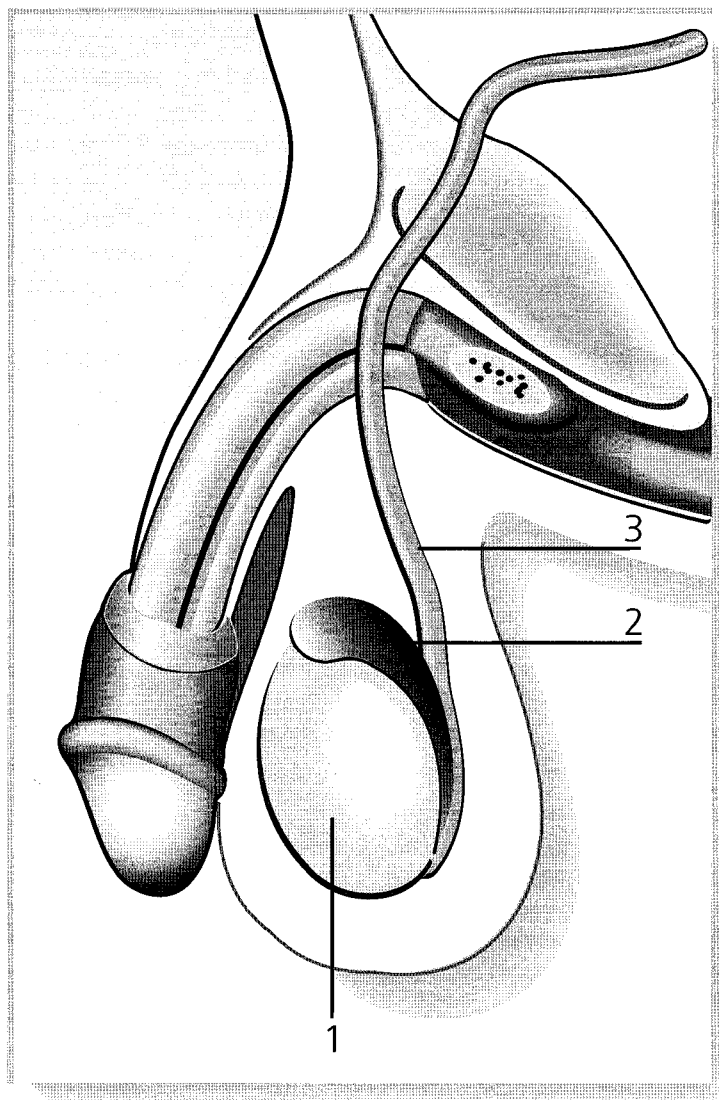


Рис. 4.17. Источник извлечения материала при отсутствии сперматозоидов в эякуляте. Схема: 1 – яичко; 2 – придаток яичка; 3 – семявыносящий проток.

успехи в получении сперматозоидов из яичка и его придатка. Впервые успешное оплодотворение и наступление беременности после использования в программе ЭКО эпидидимальных сперматозоидов, полученных с помощью микрохирургической аспирации (MESA), было проведено в 1985 г. (Temple-Smith et al., 1985). Метод получил распространение в конце 80-х гг. прошлого столетия после наступления беременности в супружеских парах, у мужчин в которых наблюдали агенезию и обструкцию яичек (Silber, 1989; Silber et al., 1990).

С развитием микроманипуляционных вспомогательных технологий, а именно ICSI, был расширен перечень показаний к

проведению микрохирургических манипуляций по получению сперматозоидов, а также усовершенствована сама технология забора клеток (открытым или закрытым способом) (Craft et al., 1993; Schoysman et al., 1993; Tournaye et al., 1994; De Croo et al., 2000). В 1995 г. в результате применения ICSI родились первые дети, у отцов которых наблюдали необструктивную азооспермию, а сперматозоиды были получены в результате TESE (Tournaye et al., 1995).

Одновременно с успешным наступлением беременности при использовании сперматозоидов, полученных с помощью микрохирургических операций MESA и TESE,

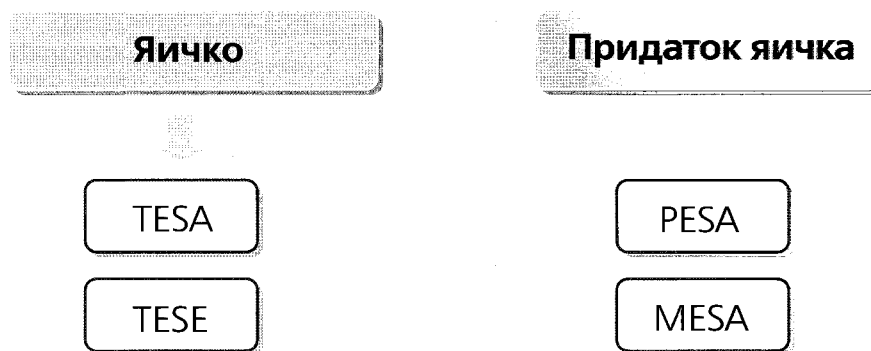


Рис. 4.18. Классификация хирургических методов получения сперматозоидов и их незрелых форм на основе источника извлечения клеток

были достигнуты успехи при оплодотворении незрелыми формами сперматозоидов (Silber, 1998; Sofikitis et al., 2003). Как известно, в целом ряде случаев у мужчин при перкутанной или микрохирургической биопсии яичка или его придатка невозможно получить даже единичные сперматозоиды, что обусловлено нарушением сперматогенеза или блоком созревания половых клеток во время спермиогенеза.

Эксперименты на животных, проведенные в начале 90-х гг. прошлого столетия, показали возможность использования в технологии *in vitro* оплодотворения не только зрелых сперматозоидов, но и их незрелых форм. Первые положительные результаты были получены при использовании круглых сперматид, а также изолированных ядер круглых сперматид (Ogura and Yanagimachi, 1993; Ogura et al., 1994). Так, сначала у мышей, хомяков, а затем у кроликов было получено потомство после слияния ооцитов со сперматидами, а также в результате интрацитоплазматической инъекции изолированных ядер круглых сперматид (Kimura and Yanagimachi, 1995).

Первые работы по использованию в программе ЭКО с ICSI незрелых форм сперматозоидов человека датированы 1994 г., однако беременность прерывалась на ранних сроках (Hannay, 1995; Sofikitis et al., 1995a). В 1995 г. родились первые два ребенка, зачатые с помощью ЭКО с ICSI при использовании круглых сперматид (ROSI) (Tesarik et al., 1995). В том же году была успешно проведена интрацитоплазматическая инъекция изолированных ядер круглых

сперматид (ROSNi) (Sofikitis et al., 1995b; Silber and Johnson, 1998). Исследователи наблюдали оплодотворение и развитие эмбриона до стадии десяти клеток, уровень оплодотворения на каждый инъецированный ооцит составлял 31%.

В настоящее время в практике ВРТ успешно используют как зрелые, так и незрелые сперматозоиды, полученные в ходе проведения TESA, PESA, TESE, MESA, а также замороженные образцы тестикулярной ткани.

Согласно опыту работы Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина) и других медицинских центров инвазивные методы при обструктивной азооспермии позволяют получить сперматозоиды практически в 100% случаев (Vernaev et al., 2006).

Хирургические методы извлечения мужских гамет классифицируют на основе источника получения клеток (из яичка или придатка яичка), а также на основе метода проведения процедуры (открытым или закрытым способом) (рис. 4.18, 4.19).

Преимущества перкутанных методов (TESA, PESA) извлечения зрелых и незрелых форм мужских половых клеток заключаются в том, что указанные процедуры являются наименее инвазивными с минимальным риском повреждения сосудов, отсутствует или снижен до минимума послеоперационный дискомфорт. TESA проводят с помощью тонкой иглы и аспирационного устройства под местной или общей анестезией.

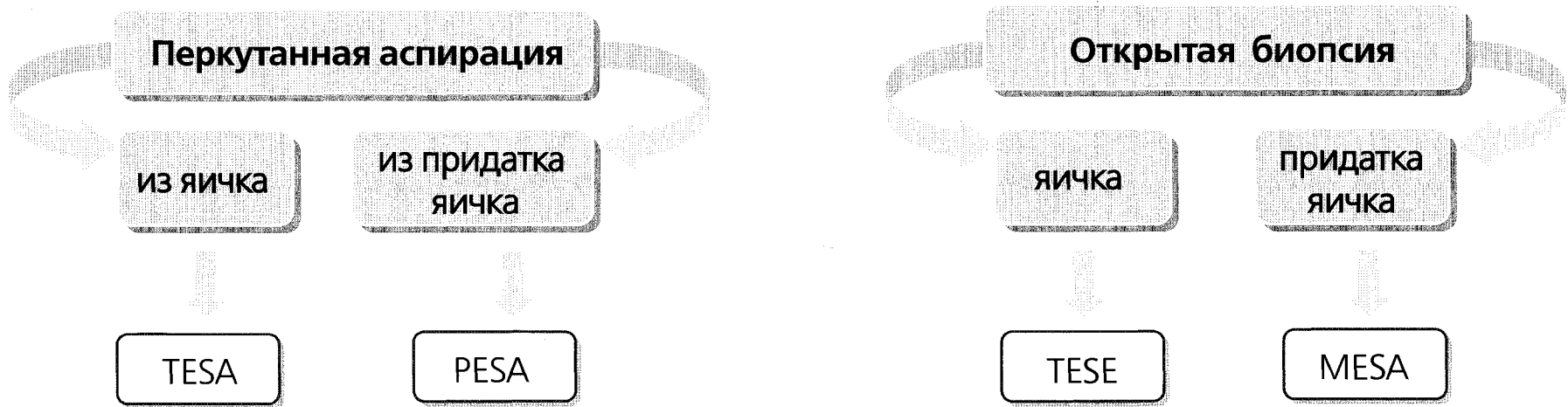


Рис. 4.19. Получение сперматозоидов и их незрелых форм из яичка, придатка яичка открытым и закрытым способами

PESA предполагает аспирацию сперматозоидов из придатка яичка с использованием тонкой иглы (бабочки), присоединенной к шприцу объемом 20 мл. Проколы осуществляют один или несколько раз до тех пор, пока не будет получено достаточное количество сперматозоидов. Рассечения кожного покрова при этой манипуляции не производят, а сама процедура проходит под местной анестезией (с использованием внутривенной седации). При выполнении PESA из придатка яичка извлекают очень малое количество семенной жидкости. Процедура часто сопровождается контаминацией клетками крови. В случае неудачного проведения PESA возможно выполнение MESA или TESA. Основным недостатком этой процедуры заключается в том, что она проводится вслепую, часто требует повторного прокола иглой, что может приводить к повреждению тонких сосудов канальцев придатка яичка.

Исследователи сравнивают результаты оплодотворения сперматозоидами, полученными в ходе PESA и TESA. Как показали работы, проведенные при исследовании ДНК сперматозоидов, полученных из яичка и проксимального отдела придатка яичка, меньшая степень повреждения ДНК характерна для сперматозоидов, полученных из яичка (Steele et al., 1999; O'Connell et al., 2002). Одной из причин повреждения ДНК сперматозоидов, полученных из проксимального отдела придатка яичка, ученые называют процесс "старения" сперматозоидов, находящихся в придатке, в связи с чем рекомендовано отдавать предпочтение сперматозоидам, аспирированным из яичка (O'Connell et al., 2002). Такие сперматозоиды не подвергаются действию ферментов, высвобождаемых из акросом погибших или погибающих сперматозоидов, содержащихся в придатке. Соответственно, эффективность оплодотворения выше при использовании сперматозоидов, полученных из яичка, по сравнению с клетками, извлеченными из его придатка.

TESE представляет собой микрохирургическую манипуляцию под местной или общей анестезией, которая предполагает проведение открытой биопсии яичка и

получение образца ткани яичка. В ходе манипуляции производят небольшое рассечение кожного покрова для обнажения яичка. В случае обструктивной азооспермии предполагается получение нескольких образцов биопсии из каждого яичка для выявления участков с нормальным сперматогенезом. В ходе этой манипуляции производят небольшой разрез на каждой стороне мошонки. Извлеченная тестикулярная ткань поступает в эмбриологическую лабораторию, где образцы обрабатывают для получения сперматозоидов. MESA предполагает рассечение кожного покрова мошонки с целью обнажения яичка и его придатка. Под контролем операционного микроскопа один каналец придатка открывают и из него аспирируют сперматозоиды. MESA проводят под общей анестезией. После завершения процедуры восстанавливают целостность ткани и кожных покровов. Процедура снижает до минимума риск контаминации жидкости из придатка клетками крови. Возможно также извлечение клеток из придатка при открытии отдельных его канальцев с помощью микроскальпеля.

При проведении перечисленных инвазивных манипуляций в распоряжение эмбриологов поступают не только зрелые сперматозоиды, но и их незрелые формы. Как показывает опыт работы Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина) по применению микроинъекции сперматозоида в зрелый ооцит, в рамках этой микроманипуляции возможно успешное использование не только зрелых сперматозоидов, но и их незрелых форм.

Использование предшественников сперматозоидов в процедуре ICSI обусловлено отсутствием сперматозоидов в эякуляте, а также отсутствием зрелых клеток в яичке или его придатке. Использование незрелых половых клеток в процедуре ICSI является единственной возможностью отцовства для мужчин с азооспермией.

Серьезные нарушения сперматогенеза и блок созревания гамет на стадии сперматид можно наблюдать при синдроме Клайнфельтера, синдроме "только клетки

Сертоли”, крипторхизме, который сопровождается атрофией канальцев, при других патологических состояниях.

Остановка сперматогенеза может происходить на стадии круглых сперматид во время спермиогенеза – в процессе элонгации сперматид; последние варианты остановки встречаются реже.

Оплодотворение, наступление беременности и рождение детей в результате инъекции круглых сперматид (ROSI) и поздних, или элонгированных, сперматид (ELSI) в ооциты в значительной степени зависят от стадии зрелости вводимых клеток, а также тяжести тестикулярного нарушения. На сегодня в литературе описан целый ряд отдельных случаев наступления беременности и рождения детей после применения лечебных программ ЭКО с ICSI с использованием круглых и элонгированных сперматид, выделенных из эякулята, яичка или его придатка. Преимущество использования поздних сперматид объясняется завершением в таких клетках целого ряда процессов на молекулярном и клеточном уровнях: более зрелая ДНК, гистоны замещены протаминами, хроматин конденсирован. Таким образом, ранние (круглые) и поздние (элонгированные) сперматиды, полученные из эякулята или тестикулярной ткани, могут быть использованы для проведения интрацитоплазматической инъекции. Однако частота наступления беременности после инъекции сперматид остается очень низкой. При использовании незрелых форм сперматозоидов не исключена возможность генетических последствий для потомства.

Вопрос повышения эффективности оплодотворения в результате использования сперматид в программе ЭКО с ICSI решается сегодня различными методами. Разработаны протоколы стимуляции сперматогенеза, а также технология культивирования сперматид *in vitro*.

В случае стимуляции сперматогенеза речь идет о гормональной стимуляции с помощью рФСГ или рФСГ с тестостероном. Как известно, основные показатели фертильности спермы – общая концент-

рация сперматозоидов в эякуляте и их подвижность – зависят от действия ФСГ и находятся под его непосредственным регуляторным влиянием и опосредованным через половые гормоны влиянием ЛГ. Непосредственное влияние ФСГ на сперматогенез осуществляется на уровне В-сперматогоний и прелептотенных сперматоцитов. ФСГ, вызывая увеличение содержания андроген-связывающих белков, участвует в транспорте и локализации тестостерона в клетках Сертоли, а последние, непосредственно контактируя с круглыми сперматидами, способствуют их переходу в элонгированные формы. Полученные данные предполагают возможность использования тактики стимуляции сперматогенеза гонадотропинами в программах вспомогательной репродукции. При культивировании сперматид *in vitro* происходит ядерное и цитоплазматическое созревание клеток, что способствует повышению потенциала клетки к оплодотворению.

Для некоторых форм обструктивной и необструктивной азооспермии использование незрелых половых клеток – единственный путь к отцовству генетически родного ребенка. Поскольку в основе азооспермии может лежать генетический фактор, программа ЭКО с ICSI включает обязательное цитогенетическое обследование супругов; также рекомендуют проведение молекулярного анализа для выявления мутации гена *CFTR* и микроделеции хромосомы Y.

4.3.4. Оплодотворение *in vitro*: инсеминация ооцитов *in vitro* и интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ICSI). Оценка эмбрионов

Следующим эмбриологическим этапом программы ЭКО после подготовки женских и мужских половых клеток к оплодотворению *in vitro* является непосредственно процедура оплодотворения *in vitro*. Различают следующие технологии ЭКО: стандартную инсеминацию (добавление взвеси сперматозоидов в количестве 5000-20 000 клеток на 1 мл) в чашки Петри, в которых содержатся 1-5 ооцитов; инсеминацию в микрокапле – добавление сперматозоидов из расчета 20 000 сперматозоидов на ооцит в капле со средой, содержащей 1-4 ооцита; ЭКО с ICSI (микроманипуляция) – непосредственное введение сперматозоида в ооцит с использованием микроинъектора.

Инсеминация ооцитов *in vitro* в рамках программы ЭКО предполагает процедуру переноса обработанного эякулята в чашки Петри, содержащие зрелые ооциты, с последующей инкубацией в термостате в течение 12 ч. Подсадку обработанной взвеси сперматозоидов осуществляют через 4-6 ч после забора ооцитов. Преинкубация ооцитов перед инсеминацией в среднем занимает от 2 до 6 ч. Как показывает опыт работы эмбриологической лаборатории Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина), инкубация ооцитов более 6 ч приводит к снижению способности клетки к оплодотворению. Важными условиями для успешного оплодотворения является наличие вокруг ооцитов клеток кумулюса и зоны пеллюцида, а также определенного количества прогрессивно подвижных сперматозоидов.

Для достижения максимального успеха при проведении лечебной программы ЭКО или ЭКО с ICSI врачи и эмбриологи придерживаются следующих требований:

- возможность наблюдения, а также коррекции роста и развития фолликулов в яичниках;
- наличие по меньшей мере одного яичника для пункции под УЗ-контролем и доступ к нему;
- наличие полноценной матки;

- концентрация сперматозоидов не менее 5 млн/мл, линейно-поступательное движение не менее чем у 20% из них, наличие не менее 30% нормальных с морфологической точки зрения сперматозоидов.

В большинстве случаев у мужчин при нарушении репродуктивной функции наблюдают снижение концентрации сперматозоидов, снижение их подвижности, аномальную морфологию клеток, дефекты акросомной реакции или высокий титр антиспермальных антител в эякуляте. Наличие этих и других факторов не способствует положительному результату программы, поэтому разработка и внедрение в практику ВРТ интрацитоплазматической инъекции сперматозоида непосредственно в ооцит позволили расширить показания к применению ВРТ и добиться положительных результатов. Технология ICSI относится к микроманипуляциям с клетками, среди которых выделяют микроманипуляции с ядром и цитоплазмой половых клеток, вспомогательный хэтчинг, ПГД.

В программе ЭКО с ICSI используют единичные сперматозоиды и их незрелые формы, извлеченные с помощью инвазивных методов (PESA, TESA, TESE, MESA) (рис. 4.20).

Для достижения оплодотворения в программе ЭКО с ICSI необходимо наличие зрелого ооцита и мужской половой клетки, содержащей функциональный геном и центриоли. В технологии ICSI используют как нативные сперматозоиды и клетки, полученные в результате биопсии яичка или его придатка, так и оттаянные после криоконсервирования.

На сегодняшний день технология ICSI позволяет иметь генетически родных детей мужчинам практически в абсолютном большинстве случаев бесплодия. Единственная категория мужчин (менее 5%), для которых проблема бесплодия решается с помощью донорских клеток, – это пациенты, у которых отсутствуют сперматозоиды и сперматиды в эякуляте и при биопсии яичка или его придатка. С момента внедрения технологии ICSI в 1992 г.

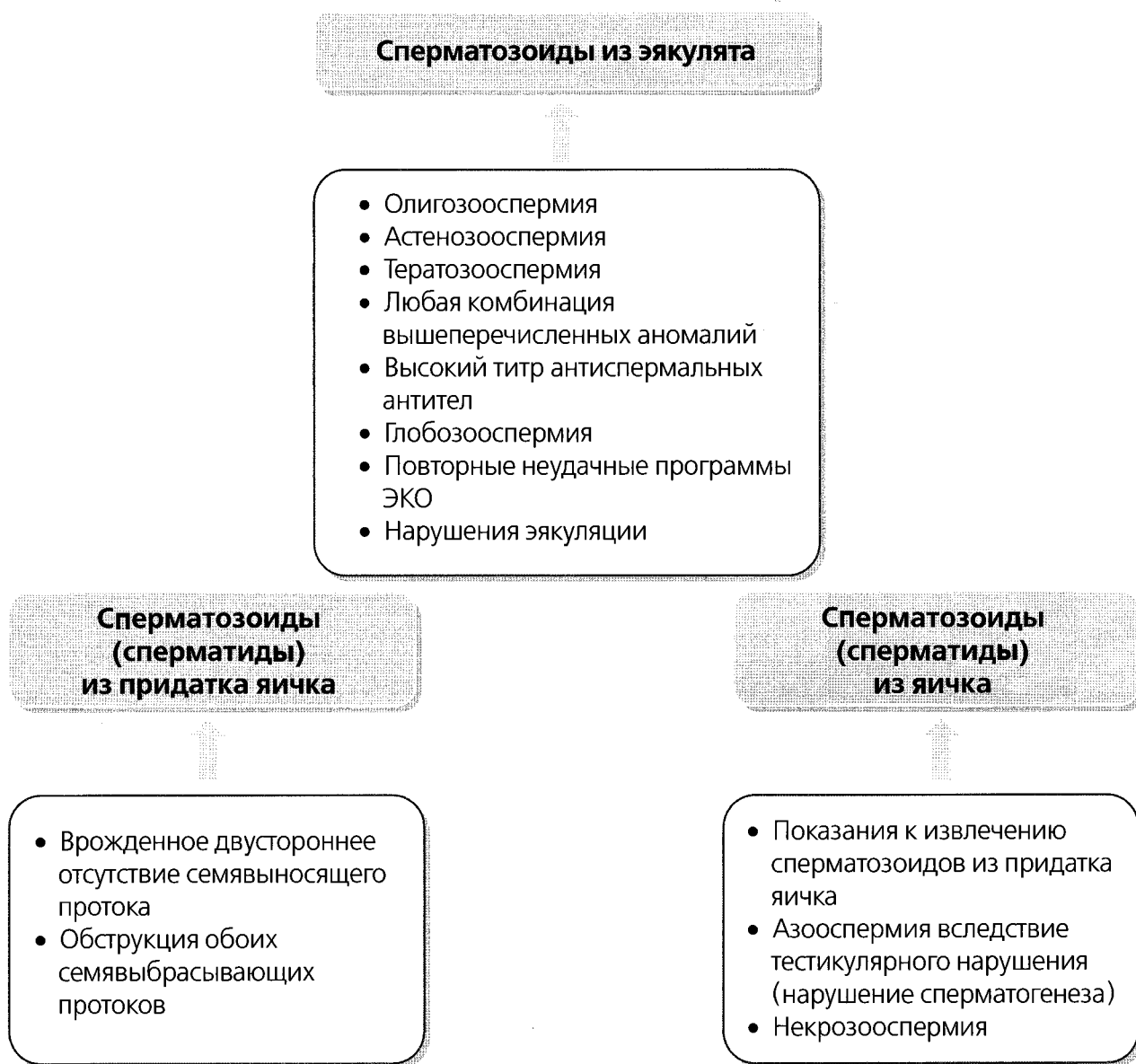


Рис. 4.20. Источники получения мужских гамет для проведения программы ЭКО с ICSI

масштабы использования донорских сперматозоидов резко сократились.

В зарубежной практике источник мужских половых клеток при использовании программы ICSI принято указывать в самом названии программы. Например, ELSI, ROSI, ROSNI, что подразумевает использование в программе элонгированных, круглых сперматид или ядер круглых сперматид, соответственно. В отечественной практике при использовании программы ЭКО с ICSI указывают степень зрелости мужской половой клетки, полученной для оплодотворения.

Несмотря на то, что ICSI является относительно новой технологией, никакой другой метод не обеспечивает таких высоких результатов при лечении бесплодия. Необходимо учесть, что схемы стимуляции суперовуляции, процедуры пункции фолликулов, а затем переноса эмбрионов в гинекологической практике отработаны. В то же время, работа с половыми клетками в эмбриологической лаборатории требует индивидуального подхода на каждом ее этапе. Соответственно, эффективность программы во многом зависит от опыта и индивидуального мастерства эмбриолога. Результативность использования ICSI в Клинике проблем планирования семьи (Киев, Украина) превышает 70% на цикл именно благодаря многолетнему опыту и собственным разработкам эмбриологов.

Если первоначально технология ICSI успешно использовалась в случае азооспермии у мужчин, то в настоящее время указанная технология предпочтительна при целом ряде показаний, которые включают идиопатическое бесплодие, пограничные параметры спермиологического анализа, повторные неудачные программы ЭКО в анамнезе, трубный фактор бесплодия.

Для проведения ICSI необходимы инвертированный микроскоп, оснащенный микроманипуляторами и микроинъекторами, которые включают механические и ручные микроманипуляторы; а также инъекционные микропипетки и микроиглы. Качество этих инструментов играет нема-

ловажную роль в успехе проведения микроманипуляции. С помощью микроскопа производят непосредственно процедуру ICSI, различные микроманипуляции (вспомогательный хэтчинг, ПГД), оценку оплодотворенной яйцеклетки (наличие пронуклеусов), зиготы и эмбрионов.

Непосредственно процедуру ICSI производят только со зрелыми ооцитами (находящимися на стадии мейотического деления II). Этапы проведения ICSI включают:

- правильное расположение ооцита для проведения инъекции и удержание его специальной микропипеткой, которое подразумевает размещение ооцита таким образом, чтобы полярное тельце находилось в положении 6 или 12 ч (**фото 4.6а**);
- выбор и иммобилизацию сперматозоида инъекционной острой, полый микроиглой;
- прокол (разрыв) зоны пеллюцида и введение микроиглы в цитоплазму ооцита (**фото 4.6б,в**);
- осторожное продвижение микроиглы и введение иммобилизованного сперматозоида, находящегося в 1-2 мкл среды, в цитоплазму ооцита (**фото 4.6г,д**);
- аккуратное выведение микроиглы из ооцита (**фото 4.6е-з**).

Процедуру ICSI производят в пластиковой микроинъекционной емкости – чашке Петри диаметром 30-60 мм с низкими бортиками, которая содержит отдельные покрытые минеральным маслом капли (10 мкл) HEPES-буферизированной среды. Ооциты помещают в капли с HEPES-буферизированной средой, а после проведения процедуры ICSI в эти капли переносят будущие эмбрионы. Отдельно в чашке Петри располагают плоские капли раствора поливинилпирролидона (PVP), покрывая минеральным маслом во избежание высыхания. Суспензию сперматозоидов объемом 1 мкл помещают в каплю раствора PVP под минеральным маслом. Вязкий раствор PVP облегчает работу эмбриолога при оценке морфологии сперматозоидов и проведении микроманипуляции, а также обеспечивает контроль над жидкостью в инъекционной микроигле и предупреждение прилипания

сперматозоида к пипетке. Непосредственно перед ICSI производят процедуру иммобилизации сперматозоида, которая заключается в следующем. В инъекционную микроиглу, заполненную PVP, вводят один морфологически нормальный, жизнеспособный сперматозоид. Затем сперматозоид направляют перпендикулярно к инъекционной пипетке для облегчения проведения процедуры иммобилизации, которая предполагает трение хвоста сперматозоида о дно емкости, что приводит к его надлому, предпочтительно ниже средней части. Эта процедура играет важную роль при активации ооцита, так как облегчает выход цитозольных факторов сперматозоида через разорванную мембрану ниже средней части хвоста сперматозоида. Вероятность оплодотворения иммобилизованным сперматозоидом выше, чем при использовании неиммобилизованной мужской гаметы (Fishel et al., 1995б; Palermo et al., 1996).

Ооцит фиксируют с помощью держащей (фиксирующей) микропипетки диаметром 40-50 мкм, посредством которой клетка удерживается благодаря эффекту присоски. Важно учитывать расположение клетки: ооцит фиксируют на конце микропипетки при помощи всасывания таким образом, чтобы первое полярное тельце находилось в положении 12 либо 6 ч, что позволяет избежать повреждения веретена деления.

После иммобилизации сперматозоид вытягивают в микроиглу хвостом вперед, что обеспечивает введение в ооцит минимального количества культуральной среды. Инъекционную микроиглу с иммобилизованным сперматозоидом размещают напротив удерживающей микропипетки (в положении 3 ч), сперматозоид размещен на самом конце инъекционной микроиглы. По окончании фокусировки обеих пипеток и ооцита производят прокол зоны пеллюцида микроиглой с последующим осторожным введением сперматозоида в ооплазму. Указанные манипуляции производят с помощью гидравлических микроманипуляторов, которые управляются в трех измерениях. Необходимо перманентно удерживать фокусировку на инъекционной микроигле, последняя

должна постоянно находиться в экваториальной плоскости ооцита. С противоположной стороны при удерживании ооцита микропипеткой производят незначительное втягивание ооплазмы оолеммы (**фото. 4.6в-д**). Следующим этапом является аккуратное и медленное введение сперматозоида в ооплазму, при этом объем вводимой среды должен быть минимальным. Затем инъекционную микроиглу аккуратно извлекают. После завершения процедуры инъекции ооцита промывают, а затем культивируют в закрытых парафиновым маслом микрокаплях в CO₂-инкубаторе при температуре +37 °С и атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха. Через 24-120 ч культивирования производят оценку манипуляции ICSI и констатируют оплодотворение. Условия пребывания клеток в CO₂-инкубаторе максимально приближены к условиям в женских маточных трубах.

Для успешного осуществления процедуры ICSI необходимо учитывать следующие моменты:

- проникновение в мембрану проводят очень аккуратно в строго определенной области на ограниченную глубину;
- для проверки наличия отверстия в мембране осуществляют пробный забор небольшого количества ооплазмы в пипетку и только затем ооплазму возвращают назад внутрь ооцита вместе со сперматозоидом;
- микроигла должна быть извлечена из ооцита максимально осторожно во избежание повреждения клетки и возможности захвата сперматозоида из клетки;
- в клетку вместе со сперматозоидом не должно попасть избыточное количество среды из микроиглы.

Как показывает опыт работы Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина) и других центров, использующих технологию микроинъекции сперматозоида, при проведении ICSI со сперматозоидами, полученными из эякулята, оплодотворение наступает более чем в 2/3 случаев инъекции ооцитов (Devroey and Van Steirteghem, 2004). Уровень оплодотворения при использовании сперматозоидов, полученных хирургическим

путем (при необструктивной азооспермии), ниже, чем при использовании сперматозоидов из эякулята, однако составляет от 45 до 50% (Levran et al., 2000; Vicdan et al., 2001; Practice Committee, 2006). Оплодотворение после ICSI может не наступать в следующих случаях: наличие малого количества полноценных зрелых ооцитов, аномальная морфология всех ооцитов, повреждение ооцитов во время инъекции сперматозоида в клетку, наличие неподвижных сперматозоидов в эякуляте, аплазия акросомы у сперматозоидов. Следует отметить, что при последующих повторных циклах в этих случаях отмечают наступление оплодотворения. Основные факторы, влияющие на успех программы (при условии возможности извлечения мужских половых клеток), – возраст женщины и овариальный резерв.

Как указано выше, в процедуре ICSI используют не только сперматозоиды, но и их предшественников – элонгированные, круглые сперматиды, а также ядра круглых сперматид (ELSI, ROSI, ROSNI, соответственно) (Joris et al., 1998; Van Steirteghem et al., 2002; Devroey and Van Steirteghem, 2004). Отмечен ряд преимуществ ROSI над ROSNI: инъекция в ооплазму интактной сперматиды обеспечивает перенос всех цитоплазматических компонентов мужской гаметы в женскую, на проведение ROSI затрачивается меньше времени, чем на микроинъекцию ядра, для проведения ROSI не требуются механические или химические манипуляции с матриксом и оболочкой ядра мужской гаметы. При проведении ICSI с круглыми сперматидами следует учитывать морфологические особенности сперматид. Наличие большого количества цитоплазмы вокруг ядра может нарушить или задержать высвобождение ассоциированной с ядром ооцит-активирующей субстанции (OASIS), содержащейся в сперматиде, и впоследствии повлиять на процесс активации ооцита, нарушая своевременность развития мужского и женского пронуклеусов. Перенос всех цитоплазматических компонентов сперматиды в женскую гамету не связан с повышением частоты оплодотворения. Основные цитоплазматические эпигенетические

элементы, которые мужская гамета приносит в зиготу, – это OASIS и центросома.

После инсеминации ооцитов *in vitro* или микроинъекции сперматозоида (ICSI) с помощью микроскопической техники проводят оценку оплодотворения на уровне зигот и эмбрионов до их переноса в полость матки. Результаты успешного применения технологии ICSI или инсеминации ооцита *in vitro* включают оплодотворение, формирование зиготы и развитие эмбриона(-ов), а заключительный этап программы ЭКО/ЭКО с ICSI – перенос эмбриона(-ов) в организм матери с его (их) последующим развитием в полости матки.

Как известно, после слияния пронуклеусов ооцита и сперматозоида образуется зигота. Первый клеточный цикл длится 24 ч, по его окончании образуются два бластомера с тотипотентными свойствами (**фото 4.7а,б**). На 2-е сут после пункции оплодотворенная яйцеклетка находится на стадии четырех бластомеров, иногда можно наблюдать и 6-8 бластомеров (**фото 4.7в**). На 3-4-е сут культивирования эмбрионов наблюдают 6-8 бластомеров, в некоторых случаях – 8-16 (**фото 4.7г**). При достижении стадии 12-14 бластомеров наблюдают процесс компактизации эмбриона: межклеточные контакты усиливаются, эмбрион приобретает шаровидную форму с гладкими контурами и на этой стадии называется морулой. На 5-е сут эмбрион содержит более 16 бластомеров, образуется бластоциста, которая морфологически представляет собой пузырек, образованный наружным слоем клеток (трофобласт) и скоплением внутренней клеточной массы, из которой в случае успешной имплантации развивается зародыш.

Таким образом, начальный период развития эмбриона можно наблюдать под микроскопом, что позволяет проводить неинвазивный скрининг зигот и эмбрионов, а при наличии показаний – и инвазивный скрининг эмбрионов. Необходимость проведения оценки оплодотворенной яйцеклетки и преэмбриона основывается на результатах исследований, которые показали, что качество эмбриона пред-

определяет исход программы ЭКО. Отмечена четкая корреляция между морфологией зиготы и способностью эмбриона к имплантации. Скрининг зигот и эмбрионов способствует повышению показателя имплантации при переносе на 3-й или 5-й день (Scott et al., 2000; Tesarik et al., 2000; Kahraman et al., 2002).

С целью повышения вероятности имплантации эмбриологи проводят оценку зигот и эмбрионов, культивируют эмбрионы до стадии бластоцисты с их последующей оценкой, при наличии показаний производят микроманипуляции вспомогательного хэтчинга, удаления фрагментации, преимплантационной диагностики (рис. 4.21).

Соответственно, скрининг полученных эмбрионов позволяет проводить выборочный перенос, используя эмбрионы с наивысшим имплантационным потенциалом и предотвращая развитие многоплодия.

Первоначально оценку эмбрионов проводили на основе биохимических данных. Так, в начале 90-х гг. прошлого столетия стали проводить анализ энергетических и метаболических процессов в эмбрионах на разных преимплантационных стадиях развития. Благодаря этим исследованиям установлено, что в качестве источника питания зиготы используют пируват, для них характерен низкий уровень потребления кислорода, на стадии бластоцисты уровень потребления глюкозы повышен (Gardner et al., 1996). Полученные данные позволили разработать биохимические методы оценки гамет и эмбрионов (анализ их метаболической активности), был предложен метод оценки потребления кислорода, пирувата или глюкозы (Leese et al., 1986; Magnusson et al., 1986; Gardner et al., 2001; Mendoza et al., 2002; Ebner et al., 2003b). Однако эти методы являются трудоемкими, требуют значительных затрат и используются исключительно в исследовательских целях. В настоящее время разработаны критерии оценки эмбрионов на основе их морфологических особенностей, которая, как показывает опыт различных центров IVF, является наиболее эффективной и удобной в практике (С.Е. Василевская и др.,

2004; Tesarik and Greco, 1999; Montag et al., 2001; Ebner et al., 2002).

Среди морфологических отклонений, которые выявляют на ранних этапах развития эмбриона, следует выделить высокую степень фрагментации бластомеров, остановку развития на ранних стадиях дробления, апоптоз клеток, ведущий к гибели эмбриона. Рассмотрим поэтапный скрининг зигот и преэмбрионов.

На следующий день после проведения процедуры ICSI или инсеминации *in vitro* эмбриологи оценивают клетки для выявления признаков состоявшегося оплодотворения, так как синхронизация процесса оплодотворения между ооцитами может варьировать.

Как известно, зигота (оплодотворенная яйцеклетка перед началом ее дробления) содержит как мужской, так и женский пронуклеусы, ее диаметр составляет 100 мкм. Поскольку размеры ооцита значительно превышают размеры сперматозоида, пронуклеусам гамет необходимо преодолеть определенное расстояние на пути друг к другу. Их передвижение определяется структурой цитоскелета (или цитоматрикса), представляющего собой совокупность фибриллярных компонентов цитоплазмы, к которым относятся актиновые филаменты, микротрубочки, промежуточные филаменты.

Результаты исследований по оценке морфологии пронуклеусов на стадии зиготы дали возможность проанализировать эти показатели и соотнести их с уровнем имплантации и наступления беременности.

Разработка морфологических критериев для оценки и неинвазивной селекции зигот проводилась параллельно несколькими группами исследователей в конце 90-х гг. прошлого столетия (Scott and Smith, 1998; Tesarik and Greco, 1999; Tesarik et al., 2000; Wittemer et al., 2000; Montag et al., 2001). Во всех этих исследованиях принимались во внимание морфологические особенности зиготы, такие как размер пронуклеусов, количество ядрышек и их распределение в пронуклеусах, а также морфология цитоплазмы (рис. 4.22).

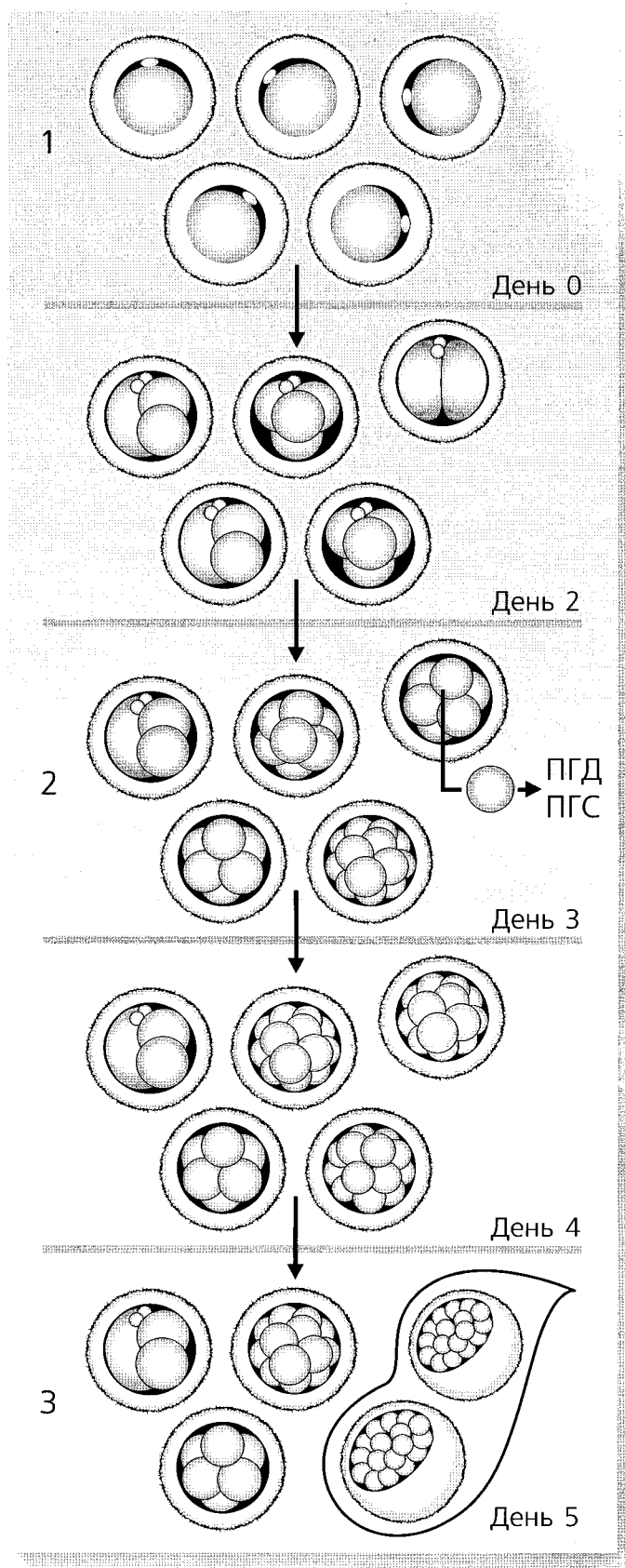


Рис. 4.21. Хронология этапов скрининга эмбрионов. Схема: 1 – оценка полученных ооцитов, при необходимости проведения кокультивирования (IVM); 2 – морфологическая оценка на 3-й день культивирования, скрининг эмбрионов на хромосомную или генную мутацию с помощью ПГД или ПГС; 3 – селекция бластоцист для переноса.

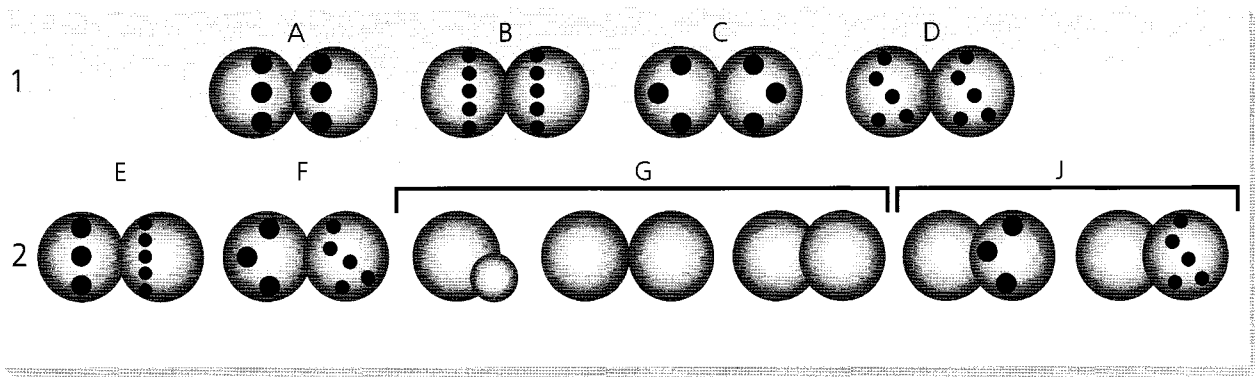


Рис. 4.22. Первая классификация презембрионов, основанная на морфологических особенностях пронуклеусов зиготы (цит. по Kahraman et al., 2002). Схема: 1 – группа I (A-D – варианты нормы); 2 – группа II (E-J – различные варианты положения, размера, распределения, прозрачности, однородности пронуклеусов и пронуклеарного гало).

Современную морфологическую оценку зигот проводят с учетом следующих параметров:

- наличие двух пронуклеусов и двух полярных телец;
- размер пронуклеусов;
- распределение ядрышек в пронуклеусах;
- форма оплодотворенной клетки;
- аномалии зоны пеллюцида (уплотнение, наличие выпячиваний).

Такой анализ осуществляют с помощью компьютерных программ. **Фото. 4.8** демонстрирует различные варианты аномалий зигот.

Проникновение сперматозоида в ооцит служит стимулом к завершению второго мейотического деления, во время которого образуется второе полярное тельце, ооцит второго порядка становится зрелой яйцеклеткой с четко визуализированным ядром. Ядро яйцеклетки после завершения второго мейотического деления во время оплодотворения и приобретения им пузыревидной формы называют женским пронуклеусом. Ядро сперматозоида в цитоплазме яйцеклетки деконденсируется и преобразуется в мужской пронуклеус. Пронуклеусы представляют собой гаплоидные ядра сперматозоида и ооцита перед моментом оплодотворения. Во время завершения второго мейотического деления яйцеклетки мужской пронуклеус увеличивается в размерах. Ядра обоих пронуклеусов начинают сближаться, двигаясь

навстречу друг другу, их мембраны разрушаются, происходит конденсация хроматина с образованием видимых хромосом, которые прикрепляются к нитям веретена деления. Слияние пронуклеусов называется кариогамией. Восстановление диплоидного набора происходит не у зиготы, а у двухклеточного эмбриона.

Этап, на котором происходит сближение пронуклеусов, заинтересовал ученых в связи с возможностью анализа этого процесса в рамках оценки презембрионов, полученных в условиях *in vitro*. Первое систематическое наблюдение за морфологическими особенностями ядрышек было проведено в 1999 г. Ученые предложили критерии селекции эмбрионов для переноса, в основе которой лежит оценка расположения ядрышек во время соединения двух пронуклеусов в зиготе (Tesarik and Greco, 1999). Несинхронность процессов формирования и поляризации ядрышек может серьезно нарушить дальнейшее развитие преимплантационного эмбриона.

Другая группа исследователей предложила при оценке зигот учитывать состояние цитоплазмы и уровень поляризации ядрышек в пронуклеусах (Scott and Smith, 1998). Согласно их наблюдениям благоприятный прогноз коррелирует с наличием у зигот прозрачного ореола вокруг цитоплазмы, а также с ее гетерогенным составом (Ludwig et al., 1999; Ebner et al., 2003b).

Необходимо учитывать, что примерно у 1% зигот в момент проведения оценки полярные тельца и пронуклеусы не визуализируются, что может быть результатом либо аномальной скорости развития, либо интенсивной грануляции, которая не позволяет визуализировать пронуклеусы.

Оплодотворение вызывает также изменения в цитоплазме, а именно перемещение органелл. Эти перемещения играют роль в процессах клеточной дифференциации при последующем развитии. Непосредственно перед ростом пронуклеуса органеллы клетки перемещаются к середине клетки, что визуализируется при микроскопическом анализе в виде прозрачного ореола (гало). Этот феномен, представляющий манифестацию опосредованного микротрубочками перемещения митохондрий и других компонентов цитоплазмы, в том числе эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, наблюдается у человека и других млекопитающих. Эффект цитоплазматического ореола характерен для 2/3 всех ооцитов. Несмотря на то, что физиологическое значение перемещения клеточных органелл требует дальнейшего объяснения, установлено, что наличие ореола коррелирует с качеством эмбриона.

Следующий уровень скрининга преэмбрионов – их оценка на 2-3-й день. После осуществления процесса оплодотворения зигота с ее новым генетическим потенциалом и новым распределением цитоплазмы приступает к серии митотических делений – процессу дробления, в результате которого огромный объем цитоплазмы яйцеклетки последовательно распределяется в клетках меньшего размера. Это приводит к тому, что размеры эмбриональных клеток – бластомеров – уменьшаются до уровня соматических. Сначала оплодотворенная яйцеклетка делится на две части, затем на четыре, восемь и т. д. Процесс дробления имеет целый ряд специфических особенностей, которые включают относительно медленный темп делений, своеобразное расположение бластомеров по отношению друг к другу, асинхронность раннего дробления и наличие процесса компактизации. Во время компактизации рыхло расположенные бластомеры сближаются, увеличивается площадь контакта

между ними, они образуют бластоцисту – компактный клеточный шар с трудноразличимыми при прижизненном наблюдении границами между отдельными бластомерами. Первое клеточное деление после образования зиготы происходит в среднем между 20-м и 27-м часами после инсеминации. Наблюдения за первым делением зигот, полученных в циклах IVF, показали, что некоторые эмбрионы характеризуются более быстрым дроблением в культуре (Balakier et al., 1993; Shoukir et al., 1997). Эти данные необходимо учитывать при назначении даты переноса эмбрионов в полость матки.

Первые результаты исследований соотношения морфологических показателей эмбрионов с исходом лечебной программы не дали объективной картины, поскольку проводился перенос нескольких эмбрионов с различным качеством (Hoover et al., 1995). Перенос единичных эмбрионов позволил проанализировать связь между качеством переносимого эмбриона и наступлением беременности.

Оценку качества эмбрионов осуществляют по морфологическим признакам, среди которых основными являются скорость дробления – число бластомеров, их размер, степень фрагментации, наличие раннего дробления эмбрионов. Однако следует учитывать тот факт, что эмбрионы с высокими показателями качества не всегда развиваются до стадии бластоцисты (5-й день развития), в то время как эмбрионы низкого качества могут развиваться до стадии бластоцисты (Rijnders and Jansen, 1998). Наиболее сложно проводить оценку эмбрионов на стадии морулы и во время компактизации. Рассмотрим более подробно параметры, которые учитывают при оценке качества эмбриона.

При морфологической оценке эмбрионов учитывают количество и размер бластомеров. После первого митотического деления зиготы последующее деление клеток в большинстве случаев происходит равномерно, однако в отдельных случаях наблюдается неравномерное деление клеток, что приводит к появлению бластомеров разного размера. Эмбрионы со значительно различающимися по размеру бласто-

мерами обладают сниженным потенциалом к имплантации, что объясняется наличием бластомеров с аномальным набором хромосом или повышенным содержанием многоядерных бластомеров (Giorgetti et al., 1995; Ziebe et al., 1997; Hnida et al., 2004; Thurin et al., 2005). Хромосомные аномалии в неравномерно дробящихся эмбрионах широко распространены. Примерно у 30% эмбрионов человека, полученных в результате IVF, отмечают аномальный хромосомный набор (Marquez et al., 2000; Gamiz et al., 2003; Rubio et al., 2003). Этот показатель может достигать 60% среди эмбрионов пациентов с неблагоприятным прогнозом исхода программы IVF, как, например, при слабом ответе яичников на гормональную стимуляцию, у пациенток старшей возрастной группы с неудачными программами IVF или привычным невынашиванием в анамнезе (Gianaroli et al., 1999; Gamiz et al., 2003; Rubio et al., 2003). Для эмбрионов с признаками дисморфизма, медленным развитием, а также остановкой развития характерен повышенный уровень полиплоидии по сравнению нормально развивающимися эмбрионами человека (Munne et al., 1995; Marquez et al., 2000; Gamiz et al., 2003). Повышенную частоту анеуплоидии наблюдают у эмбрионов с высокой степенью фрагментации, а также у эмбрионов с бластомерами разного размера (Hardarson et al., 2001; Gamiz et al., 2003). Примерно 25% анеуплоидных эмбрионов достигают стадии бластоцисты по сравнению с 62% эуплоидных (Rubio et al., 2003). Исследователи отмечают низкую частоту случаев моносомии на стадии бластоцисты, тогда как эмбрионы с трисомией могут достигать стадии бластоцисты, имплантироваться в полости матки и быть причиной невынашивания беременности, что выявляют при цитогенетическом анализе спонтанных абортусов (Sandalinas et al., 2001; Rubio et al., 2003). Некоторые анеуплоидные эмбрионы все же достигают стадии бластоцисты, и перенос таких эмбрионов в полость матки приводит к отсутствию имплантации или наступлению беременности с ее последующим преждевременным прерыванием. ПГД позволяет проводить скрининг хромосомных аномалий в таких эмбрионах.

Наличие двух и более ядер в клетке, а также фрагментация ядра сопряжены с аномалиями эмбриона. Для эмбрионов с неравномерным размером клеток характерно повышенное количество многоядерных бластомеров (Hnida et al., 2004). Эмбрионы с многоядерными бластомерами обычно в полость матки не переносят. Первые наблюдения за многоядерными эмбрионами были проведены К. Харди и соавт., которые показали, что 17% эмбрионов, полученных в результате оплодотворения, имеют, по меньшей мере, один двуядерный бластомер, тогда как бластомеры с фрагментированными ядрами встречаются редко (Hardy et al., 1993). Дальнейшее исследование показало, что треть эмбрионов, содержащих на двухклеточной стадии бластомеры с двумя и более ядрами, после следующего дробления содержат одноядерные бластомеры (Staessen and Van Steirteghem, 1998). Исследователи предположили, что некоторые клетки с более чем одним ядром способны делиться нормально, при этом клеточное деление может в некоторой степени отставать от деления ядра. Выделяют следующие категории многоядерных эмбрионов:

- два или более ядер с абсолютно хаотичным хромосомным набором;
- два или более ядер, каждое из которых имеет диплоидный хромосомный набор.

При морфологической оценке эмбрионов учитывают степень фрагментации. В большинстве случаев деление клеток эмбриона происходит равномерно, при этом образуются бластомеры одинаковых размеров, включения отсутствуют. В ряде случаев между бластомерами формируются особые включения – фрагменты. Цитоплазматическая фрагментация представляет собой один из наиболее явных дефектов, оценка которого распространена в эмбриологической практике (**фото 4.9**).

Фрагментированные эмбрионы содержат бластомеры различных размеров с несколькими безъядерными клеточными фрагментами, в которых присутствуют органеллы и клеточные белки. Средний размер бластомеров фрагментированных эмбрионов значительно меньше нормальных и зависит от степени фрагментации. Низкая степень фрагментации

не приводит к апоптозу эмбриона и не нарушает процесс дальнейшего дробления; в некоторых случаях наблюдается рассасывание фрагментов. Источником фрагментации предположительно выступает цитоплазма другого, разрушенного в процессе деления blastomera. Причины и механизмы явления фрагментации до конца не изучены. Существует предположение, что в возникновении избыточного количества фрагментов в ходе процедуры культивирования принимают участие активные формы кислорода.

Степень фрагментации влияет на дальнейшее развитие эмбриона (Plachot et al., 1987; Ebner et al., 2003b). Частота наступления беременности обратно пропорциональна степени фрагментации эмбриона (Ebner et al., 2001). Если фрагментация занимает не более 30% объема эмбриона, такой эмбрион способен развиваться. При росте этого показателя, как правило, происходит деградация эмбриона. Высокая степень концентрации фрагментов значительно снижает потенциал эмбриона к имплантации и может ассоциироваться с высоким уровнем апоптотических событий и наличием хромосомной аномалии, в том числе мозаицизма (Plachot et al., 1987; Pellestor et al., 1994; Munne and Cohen, 1998; Ebner et al., 2003b).

Разработана система оценки фрагментации эмбрионов, согласно которой выделяют несколько типов фрагментации, обуславливающей затем различный исход программ ЭКО и ЭКО с ICSI. Согласно классификации М. Аликани и соавт. различают пять типов фрагментации. Типы 1 и 2 ассоциируются с лизисом отдельных blastomeres. Тип 3 является наиболее распространенным и предполагает разброс фрагментов по всему эмбриону. Фрагментация типов 1, 2 и 3 обычно наблюдается у женщин возрастом до 38 лет. При типах 4 и 5 фрагментация составляет 50% общего объема, в таких случаях вероятность наступления беременности минимальна, поскольку при этом наблюдаются зернистые и некротические blastomeres (Alikani et al., 2000).

Отдельные эмбриологические лаборатории предлагают проводить процедуру удаления фрагментации с помощью микрома-

нипуляционных технологий. Однако указанная процедура является инвазивной, поэтому целесообразность ее использования весьма противоречива.

Производят также временную оценку дробления эмбрионов: для эмбрионов полученных в лечебной программе ЭКО или ЭКО с ICSI характерно раннее дробление (через 25-27 ч после инсеминации и через 23-24 ч после ICSI). Для эмбрионов с ранним дроблением характерна высокая вероятность имплантации в полости матки и последующего развития (Shoukir et al., 1997; Fenwick et al., 2002; Ebner et al., 2003b). Частота наступления беременности после переноса эмбрионов с ранним дроблением в два раза превышает таковой показатель в циклах ЭКО, в которых не выявляют эмбрионы с ранним дроблением (33,3 и 14,7%, соответственно) (Shoukir et al., 1997). Подобные результаты были получены и другими исследователями (Sakkas et al., 1998; Lundin et al., 2001; Van Montfoort et al., 2004). Отбор таких эмбрионов для переноса позволяет существенно повысить частоту наступления беременности. Причины, по которым раннее дробление позволяет получить эмбрионы более высокого качества и, соответственно, более высокую частоту наступления беременности, до конца не изучены. Предполагают, что такие зиготы развиваются из ооцитов с адекватно синхронизированным созреванием цитоплазмы и ядра. Кроме того, следует учитывать тот факт, что при проведении микроинъекции сперматозоида в ооцит существенно сокращается временной интервал, затрачиваемый на оплодотворение, так как данный метод позволяет пропустить отдельные этапы, включая акросомную реакцию и связывание с зоной пеллюциды. Для ооцитов, созревающих *in vitro*, при последующем оплодотворении характерна задержка дробления эмбрионов. Раннее дробление эмбрионов не зависит от характеристик сперматогенеза, особенностей фолликулогенеза или самого протокола стимуляции овуляции.

В рамках морфологического анализа эмбрионов на 3 день культивирования производят оценку степени их компактизации (явление ранней компактизации). Явление ранней компактизации отмечают в популя-

ции более динамично развивающихся эмбрионов с более благоприятными морфологическими характеристиками. В большинстве случаев в рамках программ IVF такие эмбрионы используют в процедуре переноса. Связь между возрастом женщины, ответом яичников на стимуляцию овуляции и ранней компактизацией эмбрионов в условиях культивирования не выявлена. Эмбриологов интересует вопрос о том, является ли ранняя компактизация признаком ускоренного темпа дробления эмбрионов, или же лишь признаком, специфическим для развития эмбрионов в условиях культуры.

Все описанные выше параметры морфологии эмбрионов позволяют создать строгую систему оценки их качества, которая используется в IVF клиниках. Разработан целый ряд кумулятивных оценочных систем: каждый из показателей получает баллы с последующим подсчетом их общего количества, определяющего качество эмбриона (Steer et al., 1992; Visser and Fourie, 1993). Ряд исследователей отмечают преимущество системы, в которой каждый показатель оценивается индивидуально, при этом каждый отдельный показатель соотносят с общим уровнем максимально эффективного результата. В приложении представлены различные морфологические варианты, которые можно наблюдать при проведении оценки эмбрионов (**фото 4.9, 4.10**).

Нередко в практике эмбриологии наблюдают явление остановки развития эмбриона. Как известно, развитие оплодотворенной яйцеклетки, дробление, формирование бластоцисты и процесс имплантации зависят от успешного выполнения генетической программы, заложенной в ооците. Низкое качество ооцита может обуславливать высокую частоту потери эмбрионов в программах ВРТ, приводя к остановке их развития – апоптозу. Программированная гибель клетки – это точно скоординированная серия событий, которые зависят от действия и взаимодействия не менее 100 генных продуктов, подавляющих или активирующих процесс клеточного самоуничтожения путем изменения относительного содержания про- и антиапоптотических белков (Jurisicova and Acton, 2004). Соот-

ветственно, относительное содержание этих белков определяет, выживет клетка или погибнет.

Генетический контроль апоптоза является предметом интенсивных исследований. Наиболее детально среди этих факторов изучены белки семейства BCL2, которые можно подразделить на две группы: супрессоры клеточной гибели (BCL2, BCLxL, BCLw, MCL1, A1) и индукторы клеточной гибели (BAX, BAD, Mtd, BH3-only proteins) (Adams and Cory, 2001; Spanos et al., 2002). Индукторы клеточной гибели, в свою очередь, классифицируют на мультидоменные (BAX, BAK, MTD) и однодоменные (BAD, BIM, HRK, BID).

При исследовании экспрессии генов семейства BCL2 было установлено, что баланс между экспрессией про- и антиапоптотических генов может быть центральным фактором, определяющим выживание эмбриона. Уровень экспрессии нескольких членов семейства генов BCL2 (включая проапоптотические BAX, HRK, а также антиапоптотические BAG1 и MCL1) в ооцитах человека на стадии метафазы II измеряли с помощью количественной дот-гибридизации и ПЦР. В соответствии с профилями экспрессии генов ооциты были распределены по трем категориям: 1) клетки, предрасположенные к гибели в результате дисбаланса в сторону проапоптотических генов; 2) клетки, предрасположенные к выживанию вследствие высокого уровня экспрессии антиапоптотических факторов; 3) ооциты, в которых наблюдается баланс между экспрессией про- и антиапоптотических генов.

Следующий этап оценки преэмбриона – анализ на стадии бластоцисты (день пятый или шестой). Морфологически бластоциста представляет собой бластодермический пузырек с двумя типами клеток: наружный слой клеток, которые образуют трофобласт, и внутренняя клеточная масса, которая развивается непосредственно в плод. Трофобласт обеспечивает контакт между зародышем и материнским организмом, иницируя имплантацию, и вместе с клетками эндометрия матки образует плаценту (**рис. 4.23**).

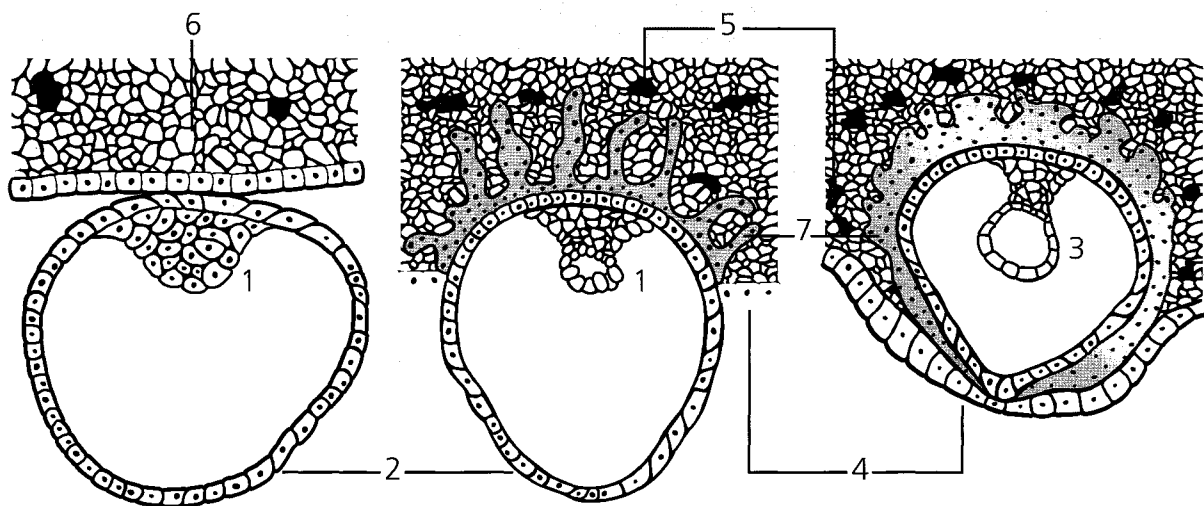


Рис. 4.23. Развитие бластоцисты. Схема:

1 – внутренняя клеточная масса; 2 – трофобласт; 3 – строма матки; 4 – капилляр;
5 – эпителий матки; 6 – плод; 7 – синцитиотрофобласт.

За прошедшие два десятилетия накоплены данные о возможности продленного культивирования эмбрионов (до стадии бластоцисты). Первоначально при попытке культивирования до четырех–пяти сут такие эмбрионы останавливались в развитии. Разработка нового поколения питательных сред для культивирования эмбрионов позволила получить развитие эмбрионов до стадии бластоцисты, исследовать метаболические процессы эмбрионов на стадии дробления и бластоцисты, повысить показатель имплантации. Таким образом, одним из потенциальных преимуществ продолжительного культивирования *in vitro* является возможность неинвазивной селекции эмбрионов с предположительно более высоким потенциалом к имплантации. Известно, что эмбриональное развитие в первые два дня контролируется материнскими транскриптами, геном самого эмбриона начинает транскрибироваться с третьего дня его развития. Благодаря продленному культивированию возможно идентифицировать эмбрионы, подверженные блокированию развития на второй или третий день, что позволяет произвести их селекцию с целью переноса наиболее компетентных.

Сторонники переноса эмбрионов на уровне бластоцисты считают, что селекция

эмбриона на второй или третий день, основанная на морфологических критериях, не является точной и может привести к переносу аномальных эмбрионов или эмбрионов, которые могут остановиться в развитии на более поздних стадиях. Соответственно, необходимо проведение продленного культивирования эмбрионов до четырех или пяти дней.

Взвешивая все "за" и "против" продленного культивирования *in vitro*, необходимо помнить, что любое продление процесса культивирования может сопровождаться риском возникновения дополнительных факторов, способных негативно повлиять на преимплантационное развитие (изменение температуры, дополнительное воздействие света и изменение уровня pH).

Поскольку накопленные данные не позволяют однозначно оценить целесообразность применения продленного культивирования эмбрионов, исследователи рекомендуют проводить перенос бластоцист только при наличии достаточного количества эмбрионов с благоприятным прогнозом бластуляции. Такое решение необходимо принимать при условии отсутствия других факторов, которые потенциально могли бы нарушить формирование бластоцисты, включая возраст женщины или суб-

фертильность мужчины.

Оценку бластоцист производят с учетом морфологических критериев (Dokras et al., 1993; Schoolcraft et al., 1999). Первая трехступенчатая классификация с учетом критериев жизнеспособности бластоцист была предложена в 1993 г. (Dokras et al., 1993). В основу этой классификации легли оценка скорости развития эмбриона до стадии бластоцисты и морфологические характеристики: I – нормальные бластоцисты, которые характеризуются ранней кавитацией, что приводит к образованию отчетливых внутренней клеточной массы и трофобласта; II – бластоцисты с задержкой развития, отчетливо видимая внутренняя клеточная масса и трофобласт появляются на один–два дня позже; III – бластоцисты с дегенерацией каких-либо структур. В 1999 г. У. Скулкрафт и соавт. предложили другую дополненную классификацию, позволяющую выявлять зрелые и жизнеспособные бластоцисты (Schoolcraft et al., 1999). Указанная классификация выделяет следующие стадии зрелости бластоцисты:

I стадия – ранняя бластоциста, бластоцелле которой составляет менее половины объема эмбриона;

II стадия – бластоцелле составляет более половины объема эмбриона;

III стадия – бластоцелле составляет полный объем эмбриона;

IV стадия – разросшаяся бластоциста, бластоцелле увеличивается в размере, зона пеллюцида начинает истончаться;

V стадия – трофодерма начинает проникать сквозь зону пеллюцида;

VI стадия – бластоциста после естественного хэтчинга.

Согласно этой классификации в полость матки рекомендуют переносить бластоцисты III, IV, V, VI степеней зрелости.

Размеры и форма бластоцелле имеют большое значение для имплантации и дальнейшего развития эмбриона, поскольку слияние бластоцисты с эпителием эндометрия начинается с полюса, расположенного над внутриклеточной массой. Размер бластоцелле наиболее важен для последующей имплантации. На основе этого параметра разработана современная классификация: А – плотноупакованное бластоцелле с боль-

шим количеством клеток; В – менее плотноупакованное бластоцелле со средним количеством клеток; С – бластоцелле с незначительным количеством клеток. Система оценки трофодермы включает следующие ступени: А – наличие большого количества клеток, формирующих трофодерму; В – небольшое количество клеток; С – небольшое количество крупных клеток. Плотноупакованное бластоцелле с большим количеством клеток представляет класс А (наиболее качественные бластоцисты), тогда как к классу В условно относят бластоцисты, у которых бластоцелле состоит из небольшого количества более свободно сгруппированных клеток. Класс С составляют бластоцисты, у которых бластоцелле содержит очень малое количество клеток. Такая система оценки бластоцист, согласно которой переносят бластоцисты класса А, позволяет обеспечить высокий показатель имплантации.

Бластоцисты с овальным бластоцелле размером более 450 мкм имплантируются чаще по сравнению с имеющими более круглую и меньшую по размеру внутриклеточную массу (Richter et al., 2001).

Оценка эмбрионов на стадии бластоцисты позволяет отобрать эмбрионы с высоким жизненным потенциалом, предотвратить многоплодную беременность и провести косвенную селекцию эмбрионов с хромосомными аномалиями, так как последние имеют сниженный потенциал к развитию. До 65% анеуплоидных эмбрионов останавливаются в развитии до стадии компактизации, тогда как количество эуплоидных эмбрионов с остановкой развития составляет 28% (Sandalinas et al., 2001; Clouston et al., 2002).

Таким образом, эмбриологи производят неинвазивную селекцию эмбрионов на второй и третий дни развития, а в случае продленного культивирования – на пятый день.

4.3.5. Вспомогательные микроманипуляции с эмбрионами

Современные вспомогательные микроманипуляции с эмбрионами производят с использованием лазерной системы. Первые работы по применению лазера в микроманипуляциях с гаметам и эмбрионами были проведены в 1988 г. Первоначально исследования по воздействию лазера на зону пеллюцида проводились на ооцитах мышей, хомяков (Wassarman, 1988; Cohen et al., 1990; Hughes and Barratt, 1999; Ebner et al., 2005). В 1990 г. благодаря разработкам Д. Коэна в клиническую практику была внедрена технология насечек (штриховка), выполняемая с помощью лазерной системы (лазерный вспомогательный хэтчинг) (Cohen et al., 1990). В эти же годы с помощью лазерной установки впервые были получены полярные тельца (первое и второе) для проведения преимплантационной диагностики. Первоначально полярное тельце извлекали механическим путем (частичное иссечение зоны) или химическим (с помощью раствора Тироде). Использование лазерной установки значительно облегчило проведение этих манипуляций и в настоящее время является рутинной процедурой. Наиболее распространено использование диодного лазера, который относится к полупроводниковым. Лазерный модуль, содержащий диод, электронную панель и коллимированные линзы встраивают в инвертированный микроскоп. Такую систему используют в качестве оптимального инструмента для проведения микроманипуляций в IVF лаборатории (**фото 4.11**).

Для эмбриологических лабораторий разработаны компьютерные программы, которые позволяют выбирать режим воздействия луча на объект, проводить измерение размера полученного отверстия, толщины зоны пеллюцида, диаметра эмбриона и пронуклеусов, уточнять область, наиболее оптимальную для проникновения в клетку.

Лазерную установку применяют при манипуляциях со сперматозоидами, для сверления (прокола) ооцитов, для микроинъекции сперматозоида в ооцит, пе-

рениса ядер и цитоплазмы, удаление фрагментации, для проведения вспомогательного хэтчинга, забора полярных телец или бластомеров в преимплантационной диагностике наследственной патологии.

Рассмотрим более подробно наиболее распространенные инвазивные методы микроманипуляций с эмбрионами: удаление фрагментации, вспомогательный хэтчинг, ПГД.

Как было рассмотрено выше, наличие фрагментации влияет на развитие эмбриона. В некоторых эмбриологических лабораториях производят **удаление фрагментированного клеточного материала**. Впервые "косметическая" микроманипуляция была предложена М. Аликани и соавт. для улучшения качества эмбрионов (Alikani et al., 1999). Для проведения этой микроманипуляции используют лазерную установку и с помощью микроинструментов из полости эмбриона осторожно удаляют фрагменты. Как показывает опыт работы Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина) и других медицинских центров, удаление фрагментации отрицательно сказывается на дальнейшем развитии эмбриона, поэтому вопрос о необходимости использования этой технологии остается открытым.

Следующей инвазивной технологией является **вспомогательный хэтчинг**. Одним из факторов успешного проведения программ ЭКО и ЭКО с ICSI является способность эмбриона имплантироваться в стенке матки, что, в свою очередь, зависит от качества самого эмбриона и состояния зоны пеллюцида. Как известно, ооцит и преимплантационный эмбрион окружены защитной двухслойной оболочкой – зоной пеллюцида, толщина которой составляет 13-15 мкм. Зона пеллюцида выполняет защитную роль после оплодотворения естественным путем, не позволяя другим сперматозоидам проникнуть под нее, а также облегчая и предохраняя транспорт эмбриона во время его прохождения по маточным трубам. При попадании эмбриона в полость матки зона пеллюцида истончается, эмбри-

4.3.5. Вспомогательные микроманипуляции с эмбрионами

Современные вспомогательные микроманипуляции с эмбрионами производят с использованием лазерной системы. Первые работы по применению лазера в микроманипуляциях с гаметами и эмбрионами были проведены в 1988 г. Первоначально исследования по воздействию лазера на зону пеллюцида проводились на ооцитах мышей, хомяков (Wassarman, 1988; Cohen et al., 1990; Hughes and Barratt, 1999; Ebner et al., 2005). В 1990 г. благодаря разработкам Д. Коэна в клиническую практику была внедрена технология насечек (штриховка), выполняемая с помощью лазерной системы (лазерный вспомогательный хэтчинг) (Cohen et al., 1990). В эти же годы с помощью лазерной установки впервые были получены полярные тельца (первое и второе) для проведения преимплантационной диагностики. Первоначально полярное тельце извлекали механическим путем (частичное иссечение зоны) или химическим (с помощью раствора Тироде). Использование лазерной установки значительно облегчило проведение этих манипуляций и в настоящее время является рутинной процедурой. Наиболее распространено использование диодного лазера, который относится к полупроводниковым. Лазерный модуль, содержащий диод, электронную панель и коллимированные линзы встраивают в инвертированный микроскоп. Такую систему используют в качестве оптимального инструмента для проведения микроманипуляций в IVF лаборатории (**фото 4.11**).

Для эмбриологических лабораторий разработаны компьютерные программы, которые позволяют выбирать режим воздействия луча на объект, проводить измерение размера полученного отверстия, толщины зоны пеллюцида, диаметра эмбриона и пронуклеусов, уточнять область, наиболее оптимальную для проникновения в клетку.

Лазерную установку применяют при манипуляциях со сперматозоидами, для сверления (прокола) ооцитов, для микроинъекции сперматозоида в ооцит, пе-

реноса ядер и цитоплазмы, удаления фрагментации, для проведения вспомогательного хэтчинга, забора полярных телец или бластомеров в преимплантационной диагностике наследственной патологии.

Рассмотрим более подробно наиболее распространенные инвазивные методы микроманипуляций с эмбрионами: удаление фрагментации, вспомогательный хэтчинг, ПГД.

Как было рассмотрено выше, наличие фрагментации влияет на развитие эмбриона. В некоторых эмбриологических лабораториях производят **удаление фрагментированного клеточного материала**. Впервые "косметическая" микроманипуляция была предложена М. Аликани и соавт. для улучшения качества эмбрионов (Alikani et al., 1999). Для проведения этой микроманипуляции используют лазерную установку и с помощью микроинструментов из полости эмбриона осторожно удаляют фрагменты. Как показывает опыт работы Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина) и других медицинских центров, удаление фрагментации отрицательно сказывается на дальнейшем развитии эмбриона, поэтому вопрос о необходимости использования этой технологии остается открытым.

Следующей инвазивной технологией является **вспомогательный хэтчинг**. Одним из факторов успешного проведения программ ЭКО и ЭКО с ICSI является способность эмбриона имплантироваться в стенку матки, что, в свою очередь, зависит от качества самого эмбриона и состояния зоны пеллюцида. Как известно, ооцит и преимплантационный эмбрион окружены защитной двухслойной оболочкой – зоной пеллюцида, толщина которой составляет 13-15 мкм. Зона пеллюцида выполняет защитную роль после оплодотворения естественным путем, не позволяя другим сперматозоидам проникнуть под нее, а также облегчая и предохраняя транспорт эмбриона во время его прохождения по маточным трубам. При попадании эмбриона в полость матки зона пеллюцида истончается, эмбри-

он освобождается от оболочки, происходит естественный хэтчинг – так называемое сползание оболочки и "проклевывание" эмбриона (**фото 4.12**).

В основе процесса естественного хэтчинга лежит выработка литических ферментов клетками трофодермы – непосредственно перед хэтчингом трофодерма эмбриона экспрессирует стрипсин. Благоприятный исход процесса хэтчинга зависит от толщины и эластичности оболочки. У женщин старшей возрастной группы толщина и плотность оболочки меняется, что обусловлено молекулярными изменениями в самой оболочке (Horng et al., 2002; Petersen et al., 2002).

В отличие от естественного оплодотворения в стимулированных циклах в рамках программ ЭКО и ЭКО с ICSI наблюдаются асинхронность между развитием эмбриона и "окном" имплантации в эндометрии, при этом "окно" имплантации сдвигается, соответственно время для имплантации эмбрионов ограничено, что может обуславливать низкую частоту наступления беременности. Перед учеными возник вопрос об улучшении условий имплантации эмбрионов после их переноса в полость матки (Seif et al., 2006). Исследования состояния зоны пеллюцида эмбрионов, полученных *in vitro*, показали, что толщина и плотность оболочки влияют на показатель имплантации (Rienzi et al., 2004, Seif et al., 2006). В первые годы применения ЭКО высокий процент эмбрионов с уплотнением зоны пеллюцида объяснялся отсутствием в культуральных средах необходимых для хэтчинга лизинов (Cohen and Wiemer, 1992).

Для улучшения показателя имплантации эмбрионов с уплотненной зоной пеллюцида Д. Коэн и коллеги разработали манипуляцию вспомогательного хэтчинга (АН), представляющую собой эмбриологическую микроманипуляцию, в ходе которой производят рассечение или надсечение зоны пеллюцида эмбриона в определенной фазе его развития для облегчения освобождения от оболочки и повышения вероятности имплантации (Cohen et al., 1990). Первые наблюдения ученых

показали, что надсечение или просверливание блестящей оболочки эмбриона повышает вероятность имплантации эмбрионов. В 1992 г. были опубликованы результаты исследования по применению вспомогательного хэтчинга в ВРТ, которые продемонстрировали высокие показатели: после применения вспомогательного хэтчинга частота наступления беременности и имплантации эмбрионов составила 51,8 и 26,5%, соответственно, тогда как в контроле – 37,3 и 18,7%, соответственно (Cohen et al., 1992). Указанную методику успешно применяют в клиниках IVF. Наиболее распространенные показания к применению вспомогательного хэтчинга приведены в **табл. 4.5**.

Известно несколько видов вспомогательного хэтчинга: механический, химический, лазерный хэтчинг, пьезо-методика, полное удаление зоны пеллюцида. Первыми были разработаны и использованы в эмбриологической практике предложенные Д. Коэном и соавт. механический и химический виды хэтчинга. В ходе этих микроманипуляций эмбрион удерживают микропипеткой, а специальной микроиглой или раствором Тироде в зоне пеллюцида образуют отверстие. При механическом хэтчинге образуют одно отверстие под углом, чтобы не задеть клетки эмбриона, а затем второй прокол производят под углом к первому. Такие проколы снижают плотность оболочки и способствуют "проклевыванию" эмбриона. Химический хэтчинг подразумевает использование в микродозах раствора Тироде, который наносят на поверхность эмбриона в определенном участке, что вызывает растворение оболочки. Избыток раствора отсасывают, после чего эмбрионы несколько раз отмывают для удаления остатков раствора.

Лазерный хэтчинг был впервые использован в 1991 г. (Tadir et al., 1991). Известны два варианта хэтчинга с помощью лазерной системы: 1) бесконтактный метод – оболочку эмбриона пробивают насквозь под углом; 2) контактный метод, предполагающий использование лазера с очень коротким лучом, который пробивает оболочку и заканчивается непосредственно у эмбриона. Лазерный

Таблица 4.5. Показания к применению вспомогательного хэтчинга

Факторы	Показания
Возраст	Женщины старше 37 лет
Гормональный статус	Женщины с повышенным уровнем ФСГ
Качество эмбрионов	Уплотнение зоны пеллюцида, низкая скорость дробления, высокий уровень фрагментации клеток
Программы ЭКО	Женщины с одной и более неудачными программами ЭКО в анамнезе
Криоконсервированные эмбрионы	Уплотнение зоны пеллюцида после криоконсервирования

хэтчинг позволяет точно контролировать форму и размеры генерированной бреши в зоне пеллюцида. Во избежание возможного влияния лазера на эмбрион и для сглаживания оболочки вместо ее пробивания в большинстве случаев применяют бесконтактный метод с инфракрасным лучом, длина волны которого составляет 1480 нм.

Вспомогательный хэтчинг с помощью пьезо-электрического микроманипулятора осуществляют путем микровибрации с очень высокой частотой. В ходе проведения микроманипуляции на оболочке эмбриона возникают конические углубления – 5-8 впадин на ограниченном участке, что приводит к истончению зоны пеллюцида.

Проведение вспомогательного хэтчинга с полным удалением зоны пеллюцида производят с помощью 0,5-процентного раствора проназы на стадии бластоцисты, так как механический или химический хэтчинг на этой стадии развития эмбриона более травматичен. Последствия применения вспомогательного хэтчинга в практике ВРТ исследуют (Jun and Milki, 2004).

Технология преимплантационной диагностики, или **преимплантационная генетическая диагностика** (ПГД, PGD), относится к инвазивным методам диагностики зрелого ооцита, зиготы, эмбриона, при помощи которой выявляют хромосомную или генную мутацию на преимплантационном уровне, что позволяет производить селекцию эмбрионов и получать беременность изначально здо-

ровым плодом (рис. 4.24).

В основе этого метода лежит микроманипуляция со зрелым ооцитом, зиготой, восьмиклеточным эмбрионом, бластоцистой, в ходе которой осуществляют забор первого или второго полярного тельца, одного, редко двух бластомеров, одной-двух клеток трофодермы, соответственно. Различают два вида диагностики наследственной патологии на преимплантационном уровне – преимплантационный скрининг и преимплантационную диагностику. Преимплантационный скрининг подразумевает выявление наиболее распространенных хромосомных патологий человека (анеуплоидий).

ПГД была разработана с целью определения генетической патологии у эмбриона до его переноса в матку матери, что исключает необходимость последующего прерывания беременности при выявлении патологии у плода (Handyside and Delhanty, 1997). Впервые преимплантационная диагностика была проведена в середине XX ст. на животных. В 1968 г. Р. Эдвардс и Р. Гарднер успешно определили пол эмбрионов кролика, находящихся на стадии бластоцисты, и затем перенесли их в полость матки. Уже тогда ученые предсказали эффективность ПГД, указав, что данный метод позволит производить диагностику наследственной патологии, избегая передачи наследственного заболевания от родителей детям.

Внедрение ПГД в практику вспомогательных репродуктивных технологий обусловлено разработкой молекулярных технологий – полимеразной цепной реак-

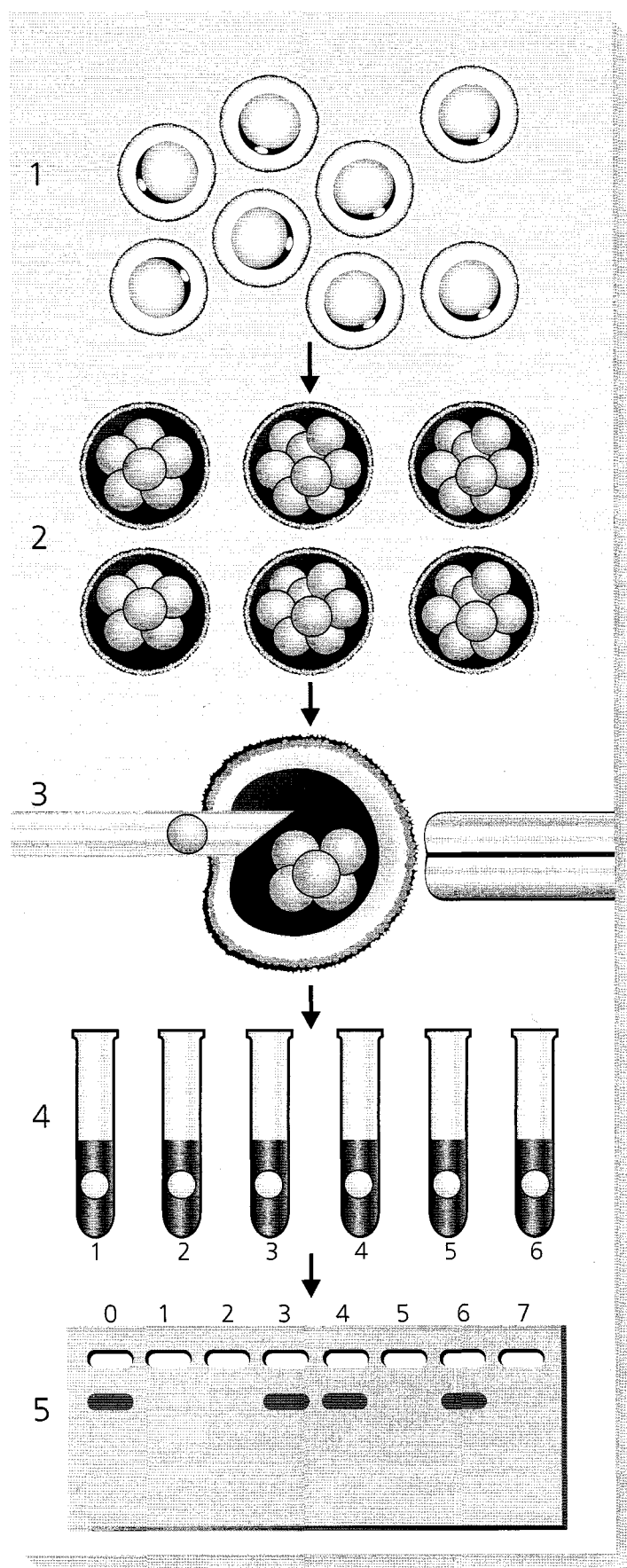


Рис. 4.24. Этапы проведения ПГД. Схема: 1 – извлеченные ооциты; 2 – преэмбрионы; 3 – биопсия бластомера; 4 – выделение ДНК из одной клетки, проведение ПЦР; 5 – анализ ПЦР-продуктов.

ции, позволяющей определять мутации в единичных клетках, и флуоресцентной гибридизации *in situ*, с помощью которой проводят выявление и идентификацию хромосомной патологии. Первая ПГД с помощью ПЦР для установления пола эмбриона была проведена группой исследователей из Лондона во главе с А. Хэндисайдом у супружеской пары с двумя X-сцепленными заболеваниями – адrenoлейкодистрофией и X-сцепленной умственной отсталостью (Handyside et al., 1990). Впоследствии от определения пола с помощью ПЦР отказались в связи с возможным риском постановки ошибочного диагноза. Поскольку в распоряжении ученых вначале был метод ПЦР, первыми наследственными заболеваниями, которые диагностировали на преимплантационном уровне, были моногенные (муковисцидоз и β -талассемия) (Coutelle et al., 1989; Holding and Monk, 1989). Так, в 1992 г. в рамках программы ЭКО были получены эмбрионы, у которых проводилась преимплантационная генетическая диагностика муковисцидоза (Handyside et al., 1992).

Первоначально гибридизацию *in situ* проводили на интерфазных ядрах и метафазах с использованием ДНК зондов, меченных радиоактивными изотопами (ISH), и только спустя несколько лет – флуорохромами (FISH) (Yurov et al., 1987, 1996; Griffin et al., 1991; Delhanty et al., 1993). С 1994 г. FISH применяют в преимплантационной диагностике на полярных тельцах и бластомерах (Harper et al., 1994; Munne et al., 1995). С помощью этого метода проводят скрининг анеуплоидии, выявляют сбалансированный и несбалансированный кариотип (М.И. Кононенко и др., 2006; Conn et al., 1999; Weier et al., 1999; Coonen et al., 2000; Iwarsson et al., 2000; Magli et al., 2000; Escudero et al., 2003; Munne, 2005). Новые молекулярно-цитогенетические технологии, такие как PRINS и сравнительная геномная гибридизация (CGH), расширили возможности ПГД (Pellestor et al., 1996; Bahce et al., 2000; Voullaire et al., 2000; Wells and Delhanty, 2000; Wilton et al., 2001; Sermon, 2002). Перед исследователями стоит целый ряд задач и вопросов: безопасность

манипуляции с эмбрионом и исключение возможности негативного воздействия процедуры на жизнеспособность эмбриона (Bonduelle et al., 1998; Bielanska et al., 2002). Приводит ли мозаицизм, наблюдаемый на ранних преимплантационных стадиях развития эмбриона, к неправильной интерпретации результатов? Какие группы пациентов нуждаются в ПГД? Эти вопросы были успешно решены в течение последних десяти лет благодаря достижениям в области микроманипуляций с гаметам и эмбрионами при помощи лазерных установок, усовершенствованию методов культивирования эмбрионов и непосредственно методов проведения молекулярного или молекулярно-цитогенетического анализов. Показатели развития плодов и результаты наблюдений за здоровьем детей, рожденных после применения ПГД, также указывают на отсутствие негативного влияния упомянутой инвазивной манипуляции.

В последние годы показания к проведению ПГД значительно расширились, их условно можно разделить на четыре группы:

1) Применение ПГД в связи с нарушением репродуктивной функции у одного из супругов:

- наличие в анамнезе нескольких спонтанных выкидышей или рождения ребенка (детей) с одной из наиболее распространенных хромосомных патологий (синдромы Дауна, Патау, Эдвардса);
- неудачи проведения нескольких циклов ЭКО в анамнезе;
- идиопатическое бесплодие;
- мужской фактор бесплодия.

2) Диагностика генетической патологии:

- выявление хромосомной патологии (численных и структурных аномалий хромосом);
- выявление однородительской дисомии (UPD);
- диагностика моногенной патологии:
 - • определение пола эмбриона в связи с X-сцепленной патологией,
 - • диагностика наследственного заболевания в семейном анамнезе, или один из родителей является гетерозиготным носителем,

- • диагностика митохондриальной патологии.

3) Диагностика анеуплоидии хромосом – ПГС в связи с возрастом матери (старше 35 лет).

4) Проведение HLA типирования эбрионов.

Если первоначально ПГД рассматривалась как альтернатива стандартной пренатальной диагностики, то в настоящее время применение этого метода является наиболее оптимальной тактикой при высоком риске передачи генетических заболеваний, а также при нарушении репродуктивной функции у одного из супругов. ПГД проводят в следующих случаях: наличие ребенка (детей) с пороками развития, выявление генетического заболевания у плода в предыдущей беременности, а также для супружеских пар, не приемлющих прерывания беременности. Следует учитывать некоторые ограничения инвазивной преимплантационной диагностики наследственной патологии:

- в случае отсутствия ядра или его разрушения во время биопсии анализ провести невозможно (частота таких случаев составляет 5-15%);
- только 8-10 пар хромосом доступны для анализа анеуплоидии, поэтому существует риск не выявить моносомию или трисомию той хромосомы, на которую не использовали ДНК зонд;
- при наложении хромосом в ядре одна на другую результат FISH отрицательный или искажен; возможно отсутствие связи ДНК зонда с хромосомой ядра, что приводит к ложно-положительному результату;
- существует явление мозаицизма, при котором эмбрион имеет две клеточные линии: одну нормальную, а вторую – с аномальным набором хромосом; в случае анализа только одной клетки результат может быть ложно-положительным или ложно-отрицательным в зависимости от полученной в результате биопсии клетки.

Обязательным следующим за ПГД этапом дородовой диагностики хромосомной патологии является пренатальная диагностика.

Начальный этап проведения ПГД и ПГС предполагает биопсию клетки (первого или второго полярного тельца, одного-двух бластомеров восьмиклеточного эмбриона, клеток трофобласта бластоцисты) с ее последующей обработкой.

Биопсия первого и второго полярных телец позволяет провести не прямое определение хромосомного набора, анализ мутации в женской половой клетке. Первое полярное тельце содержит набор из 23 материнских хромосом, второе полярное тельце – 23 материнские хроматиды.

Технически биопсия полярного тельца достаточно проста. Наиболее распространенный метод – прокол зоны пеллюциды с помощью тонкой иглы и забор клетки или проведение двух перпендикулярных надрезов для введения пипетки. Альтернативой механическому методу является использование лазерной установки.

Первые положительные результаты были получены после биопсии первого полярного тельца для диагностики аутосомно-рецессивных заболеваний (Verlinsky et al., 1990). В настоящее время полярные тельца анализируют для выявления численных хромосомных аномалий, возникновение которых обусловлено повышенной частотой нерасхождения хромосом у женщин старшей возрастной группы (Palermo et al., 2002). Биопсию и последующий анализ полярного тельца рекомендуют также проводить в случае, если женщина является носителем сбалансированной транслокации (Kanavakis and Traeger-Synodinos, 2002). Для ПГС анеуплоидии хромосом возможно одновременное извлечение обоих полярных телец из пронуклеарных зигот, тогда как при проведении ПГД моногенных заболеваний полярные тельца извлекают последовательно. Биопсия второго полярного тельца позволяет сохранить целостность пронуклеарной зиготы, поскольку предполагает использование для анализа лишь побочных продуктов мейоза, т. е. извлекают только нефункциональный материал, что сводит негативное влияние манипуляции на развитие эмбриона к минимуму (Lee and Munne, 2000; Imthurn et al., 2004; Mackie Ogilvie et al., 2005).

Хромосомные аномалии, выявляемые с помощью ПГД

Численные хромосомные аномалии

- Анеуплоидия аутосом
- Анеуплоидия гоносом
- Мозаицизм по половым хромосомам и аутосомам
- Аномалии мейоза у мужчин

Структурные хромосомные аномалии

- Реципрокные транслокации
- Робертсоновские транслокации
- Инверсии
- Делеции
- Инсерции

Рис. 4.25. Перечень хромосомных аномалий, выявляемых с помощью ПГД

Следует учитывать тот факт, что анализ полярного тельца дает информацию исключительно о материнском генотипе и, следовательно, не может быть использован для выявления заболеваний, унаследованных от отца.

Биопсия blastomera на стадии дробления эмбриона (третий день его развития) является наиболее распространенным видом биопсии в рамках проведения ПГД, так как на этой стадии развития эмбриона процесс компактизации клеток еще не наступил. Первоначально биопсию blastomera проводили с помощью прокола (Hardy et al., 1990). Современные методы получения blastomeres включают использование лазерной установки для проникновения сквозь зону пеллюцида. Последовательность проведения процедуры биопсии blastomera для ПГД представлена на **фото 4.13**.

Эмбрион помещают в питательную среду, не содержащую кальций и магний, что позволяет ослабить адгезию клеток,

особенно если эмбрион начал компактизацию, затем фиксируют с помощью микроманипуляторов пипеткой-держателем. Отверстие в зоне пеллюцида получают с помощью лазерной установки, кислотного раствора или механического повреждения, после чего пипеткой извлекают одну, реже две клетки. После проведения биопсии эмбрионы помещают в CO₂-инкубатор до получения результатов анализа.

Преимущество ПГД на стадии дробления эмбриона заключается в возможности анализа патологии как материнского, так и отцовского происхождения, а также аномалий, возникающих после оплодотворения. Биопсию клеток на стадии blastocyst проводят благодаря усовершенствованию методов культивирования и оптимизации состава культуральных сред (так называемое продленное культивирование) (И.К. Гоголевская, 1999; Jones et al., 1998a,б; Gardner et al., 2000; Kokkali et al., 2005).

Таблица 4.6. Риск возникновения синдромов Эдвардса и Патау в связи с возрастом матери (цит. по Gardner and Sutherland, 2004)

Возраст матери, годы	Трисомия хромосомы	
	18	13
15–19	1/17 000	1/33 000
20–24	1/14 000	1/25 000
25–29	1/11 000	1/20 000
30–34	1/7100	1/14 000
35–39	1/2400	1/4800
40–44	1/700	1/1600

Преимущество биопсии на стадии бластоцисты по сравнению с биопсией бластомера заключается в возможности извлечения большего количества клеток для анализа без нанесения при этом ущерба эмбриону (Veiga et al., 1997; Kanavakis and Traeger-Synodinos, 2002). Указанная процедура технически менее сложна по сравнению с биопсией полярного тельца и биопсией бластомера. Первоначально ученые достигли успехов в проведении биопсии бластоцисты на модельных системах (кролики, мыши, коты и обезьяны), показав высокий уровень выживания эмбрионов (Gardner and Edwards, 1968; Gardner, 1971; Summers et al., 1988; Gentry and Critser, 1995). Первые положительные результаты ПГД на бластоцистах человека были получены в начале 90-х гг. (Dokras et al., 1990, 1993). Методика получила распространение во многих лабораториях (Staessen et al., 2004; Kokkali et al., 2005; Shahine and Cedars, 2006). Недостатки метода биопсии эмбрионов на стадии бластоцисты заключаются в том, что стадии бластоцисты в условиях *in vitro* достигает только примерно половина эмбрионов. Следует учитывать также тот факт, что проведение генетического анализа ограничено во времени, в связи с чем второй раунд ПЦР или FISH в случае отрицательного результата не представляется возможным.

Полученная в результате биопсии клетка подвергается обработке для проведения дальнейшего исследования в зависимости от показаний. Анализ хромосомной и моногенной патологии осуществляют с

помощью молекулярно-цитогенетических методов, ПЦР и ее модификаций. Наиболее распространенными методами являются FISH и ПЦР.

Современные подходы к преимплантационной диагностике хромосомной патологии включают FISH с различными модификациями и CGH. Преимплантационную диагностику хромосомной патологии в зависимости от показаний проводят для выявления численных хромосомных аномалий, структурных перестроек хромосом, а также для установления пола эмбриона в связи с X-сцепленной патологией (рис. 4.25).

Согласно ежегодному отчету по применению ВРТ в клиниках различных стран мира примерно в половине случаев применение ПГД обусловлено возрастным фактором женщины (Sermon et al., 2005; Simpson et al., 2006) (табл. 3.5, 4.6).

Преимплантационный скрининг наиболее распространенных хромосомных трисомий (синдромы Дауна, Патау и Эдвардса) проводят по следующим показаниям: возраст матери более 35 лет, наличие в анамнезе случаев самопроизвольных аборт, отсутствие имплантации в нескольких циклах ЭКО с ICSI. Использование ПГС также эффективно при обструктивной и необструктивной азооспермии (Bielanska et al., 2000). Селекция эмбрионов с помощью ПГС способствует повышению эффективности программы IVF, позволяет предотвратить рождение детей с пороками развития. ПГС осуществляют для скрининга наиболее

лее распространенных анеуплоидий хромосом X, Y, 13, 16, 18, 21 и 22 (Munne and Weier, 1996; Munne et al., 1999; Magli et al., 2001; Wilton, 2002). В большинстве случаев ПГС проводят на первом или втором полярном тельце, поскольку большинство хромосомных аномалий имеют материнское происхождение (Munne et al., 2005б, 2006).

Первые исследования, показавшие повышенную частоту выявления случаев анеуплоидии у плодов в группе женщин старше 35 лет, были проведены Л. Джанароли и соавт. (Gianaroli et al., 1999). Согласно этим исследованиям при распределении результатов в соответствии с возрастом пациенток на четыре группы (36-37 лет – I группа, 38-39 лет – II группа, 40-42 года – III группа и старше 43 лет – IV группа) наблюдают пропорциональное увеличение числа случаев хромосомных аномалий в зависимости от возраста матери. Показатели частоты наступления беременности и имплантации после ПГД в первых трех группах значительно не отличаются, однако при дальнейшем росте показателя возраста наблюдается снижение частоты наступления беременности при отсутствии ПГД. Таким образом, селективный перенос эмбрионов после проведения ПГС позволяет избежать негативного воздействия возрастного фактора и обеспечивает пациенткам в возрасте от 35 лет и старше способность к воспроизведению, аналогичную той, которую имеют женщины младшей возрастной группы.

Повторные неудачные программы ЭКО (три и более неудачных цикла ЭКО в результате ненаступления имплантации после переноса более 10 эмбрионов в совокупности за все циклы ЭКО) могут также быть обусловлены анеуплоидией в клетках эмбрионов (Munne et al., 2005б). Среди хромосомных аномалий выявляют случаи анеуплоидии, полиплоидии и мозаицизма. Число хромосомных аномалий, выявленных при проведении ПГД в таких случаях, увеличивается прямо пропорционально количеству неудачных циклов (от 40% при двух, до 50% при трех, и 67% при пяти или более неудачных попытках) (Gianaroli et al., 1999). Хро-

мосомные аномалии характерны более чем для половины эмбрионов молодых супружеских пар с отрицательным результатом в нескольких лечебных программах ЭКО (от одного до трех циклов) (Gianaroli et al., 2001, 2002).

Привычное невынашивание является дополнительным показанием к проведению ПГС. Повторные случаи самопроизвольного прерывания беременности связаны с хромосомными аномалиями (Munne et al., 2005а,б). Доля эмбрионов с хромосомными аномалиями у супружеских пар с привычным невынашиванием составляет 71% (Gianaroli, 2000).

Наличие сбалансированной структурной перестройки может обуславливать у ее здорового носителя нарушение репродуктивной функции, в том числе бесплодие, самопроизвольные аборт, мертворождение, а также рождение ребенка (детей) с несбалансированным кариотипом и множественными пороками развития. Среди первых структурных перестроек, выявленных с помощью ПГД, следует отметить периферическую инверсию в хромосоме 5, микроделецию сегмента 11.2 длинного плеча хромосомы 22, а также распространенную реципрокную транслокацию между хромосомами 11 и 22 (С.В. Денисенко и др., 2007; Iwarsson et al., 1998а,б; Pierce et al., 1998; Van Assche et al., 1999) (**фото 4.14-4.16**).

С целью обнаружения Робертсоновских транслокаций используют набор ДНК зондов для выявления анеуплоидии, что позволяет проводить подсчет хромосом в бластомерах (Munne et al., 2000, 2005а, 2006).

Если носитель хромосомной перестройки – женщина, применяют ПГД на полярном тельце с целью выявления несбалансированного и сбалансированного набора хромосом. Первое полярное тельце, биопсия которого проводится практически сразу после извлечения зрелых ооцитов, содержит высоко конденсированные метафазные хромосомы, для которых можно использовать хромосомоспецифические ДНК зонды. После оплодотво-

рения нормально развивающиеся эмбрионы со сбалансированным кариотипом переносят в матку.

Если носителем реципрокной или робертсоновской транслокации является мужчина, целесообразно проведение предварительного обследования, включающего хромосомный анализ сперматозоидов и последующее определение модели мейотической сегрегации хромосом, участвующих в транслокации. Такой подход позволяет установить варианты хромосомного набора и их соотношение в сперматозоидах отца, что способствует принятию решения о необходимости проведения ПГД. Тем не менее, следует учитывать, что четкая корреляция между частотой мутаций в сперматозоидах и частотой мутаций, возникших после оплодотворения отсутствует.

Скрининг или диагностику хромосомной патологии на преимплантационном уровне осуществляют с помощью молекулярно-цитогенетических методов и флуоресцентной ПЦР. Существует несколько модификаций обработки ядра перед проведением FISH, все они включают этапы лизиса клетки в гипотоническом растворе, фиксацию и распластывание ядра на предметном стекле (Dozortsev and McGinnis, 2001). С подготовленным таким образом препаратом проводят реакцию гибридизации с последующей постгибридизационной отмывкой избытка ДНК зонда. Анализ препаратов осуществляют с помощью флуоресцентного микроскопа, число флуоресцентных сигналов свидетельствует о количестве хромосом в ядре. Тип и количество ДНК зондов, которые используют в каждом конкретном случае, зависят от показаний. Применяют одновременную гибридизацию несколькими зондами, мечеными разными флюорохромами, что позволяет идентифицировать от двух до пяти различных хромосом в одной клетке, например, хромосомы X и Y или 13, 18, 21, X и Y, или 13, 16, 18, 22. При работе с одной клеткой количество хромосом, доступных для одновременного анализа, строго ограничено. В связи с этим разработаны и производятся коммерческие наборы ДНК зондов, которые

позволяют проводить анализ восьми хромосом (хромосомы 13, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y). При необходимости проводят двух- и даже трехэтапную гибридизацию *in situ* с использованием серии ДНК зондов в несколько этапов (Laverge et al., 1997; Liu et al., 1998; Munne et al., 2004, 2005b, 2006). Следует также отметить, что FISH не сопровождается такими явлениями, как контаминация или выпадение одного аллеля (ADO).

Определение пола эмбриона по показаниям осуществляют также с помощью FISH, при этом не только устанавливают пол эмбриона, но и выявляют анеуплоидию по половым хромосомам, предупреждая риск рождения ребенка с синдромами Шерешевского–Тернера, Клайнфельтера (Harper et al., 1994; Staessen et al., 1999) (**фото 4.17-4.19**).

В практике ПГД используют и другие молекулярно-генетические технологии, к ним относятся PRINS и CGH (Pellestor et al., 1996; Wilton, 2005). Метод PRINS, в отличие от FISH, не требует предварительного мечения зонда, реакция мечения происходит *in situ*. Использование этого метода в рамках преимплантационного скрининга эмбрионов на хромосомном уровне, а также на уровне локализации генов открывает многообещающие перспективы. Одно из преимуществ метода заключается в сокращении времени, затрачиваемого на процедуру гибридизации, что имеет существенное значение во время проведения программы ЭКО с ICSI. CGH позволяет анализировать весь хромосомный набор эмбриона, однако длительность процедуры составляет примерно 72 ч, поэтому после биопсии эмбрионы необходимо подвергать криоконсервированию (Wells and Delhanty, 2000; Gutierrez-Mateo et al., 2004; Wilton, 2005). Альтернативой молекулярно-цитогенетическим методам диагностики хромосомной патологии являются модификации ПЦР, а именно флуоресцентная ПЦР.

Дальнейшее совершенствование молекулярных методов, а также идентификация генов и мутаций в них при различных наследственных заболеваниях позволи-

ли расширить показания к применению ПГД и, соответственно, спектр анализируемых наследственных заболеваний, включая моногенные (Лівшиць та ін., 2004; Gibbons et al., 1995; Liu et al., 1995; Harton et al., 1996; Ao et al., 1998; De Vos et al., 1998; Dreesen et al., 1998; Grifo et al., 1998; Lee et al., 1998; Sermon et al., 1998, 1999; Fallon et al., 1999; Kanavakis et al., 1999; Ray et al., 1999; Ioulianos et al., 2000; Rechitsky et al., 2002). Список заболеваний, которые возможно диагностировать преимплантационно, ежегодно пополняется. Среди наиболее распространенных заболеваний, диагностируемых на преимплантационном уровне, следует назвать следующие:

- аутосомно-рецессивные (болезнь Кеннеди, болезнь Тэя–Сакса, муковисцидоз) с риском 1:4;
- аутосомно-доминантные (с ранней манифестацией, например, миотоническая дистрофия, ахондроплазия, или с поздней манифестацией, например, болезнь Гентингтона) с риском 1:2;
- X-сцепленные рецессивные (например, гемофилия А и В, мышечная дистрофия Дюшенна) с риском 1:2 у мужчин;
- митохондриальные заболевания;
- мультифакторные заболевания;
- различные формы наследственного рака.

Следует отметить, что при наличии в семье риска рождения ребенка с X-сцепленной патологией может быть предложено проведение ПГД с установлением пола ребенка. Известно, что матери мальчиков, пораженных рецессивными X-сцепленными заболеваниями (мышечная дистрофия Дюшенна, гемофилия А и В и др.), здоровы, однако риск рождения пораженного мальчика составляет 50%. Первоначально определение пола на преимплантационном уровне при X-сцепленной патологии проводили с помощью ПЦР. Однако в связи с высоким риском ошибочного диагноза, а также совершенствованием FISH на blastomeres пол определяют с помощью двухцветовой гибридизации *in situ*. FISH позволяет не только определять пол, но и выявлять численные аномалии гоносом, которые нельзя диагностировать при помощи ПЦР (Harper et al., 1994; Staessen et

al., 1999). Кроме того, благодаря возможности использования наборов ДНК зондов, меченных различными флюорохромами, определение пола может быть совмещено с диагностикой анеуплоидии.

Для диагностики моногенных, митохондриальных, мультифакторных заболеваний используют ПЦР и ее модификации. "Золотым стандартом" диагностики моногенной патологии является мультиплексная ПЦР с флюоресценцией или без нее. Существует целый ряд модификаций метода ПЦР, что позволяет значительно расширить область его применения в медицинской практике, в том числе и ПГД. С момента первых случаев использования ПГД, основанной на ПЦР, стали очевидными проблемы, сопровождающие амплификацию ДНК единственной клетки. Эти недостатки включают возможную контаминацию образца ДНК и выпадение одного аллеля, когда один из аллелей не амплифицируется (Pickering et al., 1994; Findlay et al., 1995; Ray et al., 1998; Braude et al., 2002). Контаминация может произойти в результате неполной очистки эмбриона от клеток кумулюса или вследствие попадания ДНК отца, что приводит к ошибочному диагнозу. Для исключения этого недостатка проводят амплификацию двух пар высокополиморфных сцепленных маркеров. Однако следует учитывать тот факт, что примерно в 10% случаев амплификация изолированных blastomeres может быть безуспешной.

Усовершенствование метода ПЦР и разработка его модификаций способствовали повышению чувствительности метода и расширению спектра сфер его применения. Наиболее перспективными являются мультиплексная и флюоресцентная ПЦР. Мультиплексная ПЦР предполагает одновременную амплификацию более чем одного фрагмента в рамках одной реакции ПЦР с использованием более чем одной пары неродственных праймеров (Dean et al., 2001). Одна или более пара праймеров амплифицирует фрагмент ДНК, содержащий исследуемый locus ("зону интереса"), тогда как другие служат положительным контролем в одной и той же реакции. Этот метод инфор-

мативен при диагностике муковисцидоза, β -талассемии и других наследственных заболеваний.

Флюоресцентная ПЦР представляет собой модификацию ПЦР, основанную на использовании нескольких наборов флюоресцентно меченных праймеров в одной реакции, при этом чувствительность в 1000 раз выше, чем при использовании стандартной техники ПЦР. Впервые применение этого метода для генетического анализа ДНК, полученной из одной клетки, было проведено в 1998 г. (Findlay et al., 1998). На анализ с помощью флюоресцентной ПЦР затрачивают гораздо меньше времени, чем при использовании стандартной ПЦР. Кроме того, данный метод значительно снижает возможность ошибочного диагноза в результате АДО или контаминации.

Количественная флюоресцентная ПЦР позволяет проводить амплификацию специфических последовательностей ДНК, уникальных для каждой хромосомы, например, маркеры короткого tandemного повтора, которые состоят из варьирующего числа нуклеотидных повторов (2-5 п.н.) и являются высокополиморфными. Для обнаружения продукта ПЦР используют флюоресцентные праймеры и автоматический ДНК секвенатор. Указанный метод позволяет оценивать плоидность клетки, а также обнаруживать изучаемый участок ДНК даже в гетерозиготных клетках. Здоровые индивиды обычно гетерозиготны по таким полиморфным маркерам, т. е. имеют разное число повторов и, следовательно, аллели разного размера. В исходной экспоненциальной фазе ПЦР амплификации количество продукта ДНК пропорционально начальному числу повторов. У дисомных индивидов выявляют аллели разных размеров, соотношение которых составляет 1:1, тогда как трисомные образцы ДНК демонстрируют либо три аллеля разной длины в соотношении 1:1:1 (трисомный трехаллельный), либо два аллеля одинакового размера в соотношении 2:1 (трисомный диаллельный). Количественную флюоресцентную гибридизацию успешно используют в пренатальной диагностике анеуплоидии. В практике ВРТ эта

технология эффективна для выявления анеуплоидий на преимплантационном уровне, например, трисомии хромосомы 21 (синдром Дауна). Коммерческие наборы позволяют значительно сократить время проведения диагностики, что имеет существенное значение при применении ВРТ.

Как известно, наиболее значительным ограничением анализа одной клетки является малое количество ДНК. Применение мультиплексной ПЦР является одним из путей преодоления этой трудности. Кроме того, существуют методы неспецифической амплификации генома – амплификация всего генома. Эти технологии предполагают амплификацию значительной части генома и последующий анализ посредством специфических реакций ПЦР, что обеспечивает подтверждение диагноза благодаря альтернативным методам анализа других генов. Протоколы генотипирования клетки для определения моногенной патологии в практике ПГД основываются на использовании ПЦР.

ПГД является надежным методом диагностики наследственной патологии, позволяющим избежать рождения ребенка (детей) с генетическими дефектами, и в определенной степени представляет альтернативу пренатальной диагностике (Kahraman et al., 2000a). ПГС анеуплоидии позволяет повысить частоту успешной имплантации, снизить количество случаев самопроизвольных аборт. Помимо практических задач (диагностики наследственной патологии), с помощью молекулярных и молекулярно-цитогенетических методов изучают экспрессию генов преэмбрионов. Благодаря созданию кДНК-библиотек эмбриона появилась возможность изучения механизмов регуляции транскрипции/трансляции генов в зиготе, экспрессии генов эмбрионов, а также геномного импринтинга.

4.3.6. Перенос эмбрионов в полость матки. Поддержка лютеиновой фазы

Следующий этап программы ЭКО/ЭКО с ICSI после проведения неинвазивной, а в случае необходимости инвазивной, селекции эмбрионов – перенос эмбрионов в полость матки. Эмбрионы помещают в специальный пластиковый катетер и трансцервикально переносят в полость матки пациентки при минимальном объеме питательной среды. Перенос эмбрионов осуществляют под УЗИ-контролем. Положительный результат программы зависит от характера расположения эмбрионов в матке: при удалении эмбрионов от дна матки на каждый дополнительный миллиметр показатель уровня клинической беременности возрастает на 11%, а риск возникновения эктопической беременности снижается (Pore et al, 2004). Количество эмбрионов при переносе индивидуально в каждом конкретном случае и зависит от качества сперматозоидов, ооцитов, эмбрионов, а также от возраста женщины.

В случае успешной имплантации эмбриона(-ов) и дальнейшего развития беременности наблюдение пациенток осуществляют по общепринятым правилам ведения беременности и родов у женщин с отягощенным анамнезом. Одним из немаловажных этапов успешного проведения программ ЭКО и ЭКО с ICSI является поддержка лютеиновой фазы стимулированного цикла. Как известно, прогестерон и эстрадиол принимают участие в подготовке матки к имплантации эмбриона и стабилизации эндометрия в ходе беременности.

Во время лютеиновой фазы у небеременной женщины продуцирование эстрадиола и прогестерона достигает пика через четыре дня после овуляции и снижается примерно через 10 дней после нее. В случае наступления беременности продуцирование прогестерона восстанавливается благодаря стимуляции чХГ желтого тела. После 7-й недели беременности плацента начинает вырабатывать достаточное количество этих гормонов.

В стимулированных циклах лютеиновая фаза отличается от естественных нестимулированных циклов по следующим параметрам: продолжительность продуцирования яичниками стероидных гормонов короче на 1-3 дня, стимуляция яичников приводит к развитию множества желтых тел, показатели уровня содержания эстрадиола и прогестерона на раннем этапе лютеиновой фазы значительно отличаются от аналогичных показателей в естественном цикле.

В стимулированных циклах происходит более резкое снижение концентрации эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови. Отличные от физиологических уровни эстрадиола и прогестерона после стимуляции яичников могут оказывать воздействие также и на рецептивность матки даже при адекватной продолжительности лютеиновой фазы. Аспирация фолликулярной жидкости вызывает существенные нефизиологические колебания концентрации половых гормонов – резкое падение их уровня непосредственно после аспирации и компенсаторное резкое повышение на +5 день цикла. Дефицит половых гормонов стимулирует выброс гонадотропинов, а последние – синтез половых гормонов клетками гранулезы ооцита. Такой скачок уровня содержания половых гормонов неблагоприятен для имплантации эмбрионов.

Снижение продолжительности лютеиновой фазы было отмечено с самого начала применения ЭКО, что вызвало беспокойство у клиницистов. Выявление раннего и стремительного снижения уровня содержания гормонов стало основанием для принятия уже на ранних этапах использования ЭКО решения об обязательном применении поддержки лютеиновой фазы.

С внедрением агониста ГнРГ в 80-х гг. прошлого столетия в практику стимуляции овариального процесса проблема сокращения лютеиновой фазы стала еще более острой. В настоящее время практически во всех медицинских центрах после стимуляции яичников в рамках использования лечебной программы ВРТ

обеспечивают поддержку лютеиновой фазы. Разработаны два способа коррекции лютеиновой фазы: введение чХГ для стимуляции желтого тела и дополнительное введение прогестерона с эстрадиолом или без него. Существуют различные пути приема препарата, включая пероральный, внутримышечный, вагинальный, для каждого из которых характерны свои ограничения.

Диагностику наступления беременности или ее отсутствия в программах ЭКО и ЭКО с ICSI производят через 12-14 дней после переноса эмбрионов на основании измерения содержания β -чХГ в крови или моче. Ультразвуковую диагностику беременности проводят с 21-го дня после переноса эмбрионов.

4.4. Программы ЭКО и ЭКО с ICSI с использованием донорских клеток, суррогатное материнство

Программу ЭКО и/или ЭКО с ICSI с донорскими ооцитами (донация ооцитов), полученными от женщины-донора, применяют в случаях отсутствия у пациентки собственных полноценных половых клеток. Донор может быть анонимным, когда супружеская пара не имеет никакой информации о нем/ней, кроме данных о фенотипе, или известным (неанонимным), как правило, это знакомые или родственники пациентов. Пациентки, у которых было получено большое количество клеток в программе ЭКО и/или ЭКО с ICSI, могут отдать часть клеток реципиентам. Согласно рекомендациям ESHRE требования к донору включают возрастной показатель (<35 лет) (в противном случае увеличивается риск хромосомных аномалий и снижается вероятность успеха лечебного цикла), наличие у донора по крайней мере одного собственного здорового ребенка (ESHRE, 2005). Проведение программы донации гамет возможно только при наличии письменного информированного согласия обеих сторон.

Показания к донации ооцитов включают:

- нарушение функционирования яичников, в том числе преждевременное истощение функции яичников;
- недоразвитие или отсутствие яичников;
- наступление климактерического периода;
- неэффективность проведенных ранее нескольких программ ВРТ;
- высокий риск передачи генетических заболеваний по женской линии.

Программу ЭКО/ЭКО с ICSI с донорскими ооцитами осуществляют согласно стандартной схеме, за исключением того, что индукцию суперовуляции проводят женщине-донору, а перенос эмбрионов, полученных благодаря оплодотворению ооцитов донора сперматозоидами мужа реципиентки, – самой реципиентке. Таким образом, донация ооцитов в лечебной программе позволяет оказать реальную помощь бесплодным супру-

жеским парам.

В некоторых случаях в программе ЭКО или ЭКО с ICSI используют донорские сперматозоиды. Выбор донора осуществляется на добровольной основе из числа родственников или посторонних людей. Донорами сперматозоидов могут быть здоровые мужчины в возрасте 20-40 лет, не имеющие урологических, венерических, андрологических заболеваний, прошедшие полное обследование, спермограмма которых соответствует норме. Проведение программы с донацией гамет возможно только при наличии письменного информированного согласия обеих сторон. Этапы лечения с использованием донации сперматозоидов аналогичны стандартной схеме, исключением является лишь то, что сперматозоиды принадлежат донору, а не генетическому отцу. Программу с использованием донорских сперматозоидов применяют как в естественном, так и стимулированном циклах.

Донорами эмбрионов могут быть пациенты, прошедшие программу ЭКО, у которых после рождения ребенка остаются неиспользованные криоконсервированные эмбрионы. На основании добровольного решения и письменного информированного согласия обеих сторон эти эмбрионы могут использоваться для донации бесплодной супружеской паре. Реципиентам должен быть предоставлен фенотипический портрет доноров. Обследование реципиентов аналогично таковому при проведении ЭКО. Доноры эмбрионов проходят такое же обследование, как и доноры гамет.

Программа суррогатного материнства подразумевает перенос эмбрионов в организм суррогатной (небиологической) матери для вынашивания. Показания к проведению программы суррогатного материнства включают отсутствие матки (врожденное или приобретенное); деформацию матки или шейки матки; синехии полости матки, не поддающиеся ле-

чению; различные заболевания внутренних органов, при которых вынашивание беременности противопоказано; неудачные повторные циклы ЭКО при неоднократном получении эмбрионов высокого качества, перенос которых не приводил к наступлению беременности, привычное невынашивание. Впервые программа суррогатного материнства была успешно проведена в США (Utian et al., 1985). На территории СНГ первая беременность с помощью этого метода была получена в 1995 г. в Харькове. Выбор женщины на роль суррогатной матери осуществляют на добровольной основе с учетом следующих критериев: возраст от 20 до 35 лет, наличие собственного здорового ребенка, психическое здоровье, отсутствие серьезных хронических заболеваний. Нередко суррогатной матерью выступает одна из обследованных родственниц. Будущая суррогатная мать проходит детальное обследование; при нормальных результатах анализов начинают следующий этап программы – синхронизацию менструальных циклов генетической и суррогатной матерей. Задачей этого этапа является достижение необходимой степени зрелости эндометрия суррогатной матери для имплантации эмбрионов к моменту их переноса. Во время подготовки проводят контроль уровней

содержания гормонов в крови, УЗ-мониторинг эндометрия и яичников. Следующий этап – непосредственно программа ЭКО или ЭКО с ICSI, заключительной стадией которой является перенос эмбрионов, полученных от генетических родителей, в полость матки суррогатной матери. После наступления беременности суррогатная мать находится под наблюдением врачей. Клиническая беременность наступает в 40% случаев из расчета на перенос нативных или замороженных–оттаянных эмбрионов.

Описанные технологии вспомогательной репродуктивной медицины позволяют решать проблему бесплодия у женщины и мужчины. Согласно подсчетам в результате применения ВРТ в мире родилось более 1 млн детей (Adamson et al., 2006). В настоящее время ВРТ развиваются благодаря усовершенствованию условий культивирования, оптимизации качества гамет, внедрению новых технологий отбора (селекции) жизнеспособных эмбрионов. Эти направления нацелены на снижение числа переносимых эмбрионов и уменьшение количества случаев многоплодной беременности без снижения общей частоты случаев наступления беременности.