

Європейське Товариство
репродукції і ембріології людини

АТЛАС ЕМБРІОЛОГІЇ ЛЮДИНИ

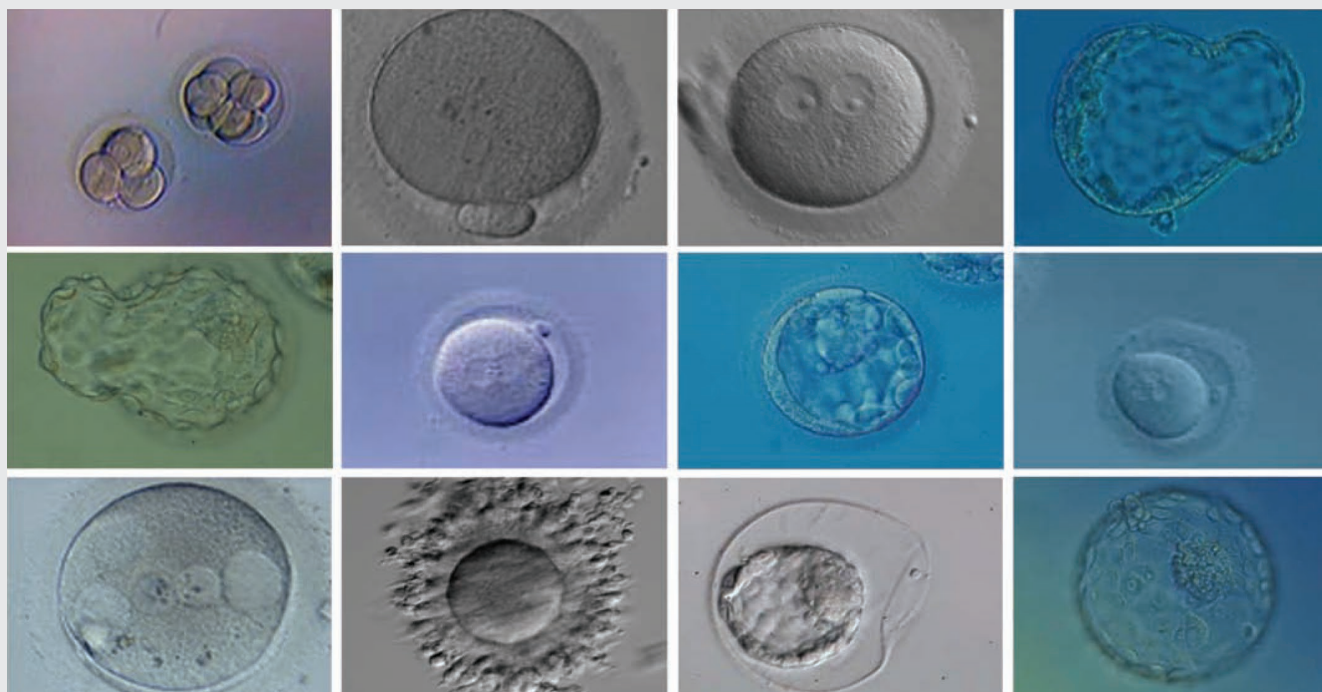
Від ооцитів до преімплантаційних ембріонів

Морфологічні особливості ооцитів

Зигота. Морфологічна оцінка

Стадія поділу ембріона

Оцінка якості бластоцисти



Атлас виданий за ініціативою Української Спілки Ембріологів та за підтримки ПП «Медіта». Розповсюджується безкоштовно



Переклад: Мельник Л. В.,
Наукові консультанти: Фединяк А. В., к.б.н., зав.ембріологічним відділенням,
Сомова О. В., к.б.н., зав. ембріологічним відділенням

ЯКІСТЬ ООЦИТІВ І ЧИННИКИ, ЩО НА НЕЇ ВПЛИВАЮТЬ

Оцінка морфології ооцитів є складним завданням, так як основні механізми, які змінюють зовнішній вигляд ооцитів, є багатофакторними і складними. Значні морфологічні зміни ооцитів можуть вплинути на компетентність отриманого ембріона. Морфологічні зміни в ооцитах можуть бути результатом впливу внутрішніх факторів, таких як вік і генетичні дефекти або зовнішніх факторів, таких як протоколи стимуляції і умови культивування. Дія морфологічних варіацій ооцита на розвиток ембріона та імплантацію, тим не менш, остаточно не визначена через методологічні недоліки, притаманні більшості досліджень, описаних в літературі.

Цей огляд присвячений морфологічним маркерам якості/життєздатності ооцитів і спробі з'ясувати, чи може бути використана морфологічна оцінка ооцита для прогнозування імплантаційного потенціалу отриманого ембріона.

Ооцит

// Laura Rienzi¹, Basak Balaban², Thomas Ebner³ and Jacqueline Mandelbaum⁴

Зміст

- ситулус оточення ооцитів;
- ооцити в стадії дозрівання;
- розмір і форма ооцитів;
- цитоплазматичні особливості;
- ооплазма;
- метафазна пластина;
- екстрацитоплазматичні особливості;
- зона пеллюціда;
- перівітелліновий простір;
- полярне тільце.

Вступ

Жіноча гамета відіграє вирішальну роль у визначенні компетентності ембріона, отже і в результативності **екстракорпорального запліднення (ЕКЗ)**.

На якість ооцитів впливає не тільки ядерний і мітохондріальний геном, а й мікросередовище, яке створюється яєчником і преовуляторним фолікулом, і впливає на транскрипцію і трансляцію, і, як наслідок, на цитоплазматичну зрілість яйцеклітини. На відміну від процесів в природних умовах застосування протоколів гормональної стимуляції яєчників для ЕКЗ обходить складну процедуру відбору, що зазвичай відбувається під час дозрівання одного ооцита для овуляції, а також дозволяє дозріти одночасно багатьом ооцитам, часто сумнівної якості.

Було висловлено припущення (Van Blerkom і Henry, 1992), що деякі морфологічні відхилення, які легко виявляють під світловим мікроскопом, відобража-



ють ослаблену здатність ооцитів до розвитку і таким чином є корисним інструментом для відбору компетентних ооцитів перед заплідненням. Оцінка морфології ооцитів в лабораторії починається з кумулюсних клітин. Для зрілих ооцитів кумулюсна маса

повинна виглядати як пишний шар, що розширюється через активну секрецію гіалуронової кислоти. Ця молекула позаклітинної матриці вклинюється між кумулюсними клітинами (CCs), розділяючи їх і надаючи кумулюс-ооцитному комплексу вигляду пухнастої «хмари». Проте для стимульованих циклів характерна асинхронність між дозріванням ядра ооцита і експансією кумулюсної клітинної маси. Вважається, що це викликано різною чутливістю ооцита і кумулюсних клітин до стимулюючих речовин (Laufer і ін., 1984).

Після видалення кумулюсних клітин в процесі підготовки до ICSI оцінка ооцитів стає більш точною і базується на стані зрілості ядра, морфології цитоплазми і на зовнішньому вигляді екстрацитоплазматичних структур. Наявність **першого полярного тільця (РВІ)**, як правило, вважається маркером ядерної зрілості ооцитів. Проте



Дозрівання ядра і цитоплазми має бути завершено скоординовано, щоб забезпечити оптимальні умови для подальшого запліднення.

роглядатися як справжні зрілі ооцити в стадії метафази II (MII). Наявність, розташування і ретардність веретена поділу було запропоновано віднести до ознак компетентності ооцита. Проте, відповідно до недавнього проведеного мета-аналізу (Petersen і ін., 2009), це стосується тільки ооцитів, отриманих *in vitro*. Публікації щодо аналізу розвитку ооцитів в природних умовах порівняно рідкісні в літературі і мета-аналіз не віднайшов суттєвих відмінностей в показниках імплантації *in vivo* між ембріонами, отриманих з ооцитів з виявленим і не виявленим веретеном поділу.

Проте оцінки тільки ядерної зрілості не достатньо, щоб визначити якість ооцита. Дозрівання ядра і цитоплазми має бути завершено скоординовано, щоб забезпечити оптимальні умови для подальшого запліднення. Ідеальний зрілий ооцит за морфологічними характеристиками має цитоплазму «нормального вигляду», одне полярне тільце, відповідної товщини **зону пеллюцида (ZP)** і належний **перивітеліновий простір (PVS)** (Swain and Pool, 2008). Тим не менше, більшість з ооцитів після гіперстимуляції яєчників мають одну або більше варіацій з описаних «ідеальних» морфологічних критеріїв (De Sutter et al., 1996; Xia, 1997; Balaban et al., 1998; Mikkelsen and Lindenberg, 2001; Balaban and Urman, 2006; Ebner et al., 2006; Rienzi et al., 2008). Це також вірно для ооцитів, отриманих від донорів з перевіреною плідністю (Ten і ін., 2007). Морфологія часто не в змозі передбачити здатності ооцита до запліднення і компетентності подальшого розвитку (Rienzi і ін., 2011). Лише кілька морфологічно виявлених ознак ооцита MII вказують на загрозу розвитку. Згідно з висновками консенсус-семінару в Стамбулі (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) екстрацитоплазматичні аномалії (морфологія PBI, розмір PVS, поява ZP) — просто фенотипічні варіації часто пов'язані з культивуванням *in vitro* та/або старінням ооцитів. З іншого боку, спеціальне відхилення в цитоплазматичній структурі, а саме наявність **скупчень гладкої ендоплазматичної мережі (SER)** є потенційно небезпечним, і можливість розвитку таких ооцитів слід інтерпретувати з обережністю. Морфологія ооцитів

недавні дослідження з використанням мікроскопії в поляризованому світлі показали, що ооцити з полярним тільцем можуть все ще бути незрілими (Rienzi і ін., 2005). Тільки ооцити з веретеном мейозу (MS) насправді можуть

Морфологія часто не в змозі передбачити здатності ооцита до запліднення і компетентності подальшого розвитку.

може також відображати генетичні аномалії. Наприклад, гігантські ооцити, які містять один додатковий набір хромосом. Ці ооцити при спостереженні із застосуванням поляризованої світлової мікроскопії мають два різних веретена. Незважаючи на те, що поява гігантських ооцитів після гіперстимуляції яєчників є відносно рідкою, використання цих клітин для IVF небезпечно.

Внаслідок складних механізмів, пов'язаних з дозріванням ооцитів і набуванням компетентності, малоймовірно, що одна характеристика (за винятком розміру ооцита і наявності SER агрегатів) може адекватно відображати якість клітини. Відповідно, щоб отримати інформацію про компетентність ооцита, морфологічну оцінку слід поєднувати з іншими підходами (експресія генів кумулюсних клітин, метаболоміка і споживання кисню). Надалі прогноз може бути отриманий шляхом комбінування оцінки ооцитів з оцінкою передімплантаційного розвитку (пронуклеарна стадія, стадія дроблення і стадія бластоцисти).

А. Ооцити з кумулюсом

Під час формування фолікулярної порожнини **гранульозні клітини (GCs)** диференціюються в інтрамуральні, які вистилають фолікулярну стінку, і кумулюсні клітини, що оточують яйцеклітину. У середині кумулюсу клітини в тісному контакті з ооцитом (клітини корони) розвивають спеціальні утвори, трансзональні проекції, які через зону пеллюцида утворюють щільні контакти з **мембраною ооциту (oolemma)**. Ця організована структура називається ооцит-кумулясний комплекс (COC; фото 1, Albertini та ін., 2001). У природних спонтанних циклах дозрівання ядра ооцита проходить паралельно з поступовою FSH-залежною експансією кумулюсних клітин, проте ця синхронність може бути порушена в стимульованому циклі (Laufer і ін., 1984). Незрілі COC (фото 2) зазвичай беруться з дрібних фолікулів під час IVM циклів, і демонструють, як правило, неекспонований кумулюс з великою кількістю шарів компактних гранульозних клітин, що прилипли до зони пеллюцида незрілої яйцеклітини в профазі I (**стадія «зародкового пухирця» (GV)**; фото 3 і 4). IVM таких незрілих COC скероване на експансію кумулюсу і дозрівання ядра ооцита.

У стимульованих циклах через 34–38 годин після запуску овуляції типовий зрілий преовуляторний COC демонструє коронні клітини оточенні експонованою вільною масою кумулюсних клітин (фото 5). У більшості таких COC ооцити дозрілі до стадії MII, хоча цілком можливо після гонадотропної стимуляції знайти серед озлизлих кумулюсних і коронних клітин незрілі ооцити на стадії GV або у **метафазі I (MI)** (рис. 6). Вивільнення COC з розширеної клітинної маси купчастих, але компактних, клітин і коронних клітин є звичайним для стимульованих циклів і називається денудацією (рис 7а, 8а і 9а). Насправді під час вивільнення ооциту присутність оточуючих купчастих і ко-

ронних клітини зазвичай перешкоджає ідентифікації індикаторів успішного завершення мейозу I з припиненням розвитку на стадії МІІ-РВІ в PVC (мал. 1). В рамках підготовки до ICSI денудація ооцитів здійснюється за допомогою ферментативної дії гіалуронідази (рис 7b, 8b і 9b) і механічно піпеткою і дозволяє точно оцінити ядерний статус ооцитів (рис 7c, 8c і 9c).

Alpha-ESHRE консенсус стверджує, що, не дивлячись на недостатність доказів на користь кореляції між зовнішнім виглядом COC і компетенцією ембріону до подальшого розвитку, оцінка COC згідно бінарного логічного рахунка (0 або 1), де 'якісний' COC (1) визначений як той, що має розширений (експанований) кумулюс і промінистий вінець, має бути задокументована (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Двонаправлений зв'язок між ооцитом і клітинами кумулюсу має вирішальне значення для надбання ооцитом компетенції (Gilchrist et al., 2008) і, можливо, буде досліджений в майбутньому шляхом не-інвазивного аналізу клітин кумулюсу (моделі експресії генів або синтезу білка), пропонуючи нові біомаркери якості ооцитів, компенсуючи недостатність морфологічної оцінки COC (Feuerstein et al., 2007; Ouandaogo et al., 2011).

В. Ооцити в стадії дозрівання

Видалення клітинної маси кумулюсу дає унікальну можливість оцінити морфологію ооцитів перед заплідненням, і, зокрема, стадію ядерного дозрівання. Ядерна зрілість ооцитів оцінюється за допомогою світлової мікроскопії, як передбачається, на стадії МІІ, коли РВІ видно в PVS (фото 10 і 11). МІІ стадія характеризується вирівнюванням гомологічних хромосом на екваторіальній пластині під час стадії метафази другого мейотичного поділу. В цілому визнається, що 85 % отриманих ооцитів після гіперстимуляції яєчників мають РВІ і класифікуються як МІІ, в той час як 10% мають інтрацитоплазматичне ядро під назвою «зародковий пухирець» (GV; фото 12–14), характерний для профазы I першого поділу мейозу. Приблизно 5 % ооцитів не мають ні видимого GV, ні РВІ і ці ооцити зазвичай класифікуються як МІ ооцити (фото 15–17; Rienzi and Ubaldi, 2009). Ці ооцити можуть бути, однак, на стадії дозрівання GV, де ядерна оболонка розривається, але поки ще не розвилася до істинного МІ, і де хромосоми вирівняні на метафазній пластині в рамках підготовки до завершення першого поділу мейозу.

Додаткова інформація про ядерний статус ооцитів може бути отримана з використанням мікроскопії в

поляризованому світлі в поєднанні з програмним забезпеченням для обробки зображень для неінвазивної візуалізації **веретена поділу (МС)** та інших структур ооцитів, що мають подвійне променезаломлення. МС — мікротрубчатая структура, що бере участь в розходженні хромосом, а отже має вирішальне значення в послідовності дій, що ведуть до правильного завершення мейозу і подальшого запліднення. Паралельно вишикувані мікротрубочки MS мають подвійне променезаломлення і здатні зрушувати площину поляризації світла, що призводить до затримки. Ці властивості дозволяють системі створювати контраст і відображати структуру MS (Oldenburg, 1999; фото 18). Присутність МС дає більш точну інформацію про ядерний стан ооцита. Зокрема деякі ооцити можуть бути незрілими (рання телофаза I) при спостереженні за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі, незважаючи на наявність РВІ в PVC. На даному етапі фактично існує нерозривність між ооплазмою ооцита і формуванням РВІ і веретено поділу втручається між двома клітинами, що розділяються (фото19–22). Цей стан, як правило, має тривалість 75–90 хв. Було виявлено, що МС зникає в пізню телофазу I (рис. 23), переформуючись тільки 40–60 хвилинами пізніше (Montag i in., 2011). Проте, слід підкреслити, що інші фактори, такі як неоптимальні умови культивування, коливання температури і хімічний стрес під час маніпуляцій, можуть внести свій вклад в руйнування MS (Rienzi i Ubaldi, 2009). І нарешті відсоток ооцитів з виявленим МС також пов'язаний з часом, що минув від введення ХГЛ (хоріонічний гонадотропін людини), і підвищується після 38 годин (Cohen i in., 2004). Загалом передбачається, що принаймні 80 % ооцитів, отриманих після гіперстимуляції яєчників, є МС позитивними, якщо дивитися за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі.

С. Розмір і форма ооцитів

Для відновлення мейозу ооцитам необхідний максимальний розмір (Otoi i in., 2000). На початку росту ооцита розмір визначається сильною адгезією між плазматичною мембраною та внутрішньою поверхнею зони пеллюцида (Tartia i in., 2009). Перед овуляцією GLYT1 активується і сприяє накопиченню гліцину, який в свою чергу діє як осмоліт і, таким чином, контролює клітинний об'єм (Baltz i Tartia, 2009).

Середній оваріальний діаметр МІІ ооцитів може істотно змінюватися (фото 24), але це не пов'язано з заплідненням або якістю розвитку ембріонів людини на стадії ділення і розвитку (Romão i in., 2010). Інша ситуація з гігантськими ооцитами (Balakier i in., 2002; Rosenbusch i in., 2002). Цей тип ооцита має приблиз-

Проте, слід підкреслити, що інші фактори, такі як неоптимальні умови культивування, коливання температури і хімічний стрес під час маніпуляцій, можуть внести свій вклад в руйнування MS.

Загалом передбачається, що принаймні 80 % ооцитів, отриманих після гіперстимуляції яєчників, є МС позитивними, якщо дивитися за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі.

но в два рази більший об'єм від нормального ооцита (близько 200 мкм) і перед мейозом є тетраплоїдом за походженням, тобто оогоній з ядерним поділом без поділу цитоплазми або цитоплазматичне злиття двох оогоніїв. Ці механізми пояснюють появу двоядерних гігантських ооцитів в профазу I (фото 25 і 26). Ці ооцити завжди призводять до дігнії (триплоїдії материнського походження) (фото 27 і 28) і ніколи не мають бути перенесені, хоча присутність щонайменше одного гігантського ооцита серед отриманих ооцитів (фото 29 і 30) не має ніякого впливу на результат лікування (Machtinger і ін., 2011).

Очевидно, що існують ооцити з крайніми варіантами аномальних форм (фото 31 і 32; Paz et al., 2004; Esfandiari et al., 2005). Такі ооцити, як було показано, можуть бути заплідненими і привести до народження здорових дітей. Під час кількісної оцінки ступеню елонгації (подовження) ооциту деякі автори (Ebner et al., 2008) винайшли, що розміри аномальної форми не корелюють ні з заплідненням, ні з якістю ембріона. Однак, ембріони з ооцитів овоїдної форми (фото 33 і 34) на 2 день демонструють плоский масив бластомерів, а не більш традиційний тетраедр, і подальший їх розвиток часто уповільнюється (Ebner et al., 2008).

Рідко два ооцити можуть бути знайдені в межах одного фолюкулярного комплексу. Кожен ооцит зазвичай оточений ZP, але зона ZP зазвичай безпосередньо поділяється між двома ооцитами, а не дублюється (фото 35). Ці сполучені ооцити часто мають ядра в різній стадії дозрівання. Було висловлено припущення, що такі ооцити можуть відігравати певну роль у появленні гетерозиготних близнюків; проте, навіть коли обидва сполучених ооцита дозрівають, вони рідко запліднюються удвох, і ще не надходило жодних повідомлень про випадки вагітностей від таких ооцитів (Rosenbusch і Hancke, 2012).

D. Цитоплазматичні особливості

D.1 Ооплазма

В літературі показано, що виражений дисморфізм цитоплазматичної текстури погіршує потенціал ембріона до розвитку і імплантації (Balaban and Urman, 2006). Незважаючи на те, що однорідна, нормальна цитоплазма очікується в отриманих ооцитах (фото 36 і 37), біологічне значення різних ступенів неоднорідності ооплазми невідома. На підставі наявних даних злегка гетерогенна цитоплазма може представляти тільки нормальну варіабельність отриманих ооцитів, а не аномалію, що має значення для подальшого розвитку (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Зернистість в цитоплазмі (фото 38–41) погано визначена в літературі і може залежати від модуляції оптичного шляху, що використовується в фазово-контрастній мікроскопії. Ці морфологічні відхилення слід ретельно відрізняти від включень, що виявляються за допомогою будь-якої форми мікроскопії таких як рефрактерні або ліпофусцинові

тіла (Otsuki і ін. 2007; фото 42) і кластеризація (скупчення) органел, яка також описується як дуже згущена централізована зернистість (фото 43–45; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Одною з найбільш важливих важких цитоплазматических аномалій в МП ооцитах є поява SER кластерів (SER дисків) в цитоплазмі. SER диски можуть бути ідентифіковані в цитоплазмі за допомогою фазово-контрастної мікроскопії як напівпрозорі структури схожі на вакуолі (фото 46 і 47). Дані засновані на фактичних результатах ясно показують, що ембріони, отримані з яйцеклітин з SER дисками пов'язані з ризиком серйозних, значних аномальних результатів (Balaban and Urman, 2006; Ebner et al., 2006). Рекомендовано ооцити з цією ознакою не використовувати для ICSI, і всі ооцити жінки мають бути додатково перевірені на наявність або одного SER диска або серії невеличких дисків (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Вакуолі в цитоплазмі визначаються як заповнені рідиною структури, які легко помітні і відрізняються від SER дисків (фото 48–51). Малі вакуолі 5–10 мкм в діаметрі навряд чи матимуть біологічний наслідок, в той час як великі вакуолі > 14 мкм зв'язують із зривом запліднення. В запліднених ооцитах ці вакуолі, які продовжують існувати після злиття гамет, можуть перешкодити в площинах ділення, з чим пов'язують низький рівень бластуляції. (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

D.2 Метафазна пластинка

Було показано, що присутність веретена поділу, що має подвійне променезаломлення, всередині цитоплазми МП ооцитів (фото 52) може бути індикатором якості ооцита і його здібності до запліднення і подальшого розвитку, проте ретроспективний аналіз результатів опублікованих статей виявився спірним (Borini et al., 2005). Нещодавно проведений мета-аналіз показав, що, незважаючи на кореляцію присутності веретена поділу в МП ооцитах із заплідненням і рівнем якості розвитку ембріона до стадії бластоцисти, дані були недостатні, щоб продемонструвати істотний вплив на клінічні показники рівня імплантації і вагітності (Petersen et al., 2009). Основною причиною суперечливих висновків було те, що деякі дослідження не брали до уваги динаміку формування веретена, що сильно варіює на стадії дозрівання ооцитів, а також змішуючи різні техніки обробки яйцеклітин. Було показано, що візуалізація веретена змінюється впродовж дозрівання ооцита із зникненням майже ~1 години під час дозрівання на стадії МІ до витиснення РВІ в телофазі I, а потім його відновлення на МП стадії. Мікротрубочки веретена поділу високо чутливі до хімічних (гіалуронідаза) і фізичних змін (коливання температури і рН), що можуть відбуватися під час обробки ооцитів і зникнення веретена

може бути очікуваним під час технічних приготувань (Rienzi et al., 2003; De Santis et al., 2005; Montag et al., 2006).

Веретено поділу, коли виявляється, не завжди збігається з PBI в MII ооцитах, а зв'язок між ступенем відхилення MS від місця розташування PBI може впливати на клінічні результати (Rienzi et al., 2003, 2005; фото 53–58). Хоча було показано, що не існує жодного зв'язку між зміщенням PBI щодо позиції MS на результати запліднення і якість ембріонів (Rienzi et al., 2003; Rama Raju et al., 2007), процес запліднення порушується, якщо зміщення перебільшує 90 % (Rienzi et al., 2003; фото 59 і 60). Незначні зрушення в положенні PBI пов'язані з фізичним переміщенням ооциту під час процесів денудації можуть бути оборотними. Проте дуже великий зсув може призвести до незворотного пошкодження структури ооцитів.

Таким чином, MS характеристики можуть використовуватися як маркер якості і життєздатності ооцитів тільки через точний послідовний аналіз зображень MS, що має бути виконаний після всіх можливих хімічних і фізичних змін і безпосередньо перед ICSI.

Е. Екстрацитоплазматичні особливості

За визначенням екстрацитоплазматичні аномалії ооцита включають в себе дисморфізм, пов'язаний з ZP, PVS і полярним тілом зрілого ооцита.

Е.1 Зона пеллюцида

Будь які зміни в зовнішньому вигляді ZP можуть бути спричинені секрецією і структурними порушеннями глікопротеїнової матриці (Shen et al., 2005). Так як видимі зміни товщини (фото 61–64) або повна відсутність ZP вкрай рідкісні (Stanger і співавт., 2001), найбільш часто спостерігаються більш тонкі зміни в тривимірній структурі. Оскільки внутрішній шар ZP високо упорядкований, він чітко візуалізується з використанням поляризованого світла (фото 65–68; Pelletier et al., 2004). Ембріони з хорошим прогнозом в плані формування бластоцисти і вагітності можна передбачити, якщо роздвигатися ZP з використанням поляризованого світла (Montag et al., 2008; Ebner et al., 2010).

Ступінь, в якій зміна кольору ZP сприяє двійному променезаломленню зовнішньої оболонки, невідомий, проте, було висловлено припущення, що успішне запліднення, розвиток ембріона і вагітність можуть бути досягнуті після перенесення ембріонів, отриманих з ооцитів з бурою зоною (фото 63 і 64; Efsandiari et al., 2006)

Інша рідкісна знахідка грубо ненормальної форми ZP пов'язана з тим, що може бути або дублювання внутрішнього шару ZP або розрив в шарах ZP і створення внутрішньозонового простору (фото 69–71).

Е.2 Перивітеліновий простір

Деякі автори відзначають, що приблизно одна третина всіх яйцеклітини мають великий PVS, а виявлений дисморфізм негативно корелює з рівнем запліднення і якістю ембріонів (Xia, 1997; Rienzi et al., 2008).

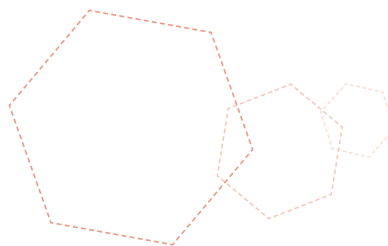
Дані літератури свідчать про те, що великий PVS (фото 72–74) більш притаманний перезрілим ооцитам (Mikkelsen and Lindenberg, 2001; Miao et al., 2009). Іншими словами, такі ооцити зменшилися по відношенню до ZP і виявився великий зазор між ооцитом і навколишньою зоною. Великий PVS також зустрічається, якщо більша частина цитоплазми видавлюється разом з гаплоїдним хромосомним набором в процесі формування PBI. Це призводить до великого PBI і, як наслідок, великого PVS.

Е.3 Полярне тільце

В цілому морфологію PBI можна розглядати як відображення постовуляторного віку ооцитів з того часу, як цей побічний продукт мейозу згодом фрагментується. Проте, вплив PBI морфології на результат залишається предметом дискусій. Яйцеклітини, що показують неущкодженій PBI (фото 75), мають більш високий рівень імплантації і вагітності (Ebner et al., 1999) можливо через збільшення формування бластоцист (Ebner et al., 2002). Певно переваги відбору ооцитів за морфологією PBI зменшуються при зростанні проміжку часу між індукцією овуляції і ICSI, через що дослідження з різними графіками не змогли знайти зв'язок між морфологією PBI і подальшим результатом ICSI (Ciotti і ін., 2004; де Сантіс та ін., 2005; Fancsovits і ін., 2006).

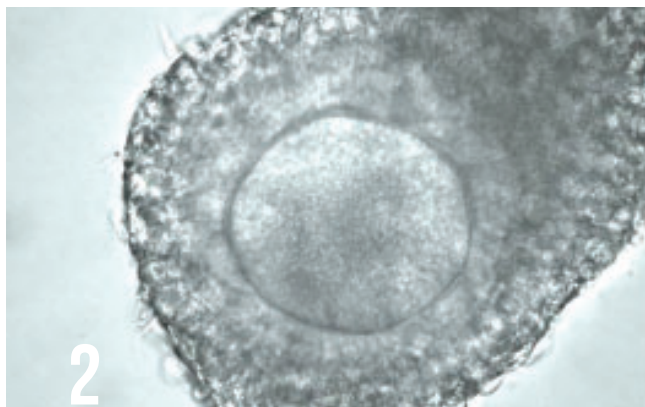
Проте той факт, що велике PBI (фото 76-78) має дуже поганий прогноз, залишається без відповіді (Fancsovits і ін., 2006). При витисненні дуже великих PBI утворення ембріонів з багатоядерними бластомерами є значно частішим, ніж для всіх інших морфологічних категорій PBI (Fancsovits і ін., 2006). Висловлювалося припущення, що екструзія аномально великих PBI обумовлена зрушеннями в MC (Verlhac і ін., 2000).

Іноді буває важко розпізнати сильно фрагментований PBI і дебрис в PVS (фото 79-82). Як було виявлено, наявність грубих гранул в PVS не впливає на рівень запліднення, швидкість поділу, а також якість ембріонів (фото 83 і 84), проте, впливає на рівень імплантації і вагітності (Hassan-Ali et al., 1998; Farhi et al., 2002). Зернистість в PVS пов'язувалась з перезрілістю ооцитів (Miao et al., 2009).

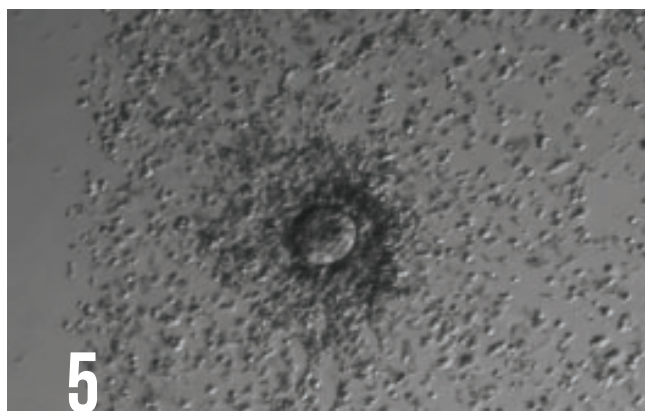




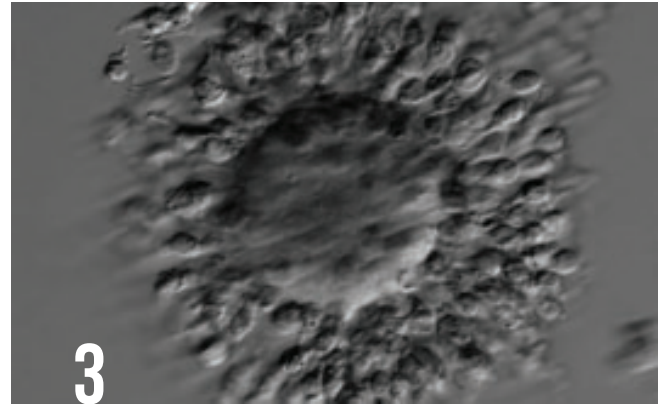
1. Ооцит-кумулюсний комплекс, отриманий внаслідок оваріальної стимуляції. Ооцит зазвичай оточений розширеним комплексом клітин кумулюсу. Зверніть увагу, зовнішні клітини кумулюсу відокремлені одна від одної позаклітинним матриксом і клітини, що безпосередньо прилягають до ооциту, стають менш компактними і розходяться від зона пеллюцида. РВ1 знаходиться в положенні на 1 годину.



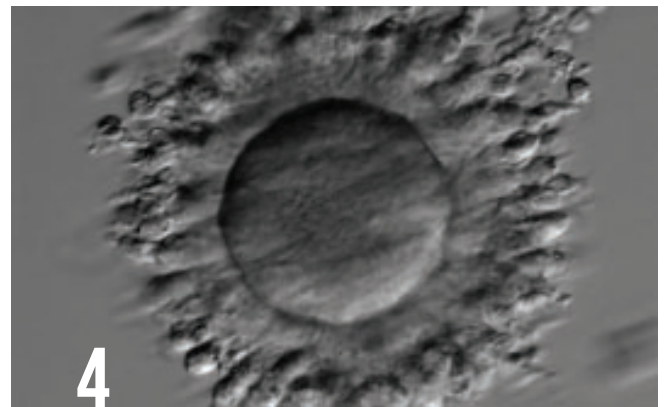
2. Незрілий ооцит-кумулюсний комплекс отриманий в ІVM циклі демонструє ооцит оточений нерозширеним компактним кумулюсом і клітинами корони.



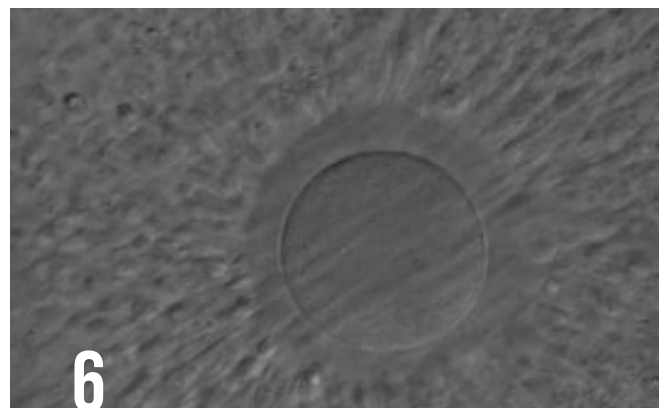
5. Ооцит-кумулюсний комплекс при малому збільшенні. Ооцит оточений променистим вінцем наочно демонструє відокремлення кумулюсних клітин внаслідок накопичення гіалуронової кислоти в позаклітинному просторі.



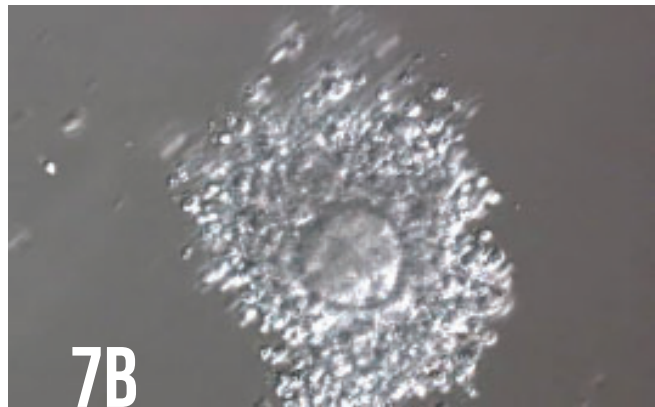
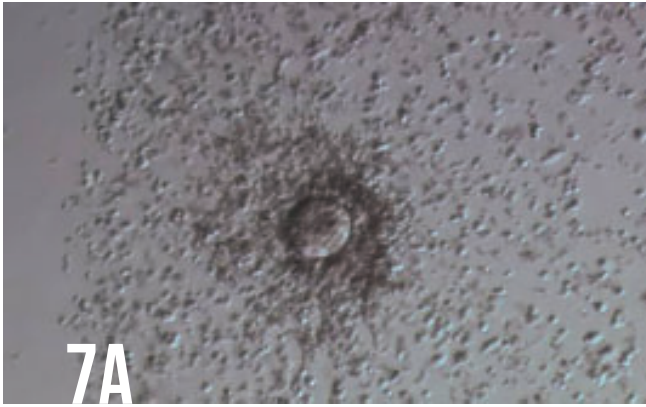
3. Ооцит-кумулюсний комплекс отриманий в ІVM циклі. Незрілий GV ооцит оточений компактним кумулюсом. Ядро в GV на 10 годин.



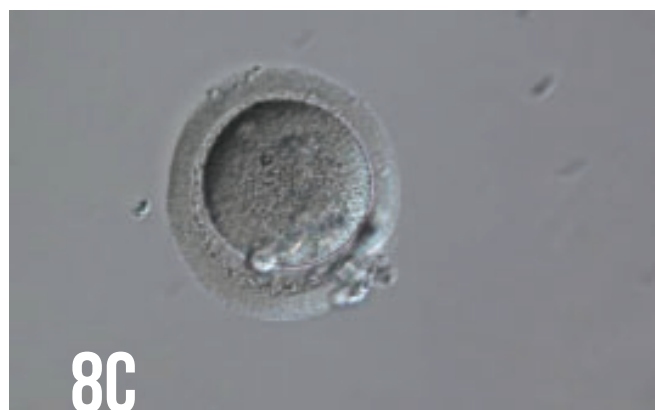
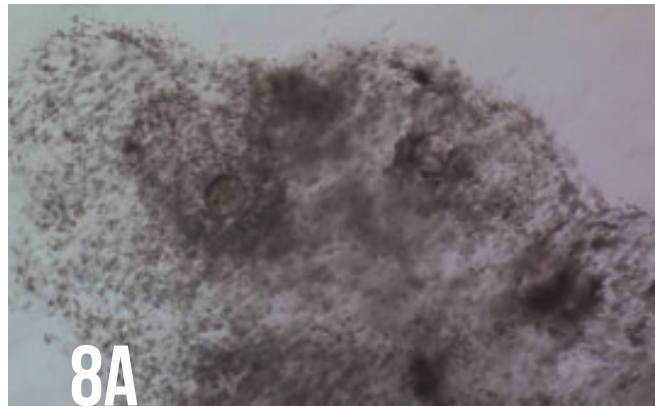
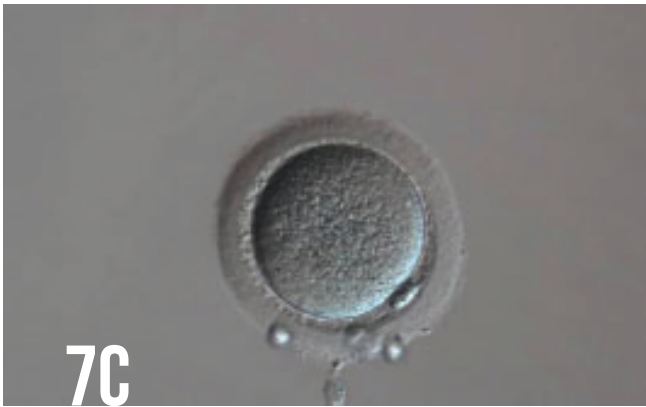
4. Ооцит-кумулюсний комплекс отриманий в ІVM циклі. Незрілий ооцит має GV в положенні 3 години з ядерцями у напрямку до центра ооцита. Компатні гранульозні клітини оточують яйцеклітину.



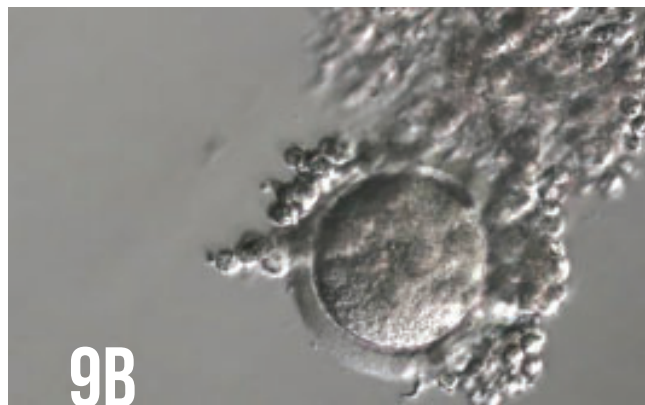
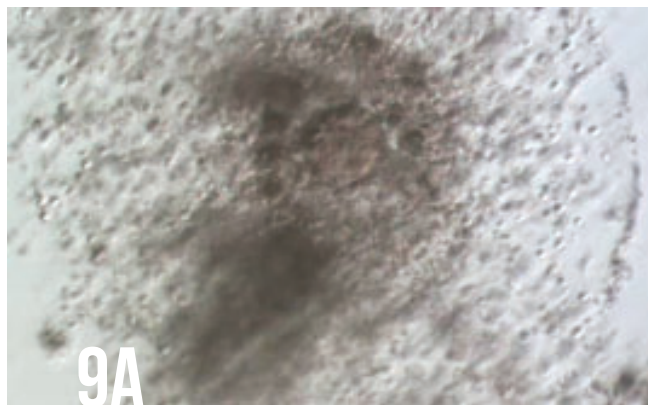
6. Ооцит-кумулюсний комплекс отриманий після стимуляції яєчників. Розгорнутий купчасто коронний клітинний комплекс оточує ооцит з зовнішніми кумулюсними клітинами, відокремленими одна від одної позаклітинним матриксом. Кумулюсні клітини, що безпосередньо примикають до ооцита, стають менш компактними і випромінюють від зона пеллюцида. Ооцит на малюнку чітко видно через навколишні клітини при великому збільшенні, причому полярне тіло не можна розгледіти в перивітеліновому просторі, незважаючи на зрілий статус купчастих-коронних клітин.



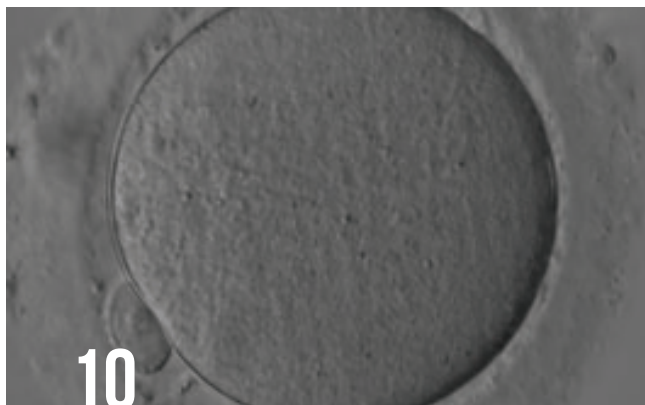
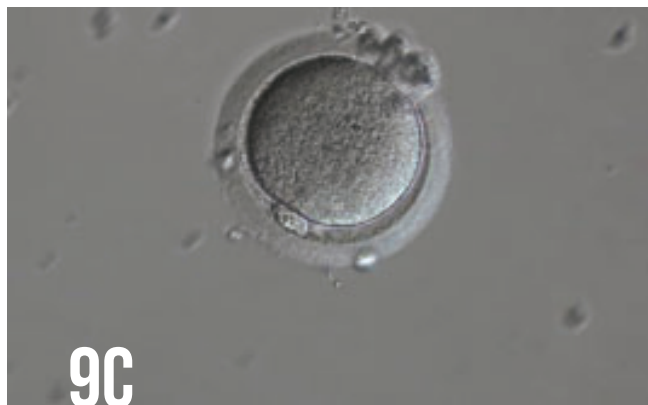
7. Послідовність денудації зрілого ооцита. (А) ооцит-кумулюсний комплекс перед процесом денудації з не-випромінюючим кумулюсом (100-кратне збільшення). (В) ооцит оточений коронними клітинами під час обробки гіалуронідазою (200-кратне збільшення). (С) денудація ооцитів після механічної зачистки, видиме полярне тільце в перивітеліновому просторі (200-кратне збільшення).



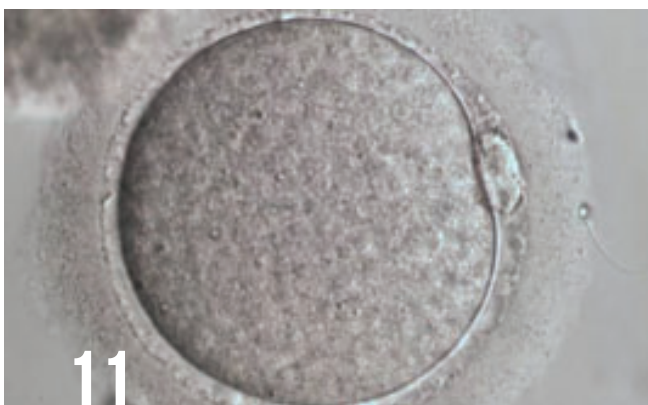
8. Послідовність денудації зрілого ооцита. (А) ооциткумулюсний комплекс перед процесом денудації (100-кратне збільшення), кумулюс рясний, (В) ооцит оточений коронними клітинами під час обробки гіалуронідазою (200-кратне збільшення). Кумулюс доволі ще багатий, проте зрілий ооцит вже видно з РВ1 в положенні 7 годин. (С) денудація ооцитів після механічної зачистки, видиме полярне тільце в перивітеліновому просторі (200-кратне збільшення).



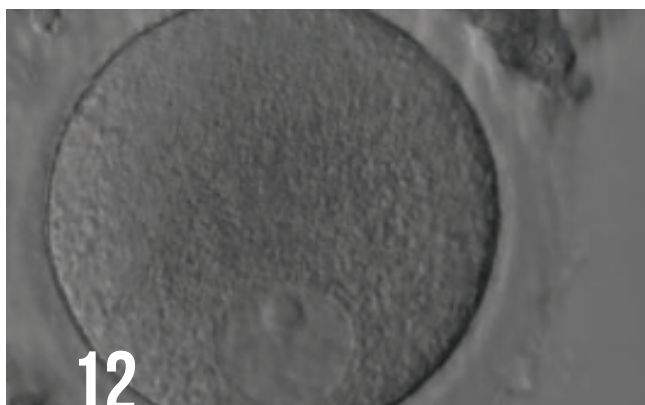
9. Послідовність денудації зрілого ооцита. (А) ооцит-кумулюсний комплекс перед процесом денудації з компактним кумулюсом (100-кратне збільшення). (В) ооцит оточений коронними клітинами під час обробки гіалуронідазою (200-кратне збільшення). (С) денудація ооцитів після механічної зачистки, видиме полярне тільце в перивітеліновому просторі (200-кратне збільшення).



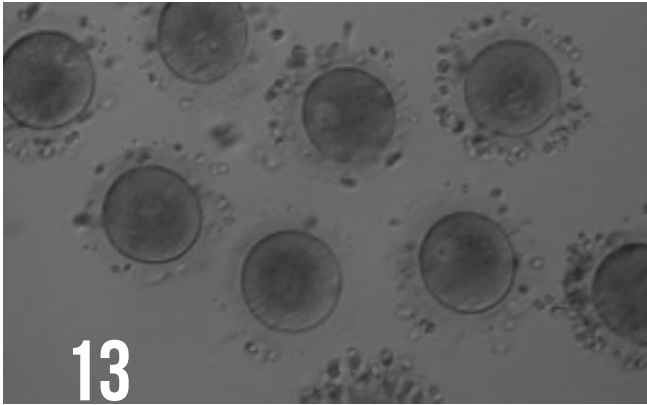
10. Денудований МІІ ооцит; неактивне РВІ добре візуалізується в перивітеліновому просторі (400-кратне збільшення).



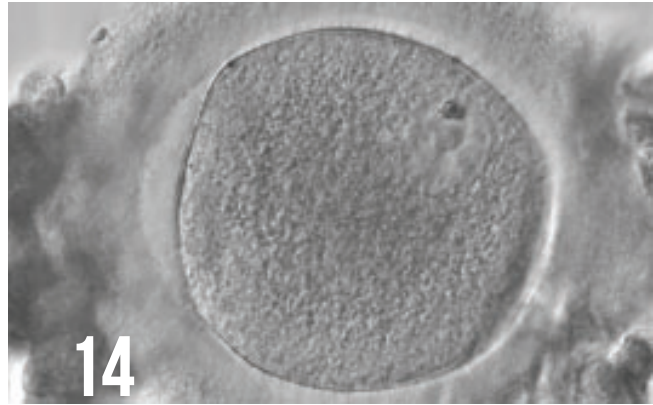
11. Денудований МІІ ооцит; РВІ добре візуалізується в вузькому перивітеліновому просторі (400-кратне збільшення).



12. Денудований GV ооцит. Типовий GV ооцит з ексцентрично розташованим ядром і одним вираженим ядерцем (400-кратне збільшення).



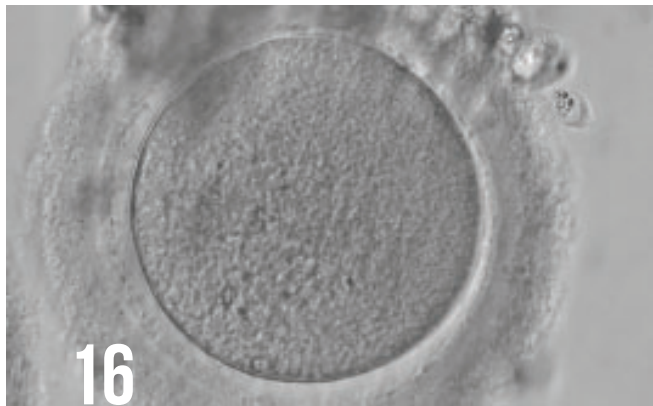
13. Денудований GV ооцит. Кілька GV з органелами, конденсованими в центрі цитоплазми (200-кратне збільшення).



14. Денудований GV ооцит. GV ооцит, який, можливо, наближається до GVBD так, як ядерна мембрана повністю не відрізняється (400-кратне збільшення).



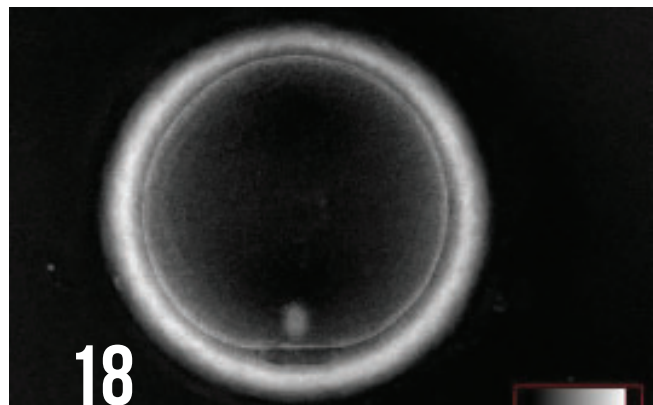
15. Денудований MI ооцит. Ооцит не має видимого ядра, проте РВІ ще не відділилось (400-кратне збільшення). Перивітеліновий простір типово вузький.



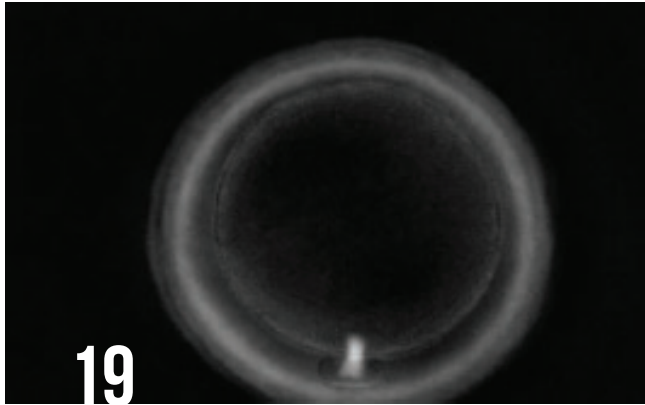
16. Денудований MI ооцит без видимого ядра і РВІ (400-кратне збільшення). Деякі клітини кумулюсу все ще щільно прилягають до зона пеллюцида.



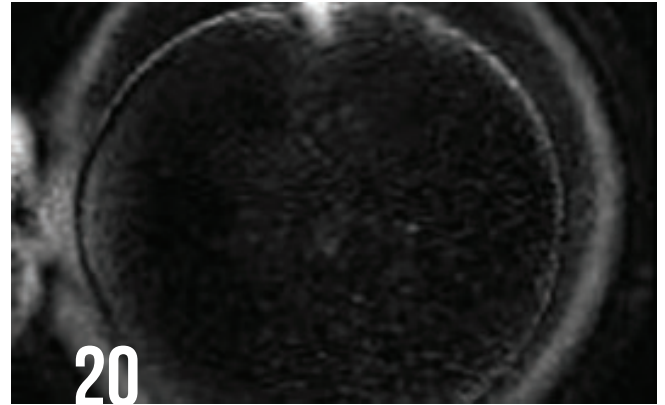
17. Денудований MI ооцит без видимого ядра або витисненого РВІ (400-кратне збільшення).



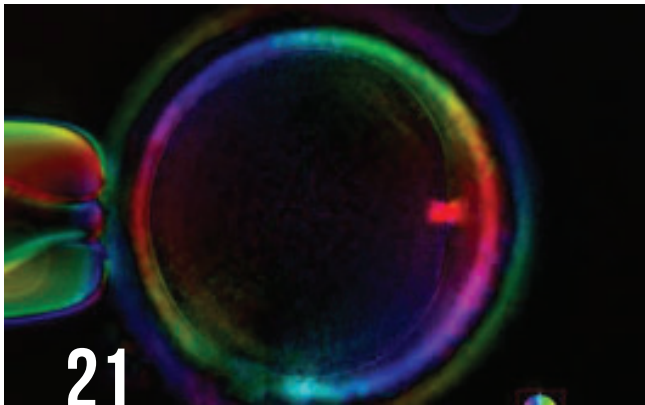
18. МІ ооцит візуалізований за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі (400-кратне збільшення). Полярне тіло присутнє в перивітеліновому просторі в положенні 6 годин і веретено поділу другого поділу мейозу видно в цитоплазмі ідеально на одній лінії з полярним тільцем I. Це повністю зрілий МІ ооцит.



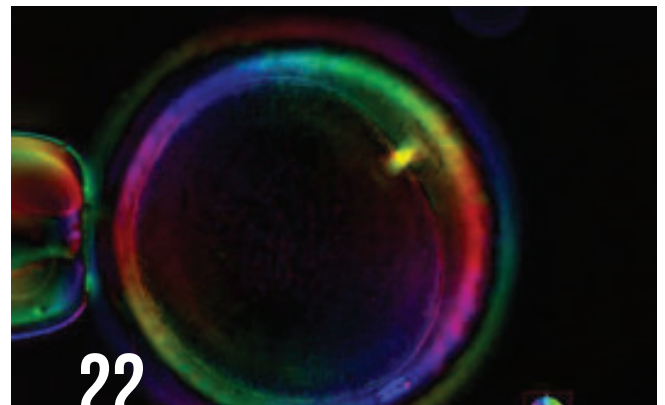
19. Телофаза I ооцит візуалізований за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі (400-кратне збільшення). Полярне тільце 1 присутнє в перивітеліновому просторі; проте, веретено поділу можна побачити між полярним тільцем 1 і цитоплазмою ооцита, що вказує, що цей ооцит досі перебуває в процесі завершення першого мейотичного поділу. Це ще не повністю зрілий МІІ ооцит.



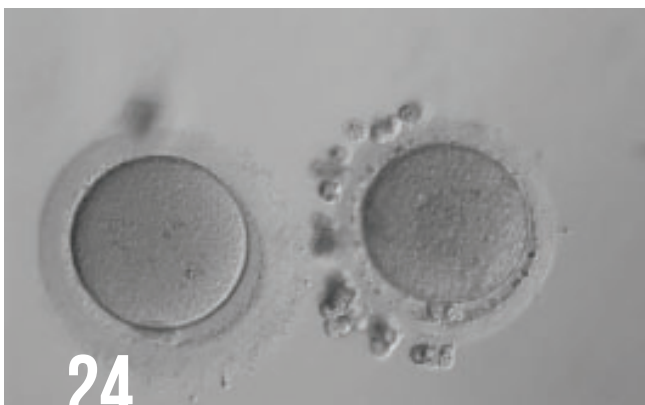
20. Телофаза I ооцит візуалізований за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі (400-кратне збільшення). Веретено поділу можна побачити між полярним тільцем 1 і цитоплазмою ооцита, що вказує, що перший мейотичний поділ ще не завершений.



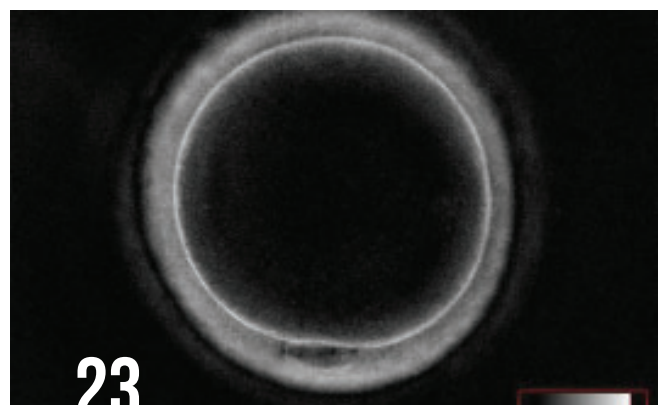
21. Телофаза I ооцит візуалізований за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі (400-кратне збільшення). Полярне тільце 1 присутнє в перивітеліновому просторі в положенні 3 години; Однак, веретено поділу перекриває полярне тільце і цитоплазмою ооцита, що вказує на те, що ця яйцеклітина ще не є повністю зрілою МІІ.



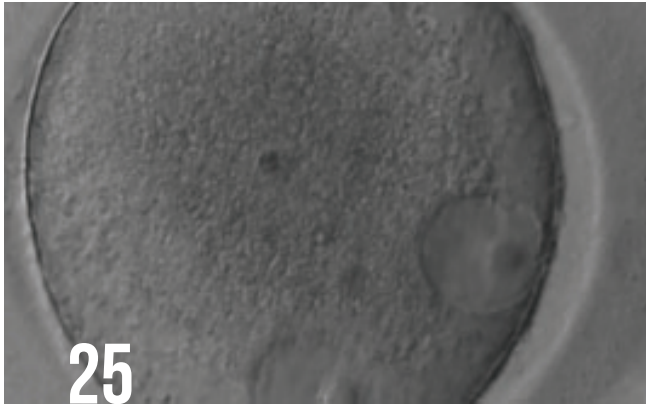
22. Телофаза I ооцит візуалізований за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі (400-кратне збільшення). Веретено поділу можна побачити між полярним тільцем 1 і цитоплазмою ооцита, що вказує, що цей ооцит ще завершує перший мейотичний поділ, незважаючи на витіснення полярного тільця 1 в перивітеліновий простір.



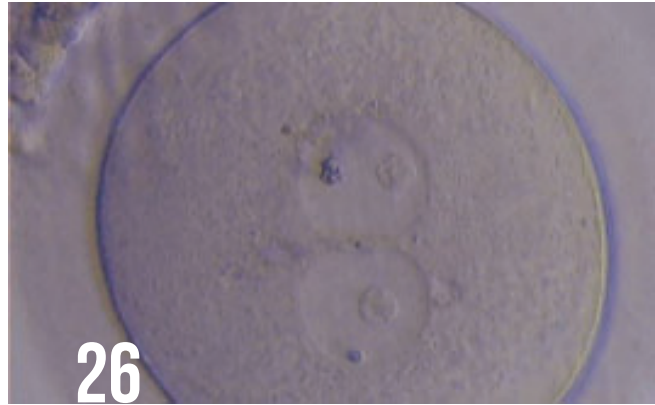
24. Малий МІІ ооцит (праворуч) поряд з МІІ ооцитом нормального розміру (ліворуч) з однієї когорти (200-кратне збільшення).



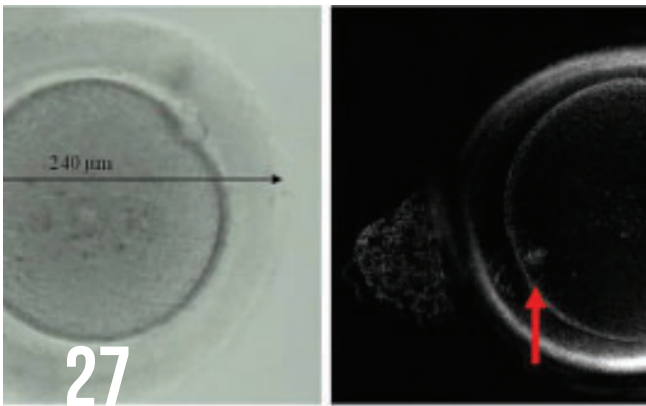
23. Ооцит в міжфазі (між першим та другим мейотичними поділами; Профаза II), візуалізували з використанням мікроскопії в поляризованому світлі (400-кратне збільшення). Полярне тільце 1 присутнє в перивітеліновому просторі в положенні 6 годин; проте, веретена другого поділу мейозу ще не видно в цитоплазмі. Це ще не повністю зрілий МІІ ооцит.



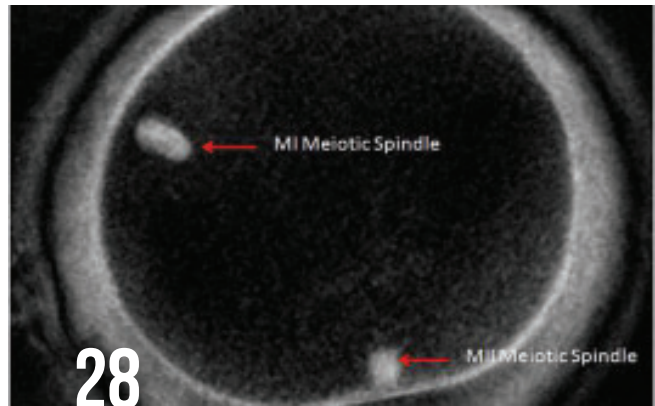
25. Гігантський ооцит з двома видимими GVS (в ексцентричному положенні). Це тетраплоїдний ооцит, що походить із злиття двох окремих ооцитів (400-кратне збільшення).



26. Гігантський ооцит з двома видимими GVS (стикаються центрі). Це тетраплоїдний ооцит, що походить від злиття двох окремих ооцитів і зазвичай тетраплоїд (400-кратне збільшення).



27. Гігантський МІІ ооцит візуалізований з використанням світлого поля (зліва) і мікроскопії в поляризованому світлі (праворуч). Ооцит містить два різних полярних тільця і два різних веретена поділу на протилежних полюсах ооцита.



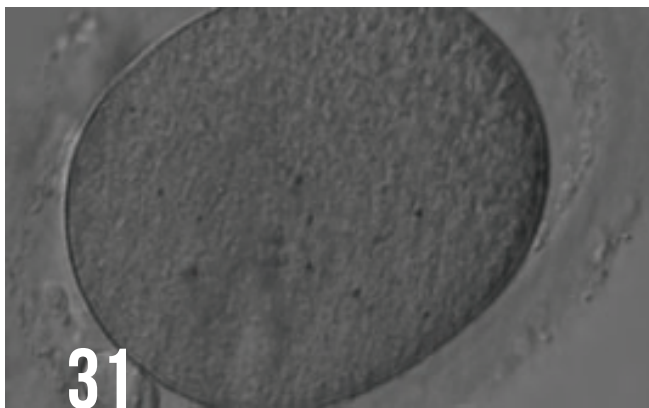
28. Гігантський МІІ ооцит візуалізований при високій потужності за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі. Два різних веретена поділу можна спостерігати в цитоплазмі. Одне веретено поділу (10 годин) з МІ, а інший з МІІ (6 годин); (400-кратне збільшення).



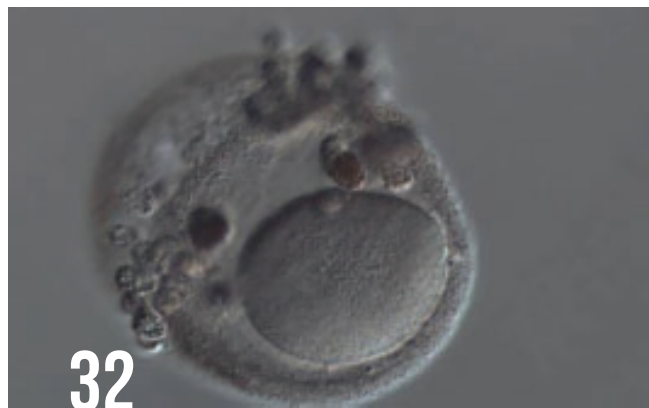
29. Гігантський ооцит (праворуч) поряд з ооцитом нормального розміру (ліворуч); (200-кратне збільшення).



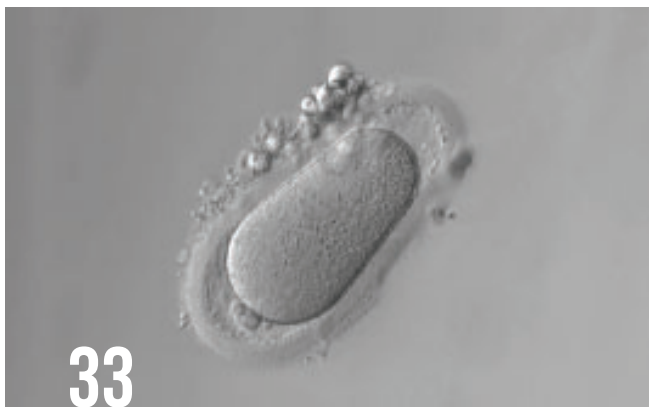
30. Гігантський ооцит (праворуч) поряд з ооцитом нормального розміру (ліворуч); (200-кратне збільшення). Жодного полярного тільця не видно в гігантському ооциті.



31. Елонгований (подовжений) ооцит всередині елонгованої (подовженої) зони пеллюцида. Зверніть увагу, перивітеліновий простір з'являється відносно нормальний (400-кратне збільшення).



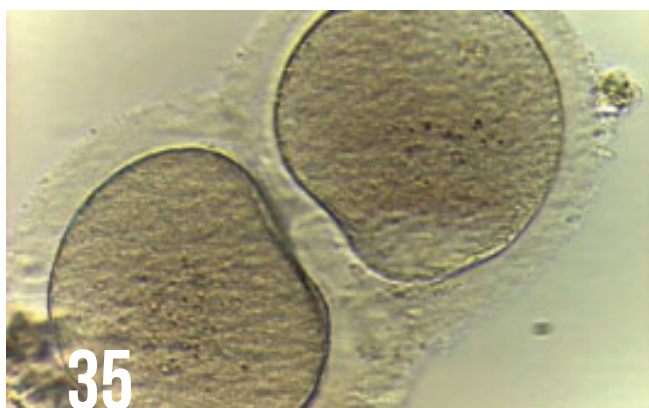
32. Подовжений МІІ ооцит в сильно розтягнутій та нерівній зоні пеллюцида (200-кратне збільшення).



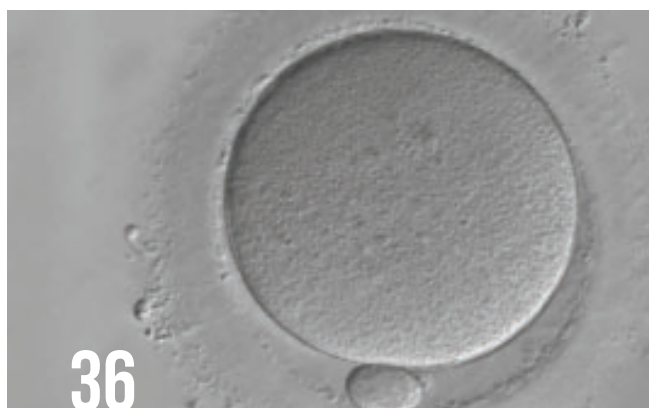
33. Овоїдний (яйцеподібний) МІІ ооцит. Зверніть увагу, що зона пеллюцида також овоїдна (яйцеподібна) за зовнішнім виглядом і перивітеліновий простір збільшується на обох полюсах (200-кратне збільшення).



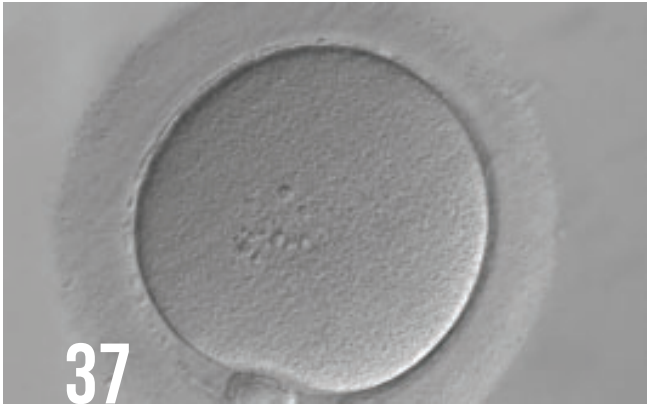
34. Овоїдний (яйцеподібний) МІІ ооцит. Зверніть увагу, що зона пеллюцида також овоїдна (яйцеподібна) за зовнішнім виглядом і дозволяє перивітеліновому простору залишатися відносно нормальним (200-кратне збільшення).



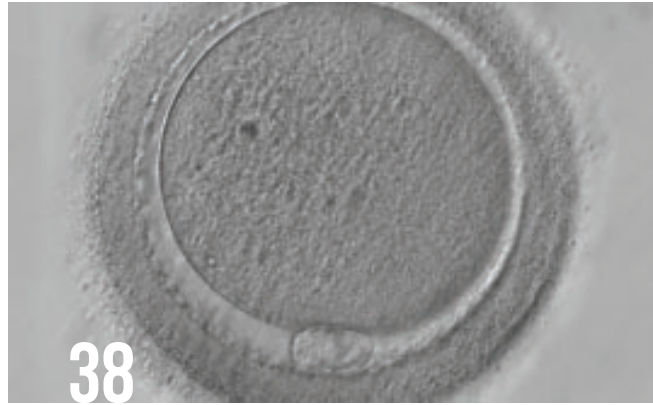
35. Два ооцити укладені в межах однієї зони пеллюцида (400-кратне збільшення).



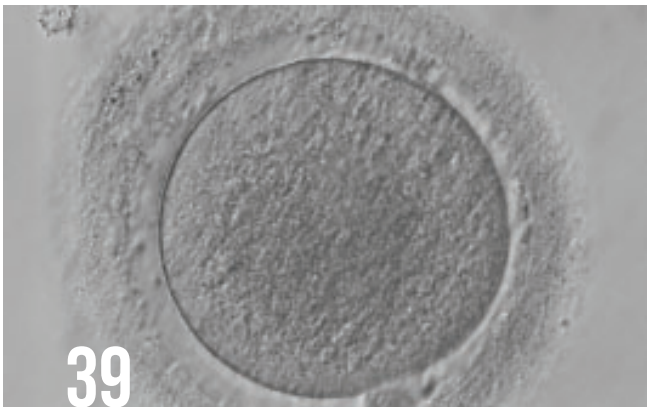
36. Нормальна однорідна цитоплазми в МІІ ооцитах (400-кратне збільшення).



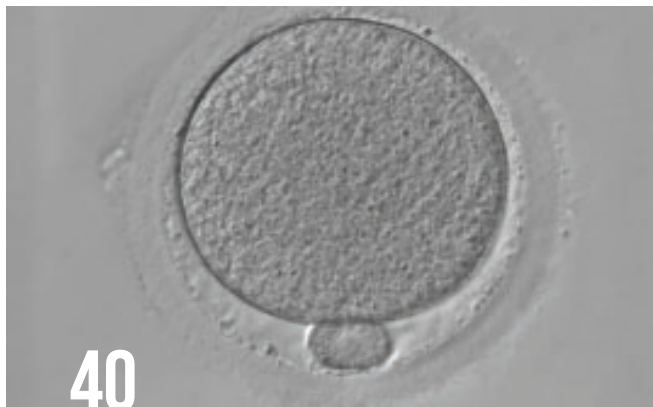
37. Нормальна однорідна цитоплазми в МІІ ооцитах (400-кратне збільшення). Зона пеллюцида щільна і однорідна.



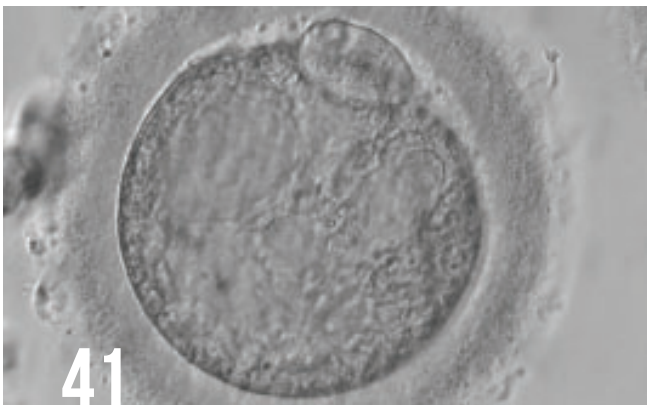
38. МІІ ооцит з зернистою цитоплазмою (400-кратне збільшення). Зона пеллюцида товща в лівій нижній частині ооцита (в цій проекції).



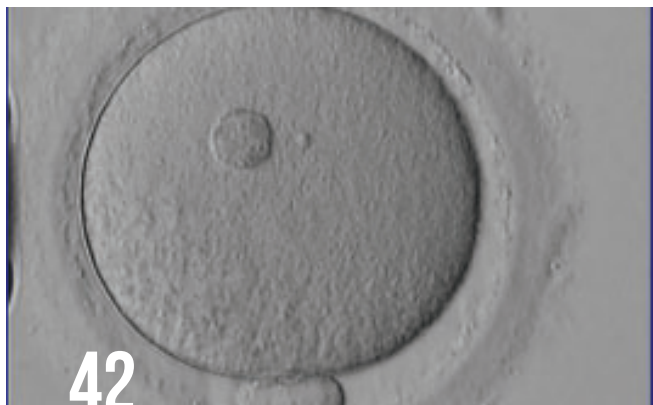
39. МІІ ооцит з зернистою цитоплазмою (400-кратне збільшення). Зона пеллюцида також аномальна з вираженими відмінностями в товщині.



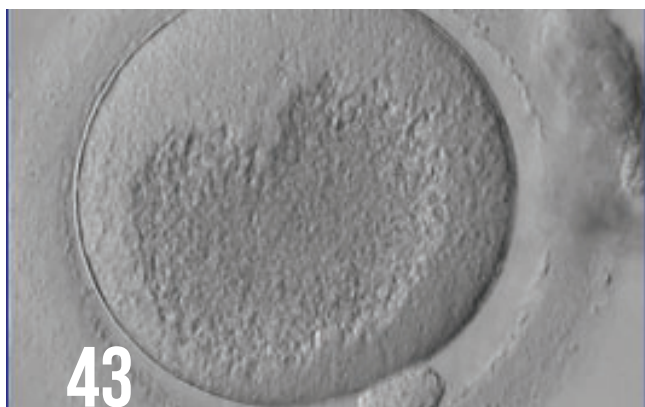
40. МІІ ооцит з зернистою цитоплазмою. Цей показник можна розглядати як невелике відхилення від нормальної гомогенної цитоплазми (400-кратне збільшення).



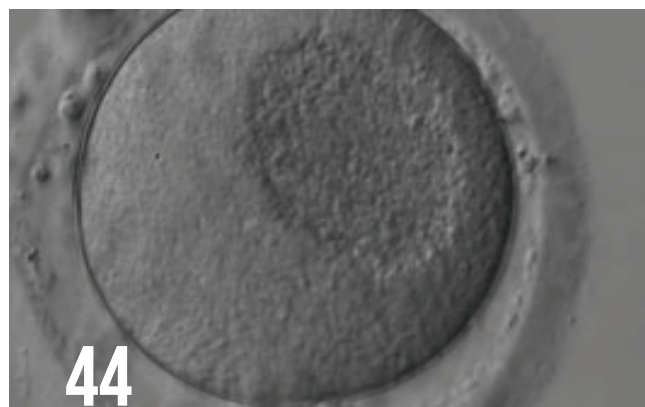
41. МІІ ооцит з високим ступенем цитоплазматичної зернистості/дегенерації (400-кратне збільшення). Полярне тільце 1 більшого за нормальний розміру.



42. Велике рефрактерне тіло в цитоплазмі (400-кратне збільшення).



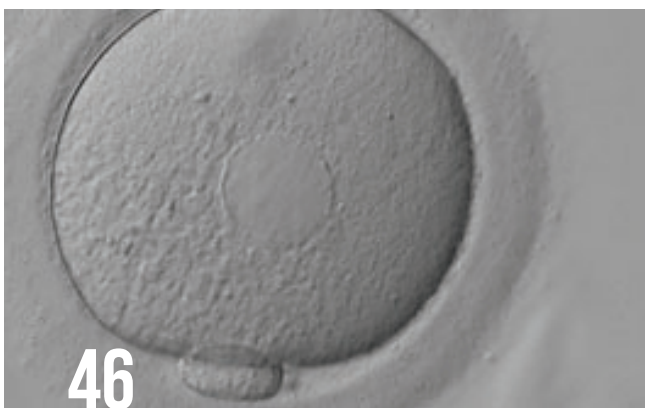
43. МІІ ооцит з дуже великою центрально розташованою гранульованою областю, що займає більшу частину цитоплазми. Це типова кластеризація (скупчення) органел.



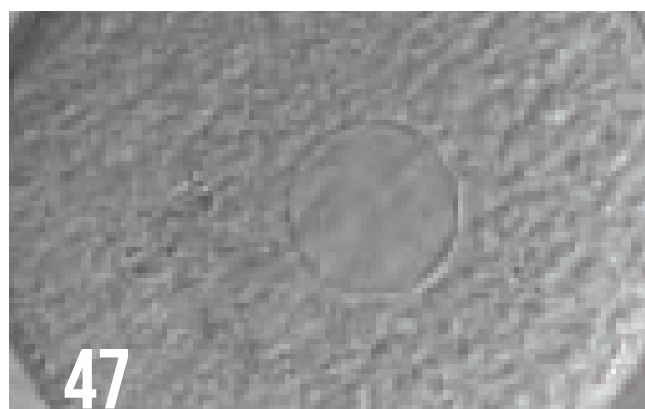
44. МІІ ооцит з великою центрально розташованою гранульованою областю в цитоплазмі позначає кластеризацію (скупчення) органел.



45. МІІ ооцит з кластеризацією органел, що займає велику частину в центрі цитоплазми. Зона пеллюцида неправильної форми.



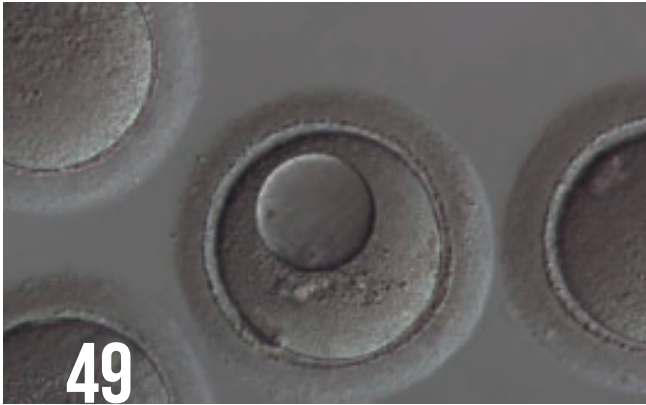
46. МІІ ооцит з бляшками розширених SER дисків в цитоплазмі (400-кратне збільшення). SER диски легко відрізняються від наповнених рідиною вакуолей, зображених на фото 48-51. Цитоплазма виглядає гетерогенною із зернистістю (ліворуч) і областями вільними від органел в позиції напроти 12 годин.



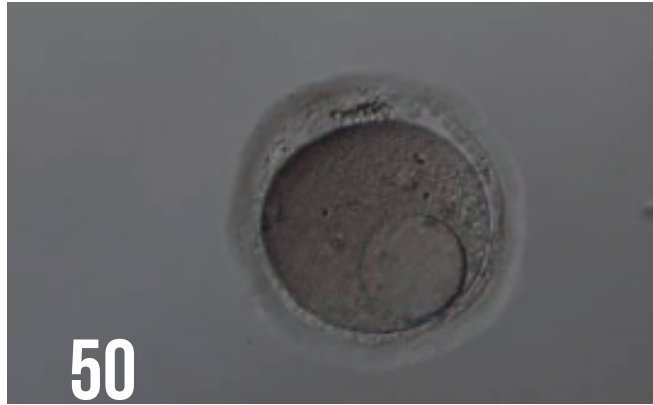
47. МІІ ооцит з бляшками розширених SER дисків в цитоплазмі (400-кратне збільшення). Перивітеліновий простір збільшений і полярне тільце1 фрагментовано.



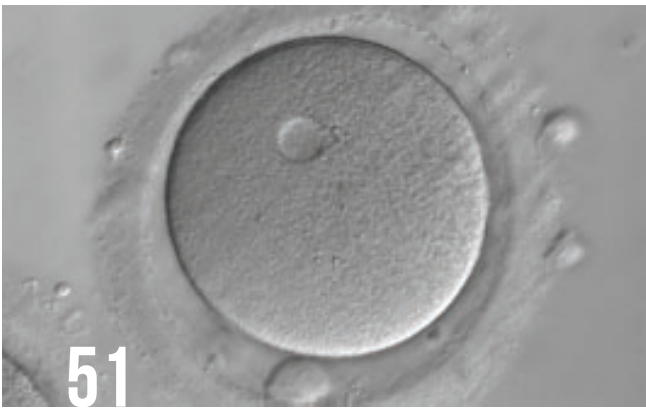
48. Вакуолізований ооцит. Зображений ооцит з кількома невеликими вакуолями розподіленими по всій цитоплазмі ооцита (200-кратне збільшення).



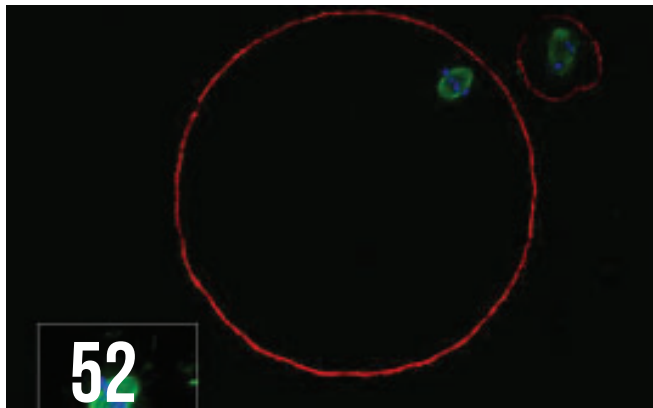
49. Вакуолізований ооцит. Ця яйцеклітина має одну велику вакуоль, що займає майже половину цитоплазми (200-кратне збільшення).



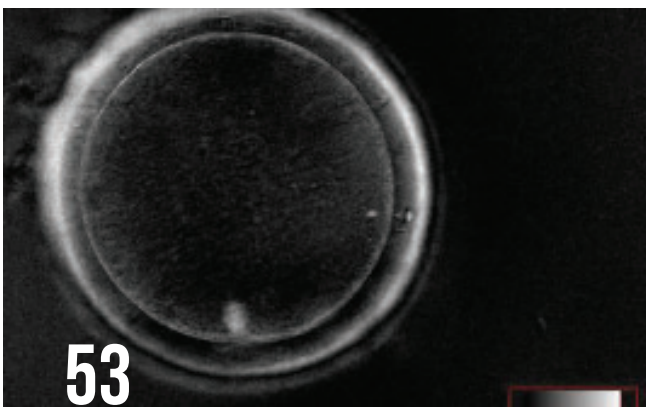
50. Вакуолізований ооцит. Ця яйцеклітина має одну велику вакуоль в темній, зернистій цитоплазмі (200-кратне збільшення).



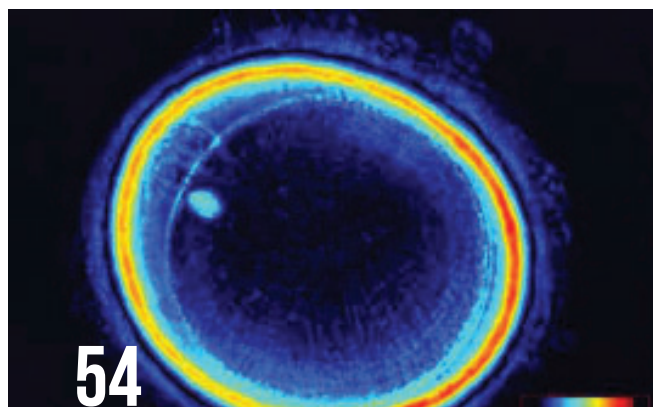
51. Вакуолізований ооцит. Зображує ооцит з однією невеликою вакуолею в цитоплазмі (400-кратне збільшення).



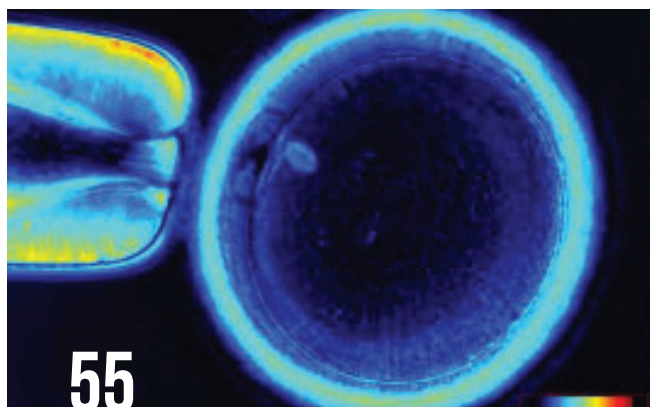
52. МП ооцит з веретеном поділу звичайної форми спостерігали за допомогою конфокальної мікроскопії.



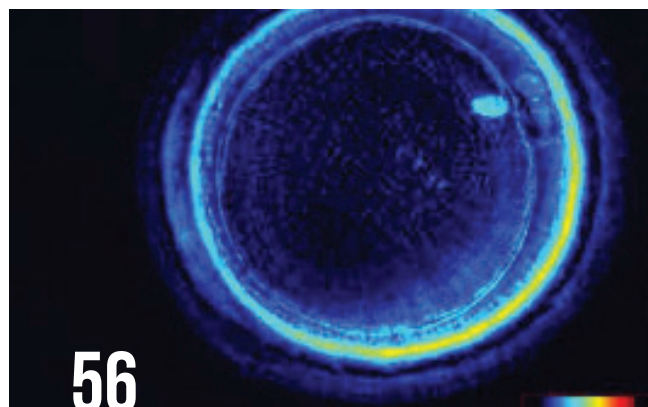
53. МП ооцит спостерігається за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі з видимим веретеном поділу трохи нижче полярного тільця 1 (400-кратне збільшення).



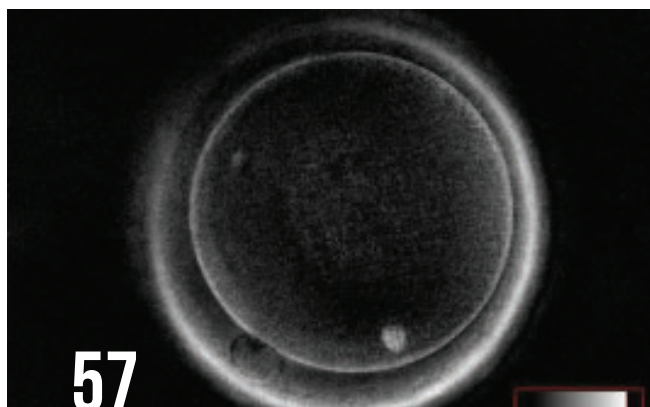
54. МП ооцит спостерігається за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі з видимим веретеном поділу поблизу до полярного тільця 1 (400-кратне збільшення).



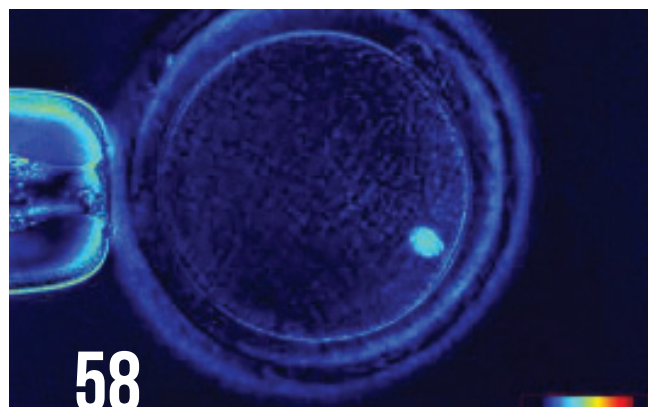
55. МІІ ооцит спостерігається за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі з видимим веретеном поділу трохи нижче полярного тільця, що фрагментовано (два фрагмента). (400-кратне збільшення).



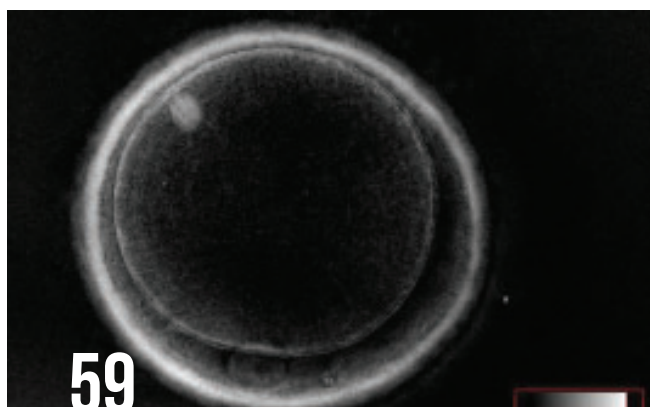
56. МІІ ооцит спостерігається за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі. Веретено поділу чітко видно поруч з полярним тільцем1 (400-кратне збільшення).



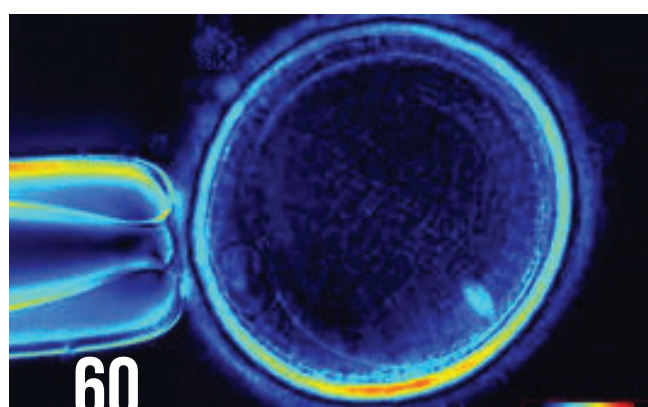
57. МІІ ооцит спостерігається за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі з видимим веретеном поділу злегка зрушеним від полярного тільця 1 в положенні 7 годин (400-кратне збільшення).



58. МІІ ооцит спостерігається за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі з видимим веретеном поділу зрушеним близько 80° від полярного тільця 1 в положенні 1 годин (400-кратне збільшення).



59. МІІ ооцит спостерігається за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі з видимим веретеном поділу високо зрушеним (близько 135°) від полярного тільця1 в позиції 6 годин (400-кратне збільшення).



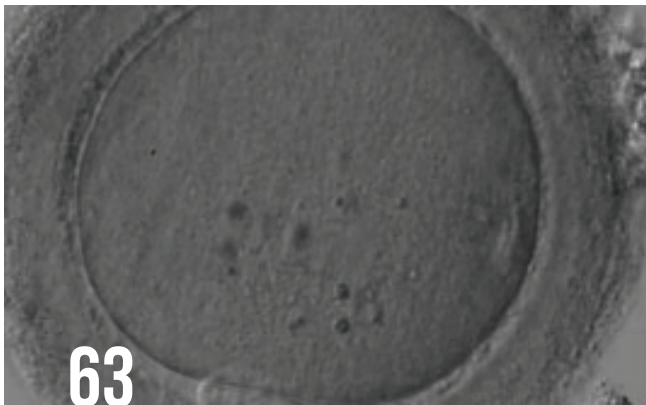
60. МІІ ооцит спостерігається за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі з видимим веретеном поділу високо зрушеним (трохи більше 90°) від полярного тільця I на 8-годинний позиції (400-кратне збільшення).



61. МП ооцит з товстою і щільною зоною пеллюцида (200-кратне збільшення).



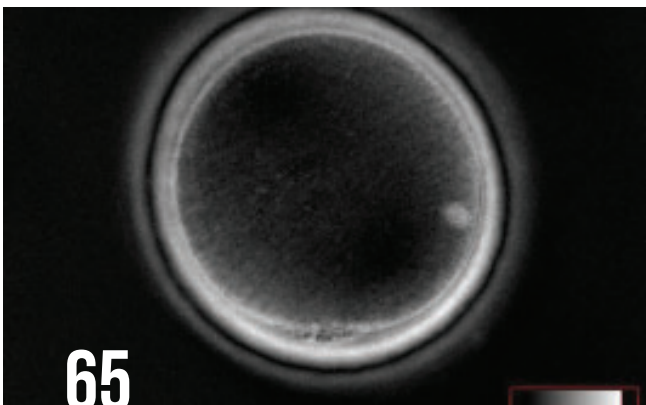
62. МП ооцит з товстою зоною пеллюцида (200-кратне збільшення).



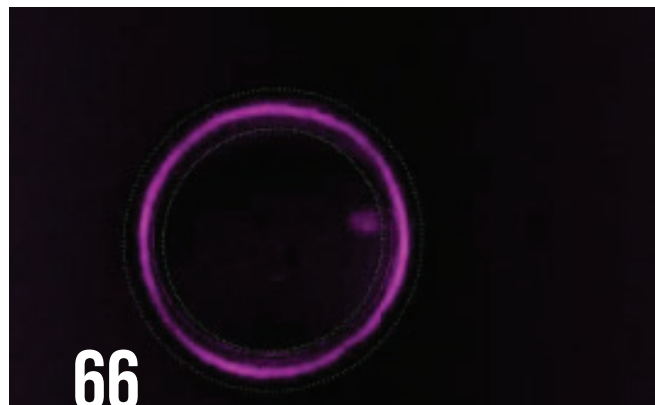
63. МП ооцит з товстою і темною зоною пеллюцида. В ооплазмі видно деякі включення.



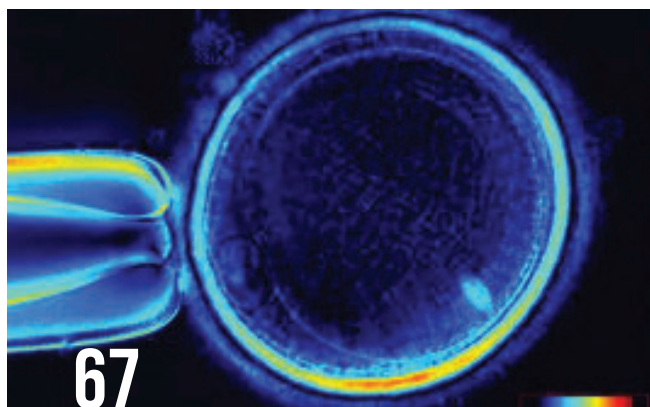
64. МП ооцит з товстою і темною зоною пеллюцида, товщина якої не є однорідною.



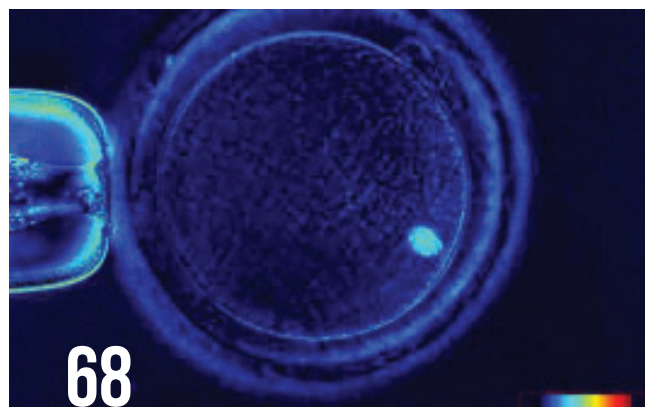
65. МП ооцит спостерігається за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі з чіткою зоною пеллюцида, що має двійне променезаломлення внутрішнього шару. Веретно поділу зрушене від полярного тільця і майже 90° .



66. МП ооцит спостерігається за допомогою мікроскопії в поляризованому світлі з чіткою зоною пеллюцида, що має двійне променезаломлення внутрішнього шару. Веретено поділу чітко видно в позиції 3 години.



67. МІІ ооцит демонструє різні ступені двійного променезаломлення внутрішнього шару зони пеллюцида. Зображення має високу ступінь двійного променезаломлення.



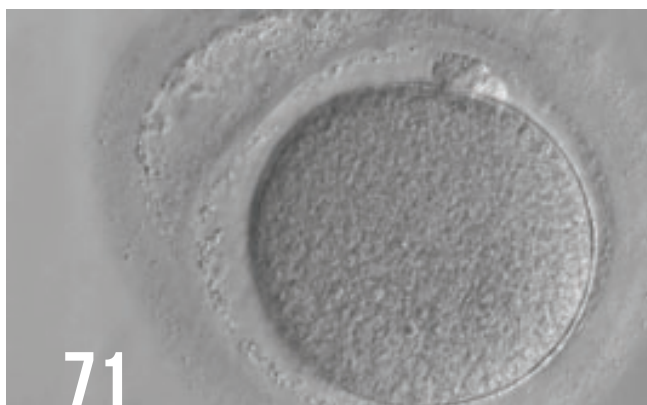
68. МІІ ооцит демонструє різні ступені двійного променезаломлення внутрішнього шару зони пеллюцида. Зображення має низьку ступінь двійного променезаломлення.



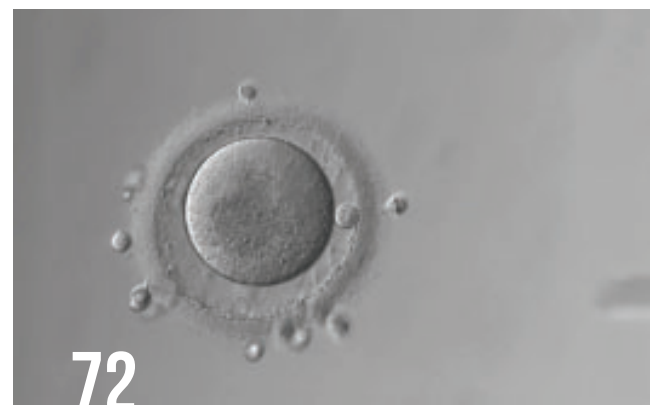
69. Ооцит з аномально сформованою зоною пеллюцида, з дублюванням і розривами. Ооцит має неправильну форму і зовнішній вигляд цитоплазми з полярним тільцем великого розміру.



70. Ооцит з аномально сформованою зоною пеллюцида, з дублюванням і розривами. Ооцит сильно змінений, без видимого полярного тільця¹ в перивітеліновому просторі.



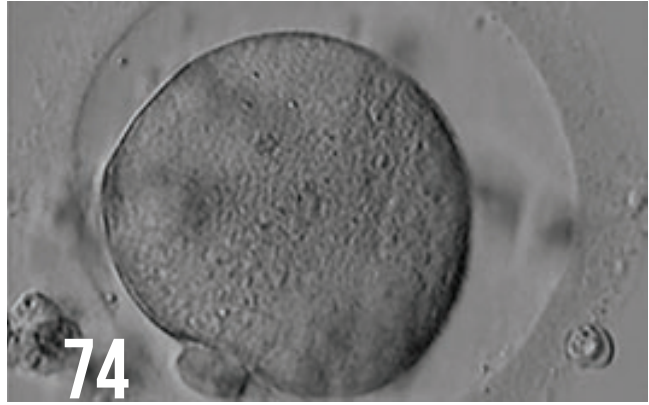
71. Ооцит з аномально сформованою зоною пеллюцида, з дублюванням і розривами. Ооцит має правильну форму.



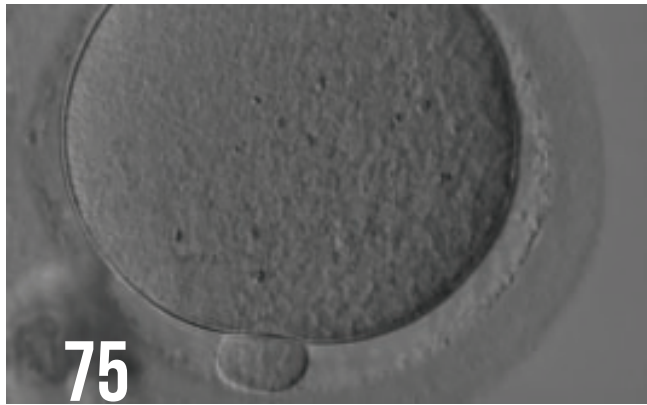
72. Ооцит з великим перивітеліновим простором. Існує велика зерниста область в цитоплазмі.



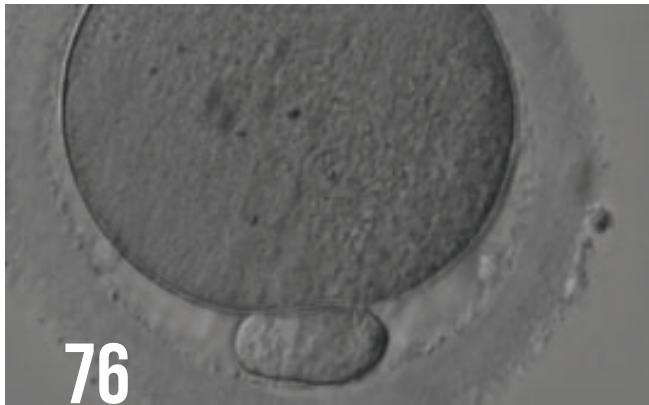
73. Ооцит з великим перивітеліновим простором. Декілька фрагментів в PVS.



74. Ооцит з великим перивітеліновим простором і гранульованою цитоплазмою.



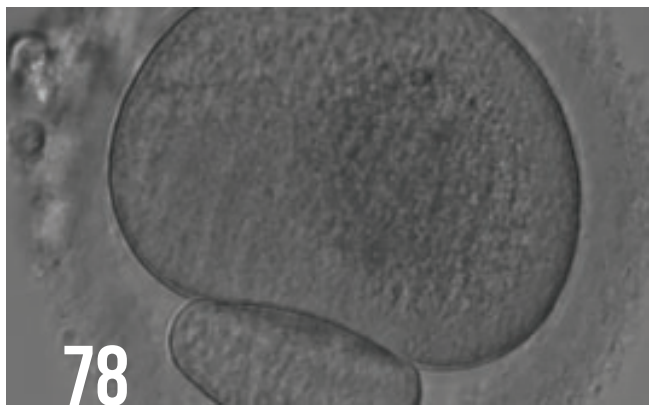
75. МІІ ооцит з полярним тільцем I звичайного розміру.



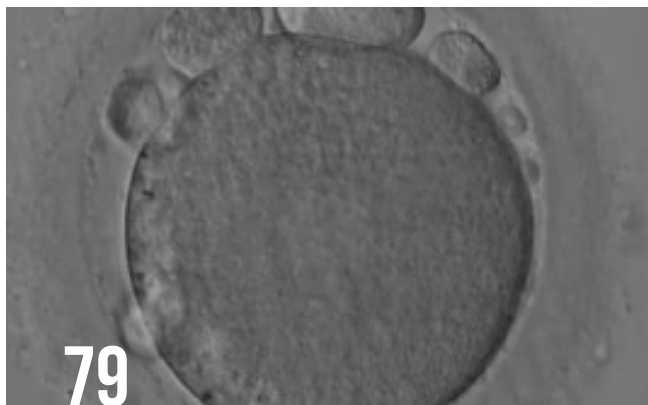
76. МІІ ооцит з великим полярним тільцем I, в 3-4 рази більшим, ніж зазвичай.



77. МІІ ооцит з гігантським полярним тільцем I, в 5-6 разів більшим, ніж зазвичай.



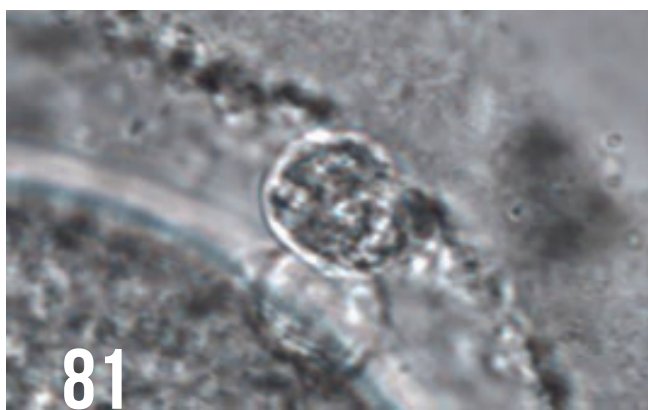
78. МІІ ооцит з гігантським полярним тільцем I.



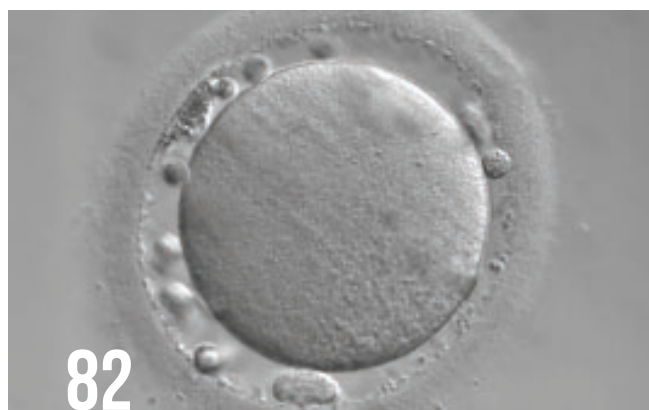
79. МІ ооцит з великими фрагментами і великим полярним тільцем I в перивітеліновому просторі.



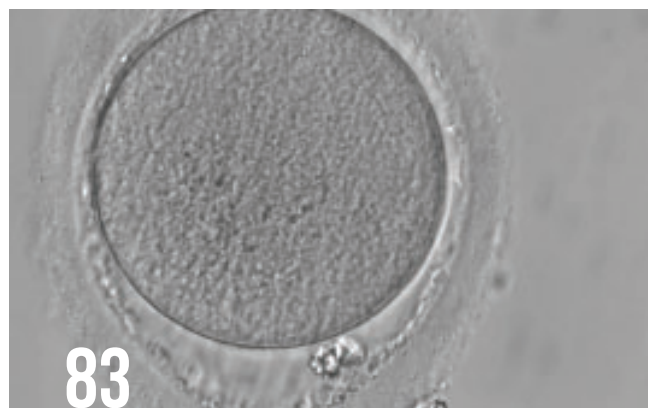
80. МІ ооцит з фрагментованим полярним тільцем I (дві штуки).



81. МІ ооцит з фрагментованим полярним тільцем I (дві штуки) (збільшення $\times 1000$).



82. МІ ооцит з фрагментованим полярним тільцем I і декількома клітинними фрагментами в перивітеліновому просторі, які практично неможливо відрізнити від полярного тільця I.



83. МІ ооцитів з дольково-фрагментованим полярним тільцем I і значними грануляціями в перивітеліновому просторі. Зона пеллюцида має неоднорідну товщину і нерівний внутрішній шар.



84. МІ ооцитів з дольково-фрагментованим полярним тільцем I і значними грануляціями в перивітеліновому просторі. Два тіла включення можна ясно побачити в центрі ооцита.

ЗИГОТА. МОРФОЛОГІЧНА ОЦІНКА

Вступ

//Loredana Papale, Agnese Fiorentino, BSc MAS, Markus Montag, PhD, Giovanna Tomasi, BSc

Взаємодія сперматозоїда з ооцитом ініціює серію динамічних і складних подій та послідовно призводить до запліднення і формування зиготи. Ці події включають в себе проникнення сперматозоїда, злиття сперматозоїда і ооцита, активацію ооцита, формування чоловічого та жіночого пронуклеусів (PNs) і поступову їх міграцію у центральне положення ооцита.

Індукована проникненням сперматозоїда яйцеклітина змінює обмін речовин, показником чого є ряд морфологічних і фізіологічних перетворень (*підвищується проникність клітинної мембрани, посилюється поглинання з навколишнього середовища фосфору і калію, виділяється кальцій, збільшується обмін вуглеводів, активується синтез білка*). В результаті змін молекулярних сигналів, які контролюють арешт мейозу на стадії метафази, запліднена яйцеклітина здійснює материнсько-зиготичний перехід (*maternal-to-zygotic transition, MZT — процес заміни зародком материнських мРНК на свої власні*) (Ajduk et al., 2011). У людини центріоль сперматозоїда відіграє провідну роль в організації мікротрубочок, які направляють міграцію PNs і їх ротацію в цитоплазмі (цю область клітини називають центросомою, саме вона утворює веретено поділу, а не центріоль). PNs розташовують свою вісь в напрямку другого полярного тіла та досягають відповідної орієнтації перед злиттям, контролюючи таким чином площину першого мітотичного поділу. Пронуклеолі (nuclear precursor bodies — NPBs) стають видимими, починають мігрувати і зливаються, з часом, в ядро (нуклеоль). NPBs не утворюють функціонально активне ядро на стадії зиготи; тим не менше, вони можуть бути використані в якості оцінки непрямого показника розташування і ступеня конденсації ДНК в PNs. Нуклеолі є місцем синтезу пре-мРНК, і їх доступність є надзвичайно важливою, оскільки нова синтезована мРНК необхідна для трансляційних процесів під час активізації ембріонального геному (Gianaroli et al., 2003). Асинхронність у часі будь-якої з подій, пов'язаних із

заплідненням, може поставити під загрозу розвиток ембріона.

Як тільки PNs вирівнюються на полярній вісі, батьківські хромосоми відокремлюються, готуючись до мітозу. Мітотичний потенціал зиготи успадковується разом із сперматозоїдом, який доставляє центросому. (Palermo et al., 1994; Sathananthan et al., 1996).

Морфологічні характеристики зиготи є невід'ємним показником якості гамет і імплантаційного потенціалу ембріону (Alpha Scientists in Reproductive medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Багато досліджень підкреслюють прогностичну цінність морфологічної оцінки зиготи через її кореляцію з будовою хромосом і частотою зупинки поділу (Gianaroli et al., 2003; Balaban et al., 2004; Edirisinghe et al., 2005; Zamora et al., 2011). Невдавні стратегії в селекції ембріонів включають в себе послідовну оцінку морфології, де підрахунок PN, як було показано, відіграє важливу роль як показник якості гамет, а також як предиктор компетенції ембріона. Оцінка PN також виявилася корисною в тих країнах, де законодавство обмежує вибір для переносу ембріона на стадії зиготи і відповідного виключення з програми або кріоконсервації сестринських зигот (Senn et al., 2006; Zollner et al., 2005).

Незважаючи на численні дослідження, що демонструють позитивні клінічні результати з використанням оцінки PN, інші звіти ставлять під сумнів прогностичну цінність систем оцінки PN і не бачать жодних переваг або поліпшення в результатах (Nicoli et al., 2010; Weitzman et al., 2010). Консенсус семінар в Стамбулі залучив всесвітню групу експертів, які тільки нещодавно надали свої думки про існуючу практику оцінки розвитку від ооцита до ембріона і встановлені загальні критерії оцінки (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Перевірка запліднення має бути виконана через 17 ± 1 годин після інсемінації; стандартизація часу проведення оцінки допоможе уникнути варіативності оці-

ночних схем PN в майбутньому, дозволить робити порівняльний аналіз. Слід, однак, відзначити, що процеси, пов'язані із заплідненням за допомогою IVF запізнюються на 1 год., порівняно із заплідненням з використанням ICSI (Nagy et al., 1998). Більш повне вивчення ембріона на стадії зиготи, однак, можливе за рахунок впровадження time-lapse мікроскопії, замість традиційних ізольованих спостережень за допомогою світлової мікроскопії (Montag et al., 2011).

Перевірка запліднення має бути виконана через 17 ± 1 годин після інсемінації; стандартизація часу проведення оцінки допоможе уникнути варіативності оціночних схем PN в майбутньому, дозволить робити порівняльний аналіз.

Нормальним заплідненням вважається наявність двох центрально-розташованих накладених один на одного PNs з чітко визначеними мембранами і двома полярними тільцями. Аномальна кількість PNs (1, або 3, або більше) — зазвичай пов'язана з низькою життєздатністю ембріона і, таким чином, трансфера цих зигот слід уникати.

(Reichman et al., 2010). Відхилення в розмірі і розташуванні PN, відстані один від одного або не периферії клітини, наявність фрагментації або додаткового мікропронуклеуса корелюють з припиненням розвитку і анеуплоїдією (Munné and Cohen, 1998; Sadowy et al., 1998; Garello et al., 1999; Nagy et al., 2003; Scott et al., 2007). Наявність кластерів гладкого ендоплазматичного ретикулуму (SER) в зиготах є потенційно небезпечним, використання таких клітин для трансферу або кріоконсервації недоцільно у зв'язку з несприятливими клінічними результатами (Otsuki et al., 2004; Ebner et al., 2008).

Фахівці Семінару-консенсусу визначили три категорії для оцінки PN, що засновані на морфології розташування NPBs і PNs, а саме: (I) симетричність, (II) несиметричність і (III) аномальність (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Категорія 1 включає в себе зиготи з однаковою кількістю і розміром NPBs, які вишикувані по лінії з'єднання PNs або розсіяні в обох PNs. Категорія 2, несиметрична, включає в себе всі інші моделі, у тому числі, периферійно локалізовані PNs. Категорія 3, аномальна, включає в себе поодинокий NPB («бичаче око») або повну відсутність NPBs. Останнє, як було показано в моделях на тваринах, корелює з помилками імпринтингу та відтермінованим початком

функціонування NPBs і формуванням ядерця (Svarcova et al., 2009).

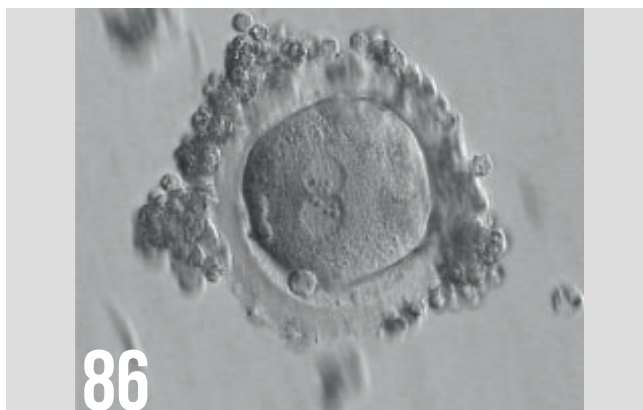
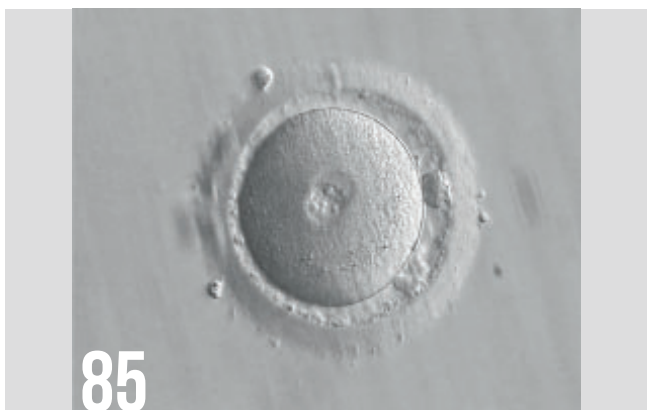
Результати досліджень продемонстрували, що оцінка ембріонів на ранньому етапі розвитку може стати корисним інструментом при виборі ембріонів з високим потенціалом імплантації та відсутністю хромосомних аномалій (Sakkas et al., 1998; Lundin et al., 2001). На думку Консенсусу друге спостереження ембріонів у день залежить від призначення ембріолога, але в разі його застосування, має бути виконано через 26 ± 1 і 28 ± 1 годин після запліднення за допомогою ICSI і IVF, відповідно.

Використання time-lapse моніторингу має допомогти прояснити розбіжності в літературних даних щодо оцінки PN, поглиблений аналіз і кореляцію з клінічною історією статевих клітин, що утворюють зиготи, а також стануть підґрунтям для пошуку більш надійних прогностичних маркерів для покращення клінічних результатів.

А. ОЦІНКА ЗАПЛІДНЕННЯ

А.1 2PN

Під час проведення оцінки через 17 ± 1 годин після інсемінації, беручи до уваги той факт, що формування пронуклеуса зиготи при IVF відстає на 1 годину порівняно з ICSI, нормально запліднений ооцит має бути круглої форми та мати два полярних тільця та два PN (Мал. 85–87). PN повинні розташовуватись поруч, бути приблизно одного розміру, розміщуватись в центрі цитоплазми, мати дві чітко видимі мембрани (Мал. 88). Наявність однакової кількості та розміру NPB, розташованих на з'єднанні PN, свідчить про високий потенціал ембріона (Tesarik and Greco, 1999; Tesarik et al., 2000; Scott, 2003).



85. Зигота 16,5 годин після ICSI з PN малого розміру з розкиданими NPB та двома видимими полярними тільцями ($400 \times$ збільшення). Блискуча оболонка ооцита (ZP) є нормальною; в перивітеліновому просторі (PVS) є дебрис. Цитоплазма однорідна з чіткою кортикальною зоною. Після перенесення зиготи, була отримана клінічна вагітність, що закінчилась викиднем.

86. Дещо деформована зигота 16,5 годин після IVF з однаковою кількістю великих за розміром NPB, що розташовані на з'єднанні з PN ($400 \times$ збільшення). Великий кут розділяє два полярних тільця. Навколо ZP є клітини гранульози. Ембріон перенесли, проте імплантація не відбулась



87. Зигота 18,5 годин після стандартного запліднення з використанням розмороженого еякуляту ($400 \times$ збільшення). Два PN розташовані в центрі: один дещо більший за інший. NPB однакового розміру, проте різної кількості та агреговані на суміжних кордонах кожного PN. ZP тонка. Ембріон перенесли, проте імплантація не відбулась.

88. Зигота після ICSI-NPB рівно розміщені на з'єднанні з PN, що розташовані в центрі ($600 \times$ збільшення). Фрагментовані полярні тільця розташовані по поздовжній вісі PN. Після оцінки була присвоєна Категорія 1 (що відповідає категорії Z1; Scott, 2003). В PVS є дебрис. Цитоплазма світла з чіткою корковою зоною. Зиготу перенесли і вона імплантувалась.

А.2 1PN

Частота випадків одного пронуклеуса приблизно 1% після IVF або ICSI. Згідно хромосомного аналізу, який показав гаплоїдний набір у приблизно половині досліджених ооцитів, причина може мати партеногенетичний характер (Plachot, 2000). В деяких випадках тільки одне полярне тільце витіснене в перивітеліновий простір (PVS) (мал. 89).

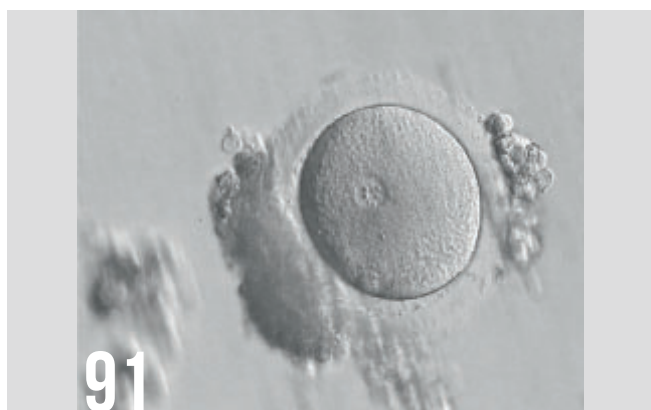
Наявність 1PN може бути результатом помилок процесу запліднення з асинхронністю формування PN або злиття PN. В таких випадках отриманий ооцит може мати диплоїдний набір хромосом і два полярних тільця (мал. 90–93). Перенос ембріонів з таких яйцеклітин можна зробити, проте частота анеуплоїдій в таких ембріонах відмічена як значно вища, ніж у ембріонів, отриманих з ооцитів з 2PN (Yan et al., 2010).



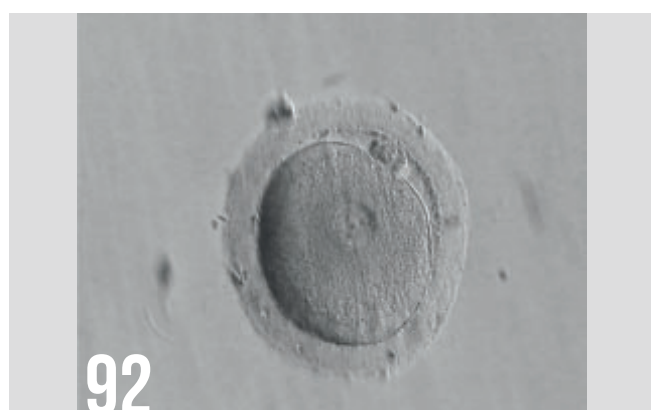
89. Одиничний ооцит на стадії пронуклеуса з лише одним PN та одним полярним тільцем — 16 годин після ICSI (200×збільшення). Контроль через 17,5, 20 та 22 години після ICSI, значних змін в розмірі або розташуванні PN не було відзначено.



90. Зигота 15 годин після IVF з одним великим за розміром PN та двома полярними тільцями (400×збільшення).



91. Зигота 17 годин після IVF з одиничним PN з NPВ різного розміру та двома полярними тільцями (400×збільшення).

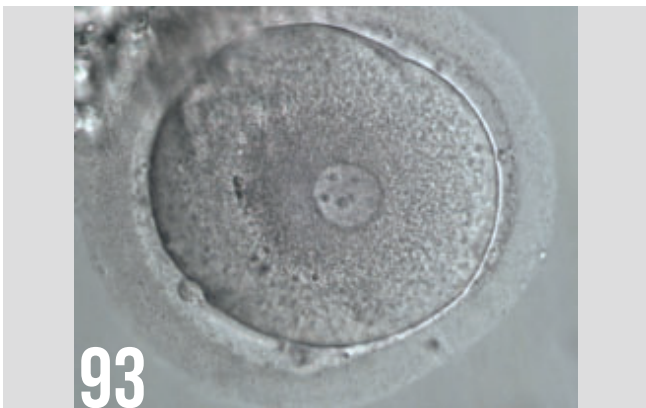


92. В цьому ооциті через 16 годин та 45 хвилин після IVF було виявлено одиничний великий PN та два полярних тільця (частково перекривають один одного) (400×збільшення). Видимі чотири NPВ великого розміру. Отриманий ембріон перенесли, проте вагітності не отримали.

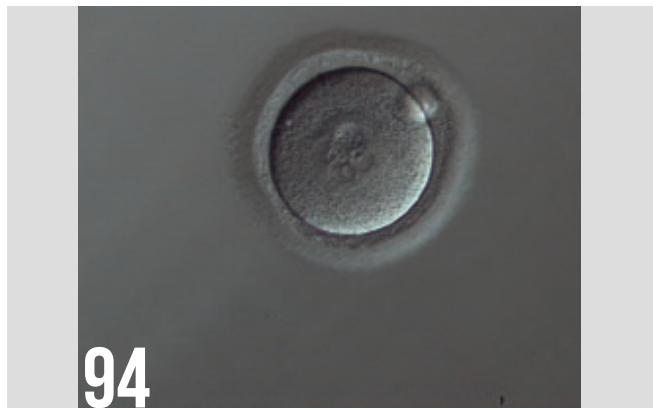
A.3 $\geq 3PN$

Формування триплоїдних зигот від самого початку залежить від методу їх запліднення — ICSI або IVF. Лише 1% яйцеклітин після запліднення ICSI стають трипронуклеарними зиготами; вони дигенні, що унеможливує екструзію другого полярного тільця (мал. 94). Виключенням є величезні яйцеклітини (мал.95), які мають різні структури екструзії, що призводить до їх загального диплоїдного стану (Розділ перший. Ооцити).

Діандрія (триплоїдія) є однією з імовірних причин утворення трьох пронуклеусів після IVF та трапляється для ~5% запліднених ооцитів (мал. 96). Цей стан може бути спричинений проникненням двох сперматозоїдів в цитоплазму внаслідок відсутності захисту яйцеклітини від поліспермії. Друге полярне тільце зазвичай витіснене, та часто має місце поділ. В деяких випадках наявність чисельних PN може бути викликана відсутністю цитокінезу (мал 94 і 97) або проникненням двоядерного сперматозоїду (мал. 98).



93. Ооцит, запліднений методом ICSI, з одиничним PN та двома полярними тільцями, що розташовані на відстані один від одного (600×збільшення).



94. Зигота після запліднення за допомогою ICSI з 4 PN (2 приблизно однакового розміру та 2 з меншим розміром) (150×збільшення). Візуалізується лише одне полярне тільце.



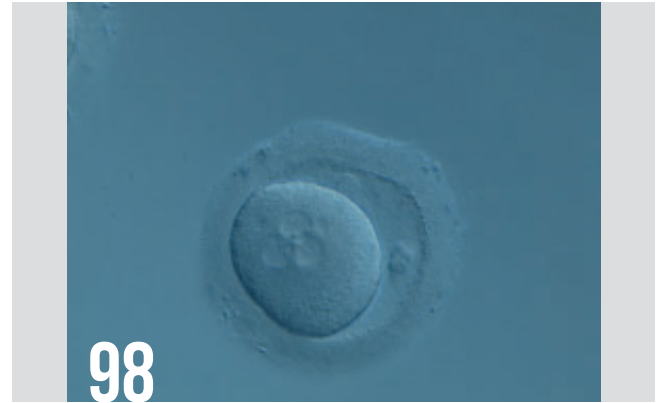
95. Зигота з 3PN та великими за розміром NPB (400×збільшення). Один з трьох PN дещо більший за інші. Зигота отримана після запліднення методом ICSI величезного ооцита.



96. Зигота з 3 PN приблизно одного й того ж розміру з NPB великого розміру, що частково нашаровуються один на одного та розміщені в середині ооцита (400×збільшення). Зиготу отримано після IVF. Візуалізуються два полярних тільця.



97. Зигота з 5PN, з зоною цитоплазми, фрагментованими полярними тільцями, з овальною та темною ZP (400×збільшення). Була розморожена після вітрифікації.



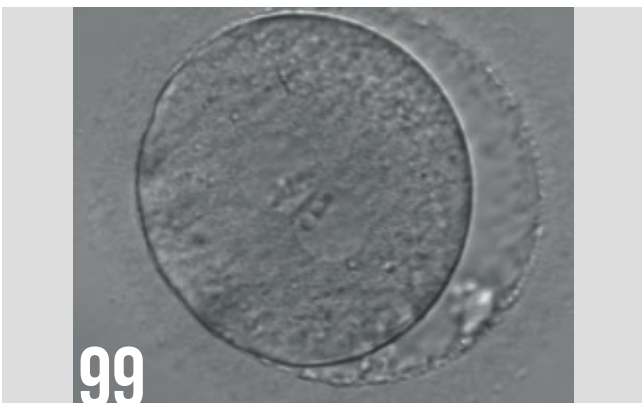
98. Зигота з 3 PN після IVF з малим фрагментом, приєднаним до PN (200×збільшення). Візуалізуються два полярних тільця у великому PVS та щільній ZP.

В. РОЗМІР ПРОНУКЛЕУСА

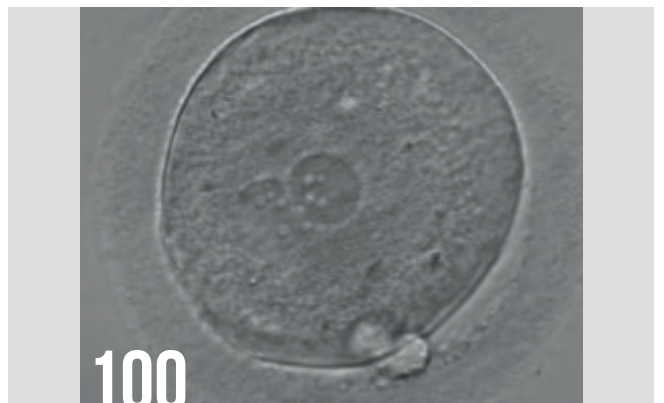
В.1 Нормальний

В деяких роботах вказується, що розмір PN залежить від якості гамет. Деконденсація щільного хроматину сперми – це важливий крок у заплідненні, що включає в себе заміну протамінів на гістони під контролем факторів деконденсації ооцитів. Таким чином, розмір чоловічого PN залежить від ядерної структури сперми та від здатності яйцеклітини викликати деконденсацію шляхом вивільнення певного рівня глутатіону.

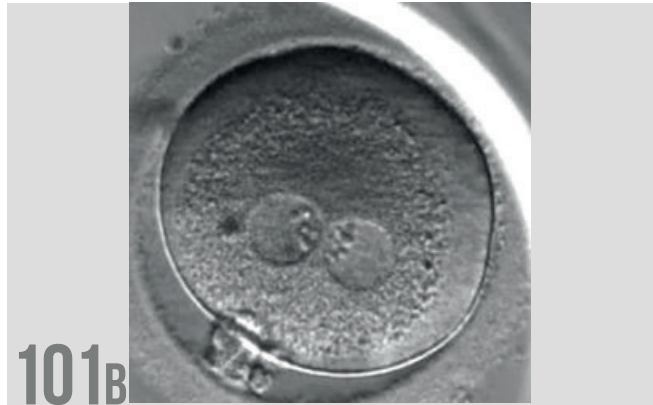
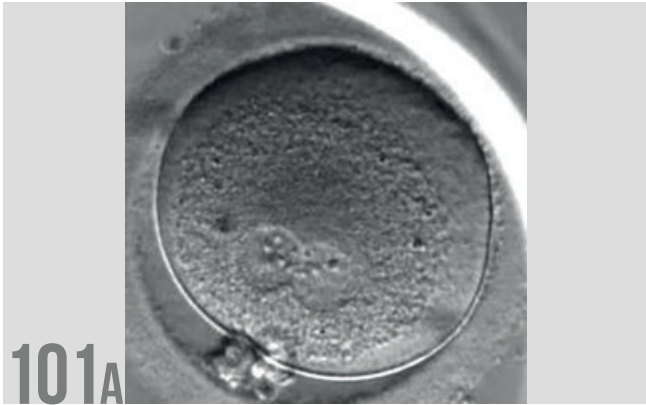
PN, зазвичай, є однаковими за розміром, не дивлячись на те, що жіночий PN, часто розташований біля другого полярного тільця, може бути дещо меншим (мал. 99 та 100). Однак, утворення PN та його обертання є динамічним процесом, як показує його time-lapse відео зйомка, тобто розташування та морфологія PN дуже залежать від часу (мал.101).



99. Зигота 18 годин після ICSI (400×збільшення). Два PN розташовані в центрі та накладені один на одній в цитоплазмі (периферична грануляція), приблизно одного розміру, з різною кількістю та розміром NPB. PN справа має меншу кількість нуклеолей, проте вони більші за розміром. В дещо збільшеному PVS візуалізується дебрис. Перенос був на 3 добу (вісім клітин) разом з двома іншими ембріонами, відбулися пологи живонародженим хлопчиком.



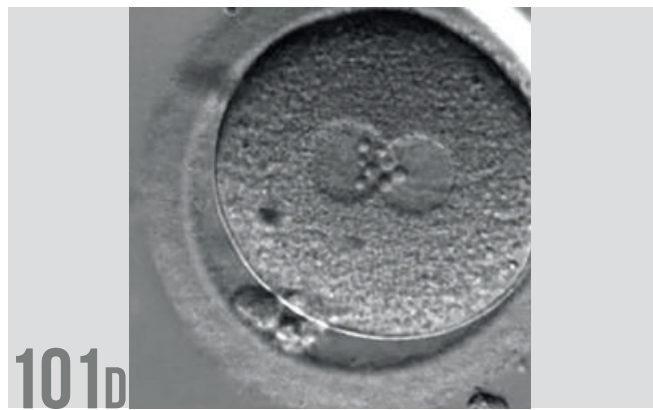
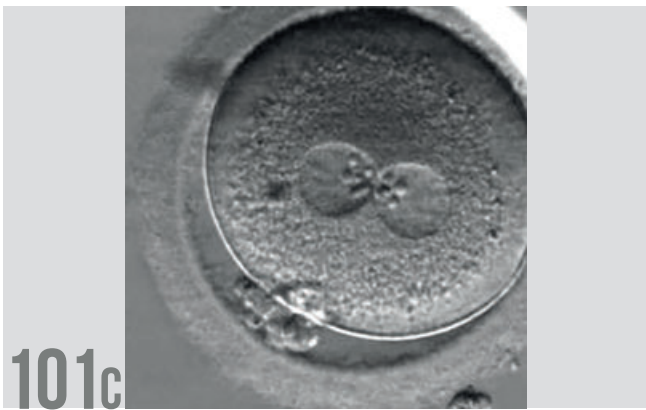
100. Зигота з рівною кількістю великих за розміром NPB, розсіяними відносно з'єднання PN. (400×збільшення). PN розташовані поруч та дещо ексцентрично. Два полярних тільця розташовані в площині, паралельній повздовжній вісі PN.



101. Зигота зі змінами картини PN, зокрема щодо положення в цитоплазмі і місця розташування NPBs з плином часу

101 (b). 15,4 години після ICSI (400×збільшення).

101 (a). 11,7 годин після ICSI (400×збільшення).



101(c). 18,3 години ICSI (400×збільшення).

101(d). 28,3 години після ICSI (400×збільшення).

В.2 Малий розмір

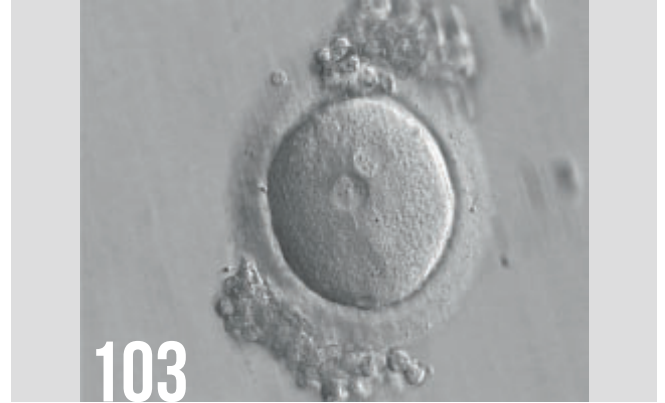
Розмір PN залежить від часу спостереження зі збільшенням у розмірі майже на 50% від початку до 17 годин після ICSI (Payne et al., 1997). Наявність PN з діаметром меншим, ніж звичайно (мал. 102–104), за умови нормального часу запліднення, може бути індикатором пізнього запліднення, викликаного незрілістю ооцита або дефектом гамет. Незважаючи на це, в результаті переносу таких зигот може відбуватися імплантація (мал. 103).

В.3 Різниця в розмірі

Значна різниця ($>4 \mu\text{m}$) між розміром PN (мал. 105–108), наявність мікроядер або фрагментованих PN (мал. 109 та 110) вважається аномальною. Такі явища пов'язують з хромосомними перебудовами та втратою потенціалу розвитку (Munné and Cohen, 1998; Scott et al., 2000; Nagy et al., 2003; Scott et al., 2007; Alpha Scientists in Reproductive medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Клінічні дослідження показали високу кореляцію між зиготами, що через 16-18 год. після запліднення демонстрували великі відмінності в розмірах PN, та їх життєздатністю *in vivo* та *in vitro* (Sadowy et al., 1998; Scott et al., 2000), їх здатністю підтримувати життєздатність і розвиток як в природних умовах і «в пробірці» (Sadowy і ін., 1998; Scott та ін., 2000). Таким чином, при селекції слід уникати переносу цих ембріонів.



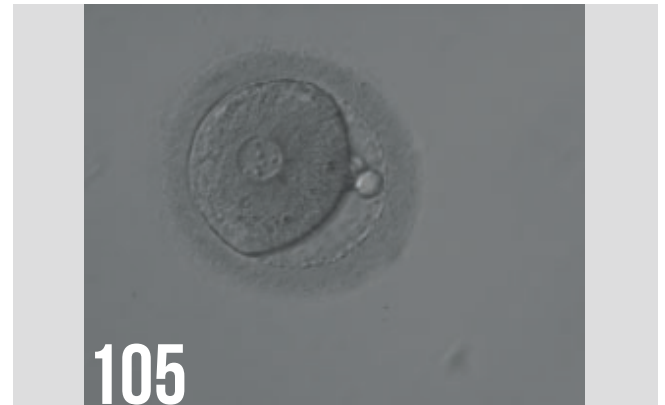
102. Зигота після запліднення методом ICSI на 18 годині після інсемінації (400×збільшення). PN дещо меншого розміру, ніж звичайно, відмічена нерівність у кількості та розміщенні NPB. Полярні тільця мають більший розмір, ніж зазвичай.



103. Зигота, отримана після IVF, з використанням розмороженої сперми, контроль 16 годин після інсемінації (400×збільшення). PN меншого розміру, ніж звичайно, та розміщуються не чітко по центру ооцита. Малі NPB розташовані близько один до одного на з'єднанні з PN. Ембріон перенесений, імплантація відбулась.



104. Зигота з двома маленькими PN, розміщеними дуже близько (600×збільшення). NPB більші за розміром, однакові щодо кількості та розкидані по двом PN. ZP ущільнена, PVS майже відсутній.



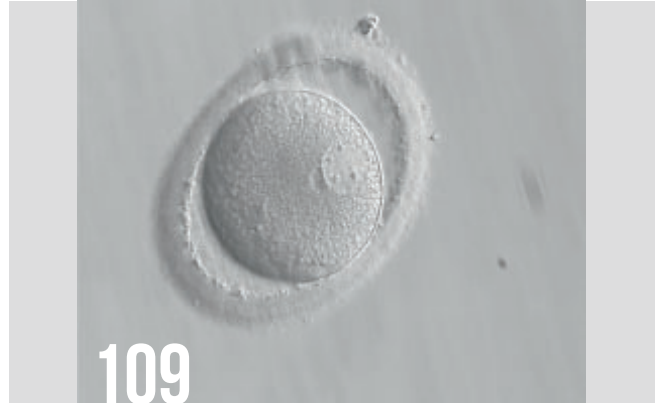
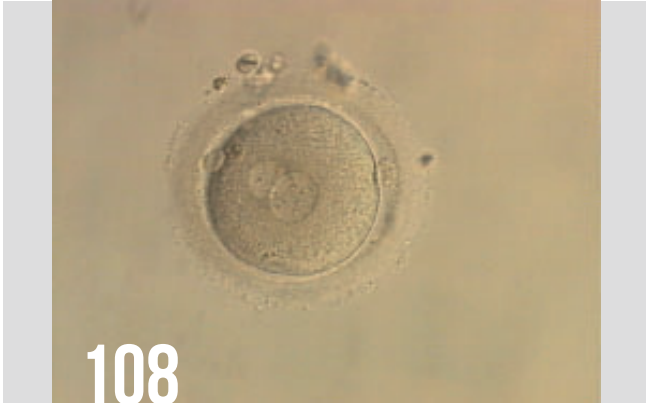
105. Зигота 18 годин після ICSI з надзвичайно нерівними PN, малі PN погано візуалізуються (200×збільшення). Два полярних тільця, малі за розміром NPB розсіпані по PN.



106. Зигота з двома полярними тільцями та різними за розміром PN, що розташовані близько один до одного, спостерігається різна кількість та розміщення малих за розміром NPB (200×збільшення).

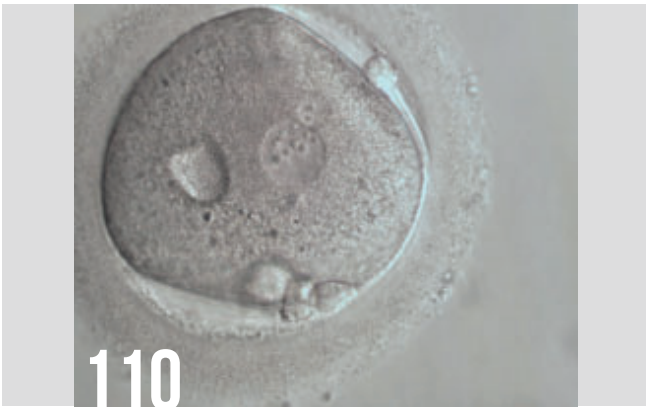


107. Зигота 18 годин після інсемінації з різними за розміром PN, спостерігається різна кількість та розташування NPB (400×збільшення). Ембріон перенесли на 3 добу розвитку (7 клітин) разом з двома іншими ембріонами. Таким чином, результат імплантації саме цього ембріону невідомий. Проте, пацієнтка народила здорового хлопчика.



108. Зигота після застосування ICSI з одним великим та одним нормальним за розміром PN (200×збільшення). Два полярних тілець розташовані на протилежних сторонах яйцеклітини.

109. Зигота після проведення біопсії полярного тілець. Периферійно розташовані PN дуже різняться за розміром, один з них більший, а другий менший, ніж звичайно (400×збільшення). ZP овальної форми.



110. Зигота 18 годин після проведення ICSI. PN розташовані дуже близько один до одного, надзвичайно нерівні за розміром, спостерігається різна кількість та розподіл NPB (600×збільшення). В цитоплазмі наявна структура, подібна до вакуолі. В PVS присутні фрагменти, що погано відокремлюються від полярних тілець.

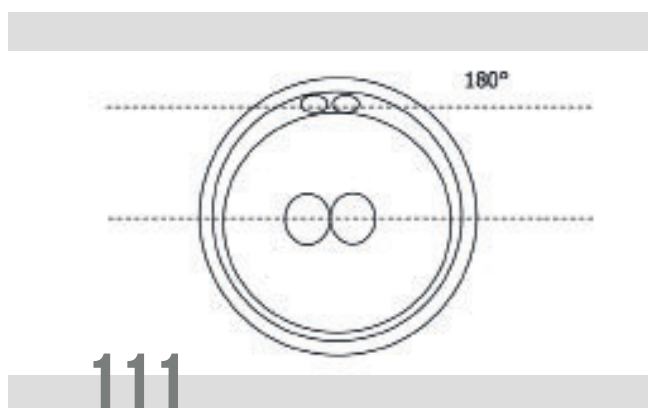


ЗС. МОРФОЛГІЯ ПРОНУКЛЕУСА

С.1 Вирівнювання паралельне/ дотичне до площини полярних тіл

При екструзії другого полярного тілець після проникнення сперматозоїду та активації ооцита, встановлюється полярна вісь. Правильне розташування PN щодо цієї вісі необхідне для формування полярних вісей при заплідненні та подальшому завершенню першої стадії поділу та нормального розвитку (Edwards and Beard, 1997; Payne et al., 1997; Garello et al., 1999; Gardner, 2001; Scott, 2001). В апозії, хроматин обох PN полярних тілець починає поляризуватися та обертатися для того,

щоб чоловічий PN, що обертається навколо жіночого PN, зустрівся з останнім, а центросома розмістилась в проміжку між двома PN (Van Blerkom et al., 1997). Таким чином, повздожжня вісь PN паралельна площині полярних тілець (мал. 111–115). Подальше обертання вирівнює PN по відношенню до полярної вісі; розташування другого полярного тілця окреслює площину першої стадії поділу (мал. 116–121). Всі ці рухи та обертання можуть спричинити формування чіткої кортикальної зони, відомої як halo (мал. 114, 118 та 119).



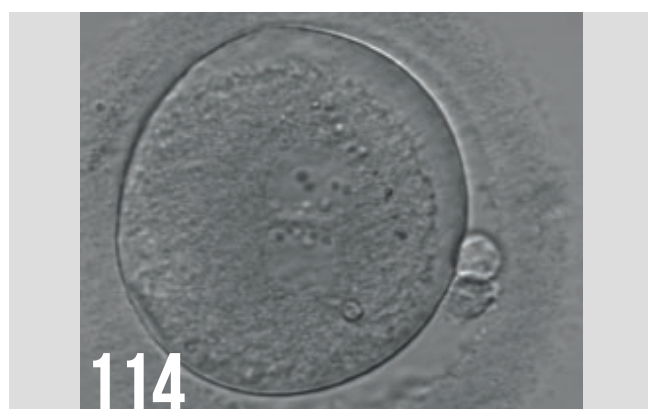
111. Діаграма показує проекцію лінії, яка проходить через полярні тілця, що паралельна до порівнюваної проекції через повздожжню вісь.



112. Зигота після ICSI з різною кількістю великих за розміром NPB, що знаходяться паралельно до з'єднання PN (200×збільшення). PN щільно прилягають один до одного та знаходяться в центрі; полярні тілця розташовані паралельно відносно повздожжньої вісі через PN.



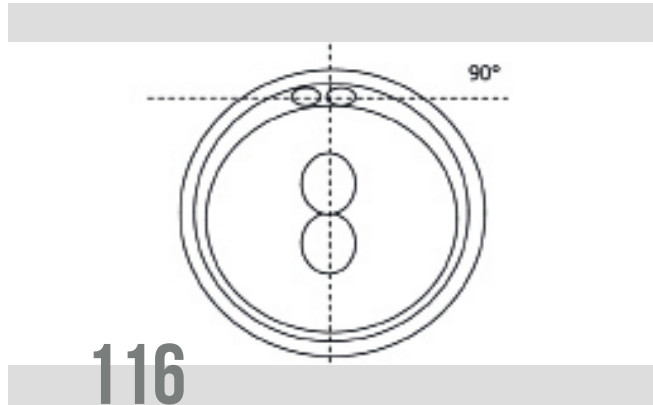
113. Зигота після запліднення методом ICSI з великими NPB, вирівняними відносно з'єднання PN (200×збільшення). PN щільно прилягають один до одного та знаходяться в центрі, фрагментовані полярні тілця розташовані паралельно відносно повздожжньої вісі через PN ($\pm 30^\circ$).



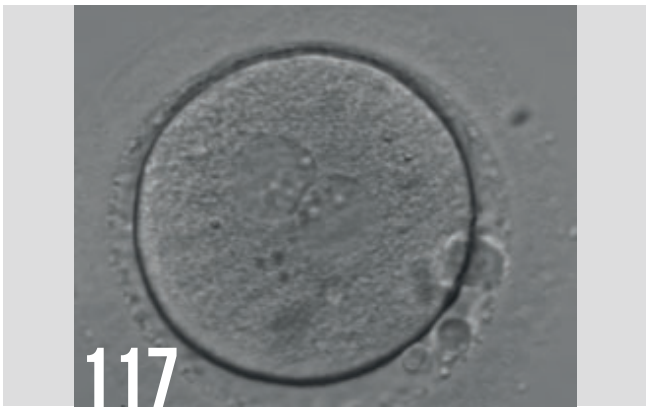
114. Зигота після ICSI з PN, що щільно прилягають один до одного, та розміщені в центрі. Рівняння PN — паралельне відносно лінії полярних тілець. В зиготі є нерівна кількість та розташування NPB. Останні розташовані в одну лінію в одному PN та розсіпані в іншому PN відносно лінії з'єднання PN. Чітка кортикальна зона з деякими включеннями, відмічаються безпосередньо в нижній частині поля. Зиготу перенесли на 3 добу (ембріон з 8 клітинами поділу), але імплантація невдала.



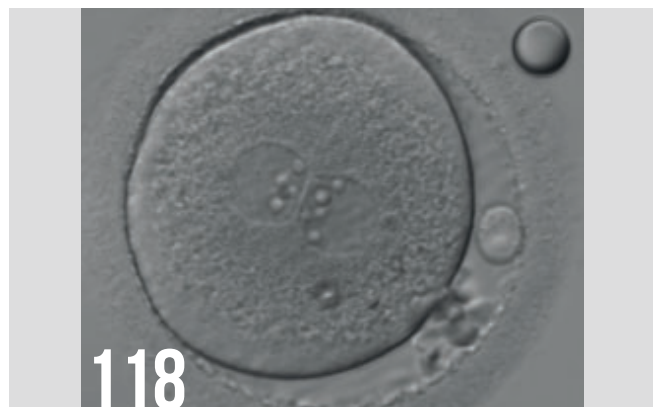
115. Зигота з однаковою кількістю великих NPB, що розташовані лінійно на з'єднанні PN (400×збільшення). PN щільно прилягають один до одного та знаходяться в центрі, полярні тільця розташовані паралельно відносно повздовжньої осі через PN. Спостереження 16 годин після IVF.



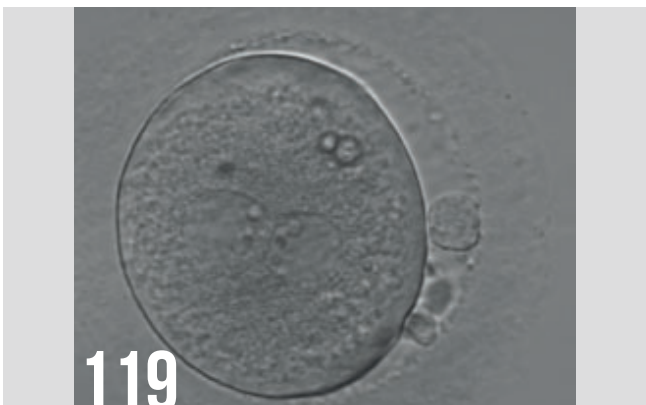
116. Діаграма показує проекцію лінії полярних тілець, що дотичною (тангенціальною) відносно порівнюваної проекції повздовжньої осі PN.



117. Зигота після ICSI з NPB великих розмірів, вирівняних відносно з'єднання PN (400×збільшення). PN щільно прилягають один до одного та знаходяться в центрі; полярні тільця (перше полярне тільце фрагментоване, друге непошкоджене) розміщені тангенціально (дотично) відносно повздовжньої осі через PN.



118. Зигота після ICSI з великими NPB, вирівняними відносно з'єднання PN (400×збільшення). PN щільно прилягають один до одного та знаходяться в центрі; полярні тільця (перше полярне тільце фрагментоване, друге непошкоджене) розміщені тангенціально (дотично) відносно повздовжньої осі через PN.



119. Зигота після ICSI з великими NPB, вирівняними відносно з'єднання PN (200×збільшення). PN щільно прилягають один до одного та знаходяться в центрі, дотично відносно лінії полярних тілець. Перенос був на 3 добу (7 клітин) разом ще з двома ембріонами, проте імплантації не відбулось.



120. Зигота 16,5 годин після IVF з PN, що щільно прилягають один до одного та знаходяться в центрі, вони вирівняні дотично відносно лінії полярних тілець (400×збільшення). NPB розсіпані в одному PN та паралельні лінії з'єднання в іншому. Яйцеклітина неправильної форми, PVS збільшений. Після переносу імплантація не відбулась.



121. Деформована зигота з периферійними PN та полярними тільцями, PN розташовані дотично до лінії полярних тілець. Спостереження через 15 годин після IVF (400×збільшення). Полярні тільця дуже дизморфні. В цитоплазмі є маленькі вакуолі.



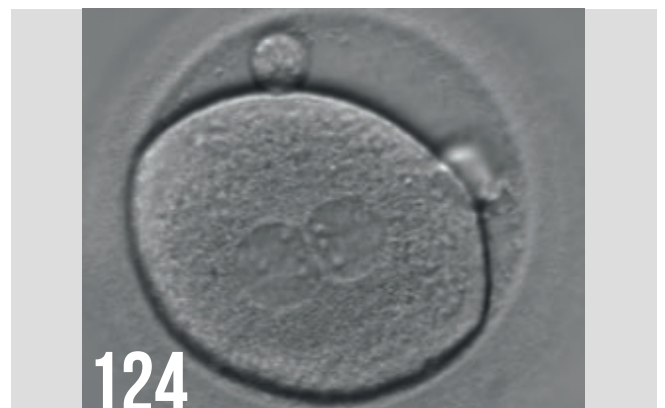
122. Зигота після ICSI з двома PN приблизно однакового розміру, що щільно розташовані один до одного, чітко візуалізуються в центрі цитоплазми (400×збільшення). Полярні тільця розвернуті на $>30^\circ$ відносно повздовжньої вісі PN. Наявні чітка кортикальна зона та груба зернистість цитоплазми. Перенос відбувся, проте імплантації не вдала.

С.2 Великий кут між полярними тільцями

Нездатність до щільного з'єднання та центрального розміщення PN в цитоплазмі або наявність не вирівняних відносно PN полярних тілець при контролі запліднення, може спричинити зміну у розвитку, тобто відсутність запліднення або аномальний поділ ембріона (Gianaroli et al., 2003; Alpha Scientists in Reproductive medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Великі кути між полярними тільцями (мал. 122–124) можуть слугувати показниками поганого розвитку ембріона (Gianaroli et al., 2003). Причиною може бути субоптимальна орієнтація PN (мал. 125 та 126), що викликає високий рівень турбулентності цитоплазми, в свою чергу це сприяє нерівності поділу або фрагментації (Garello et al., 1999).



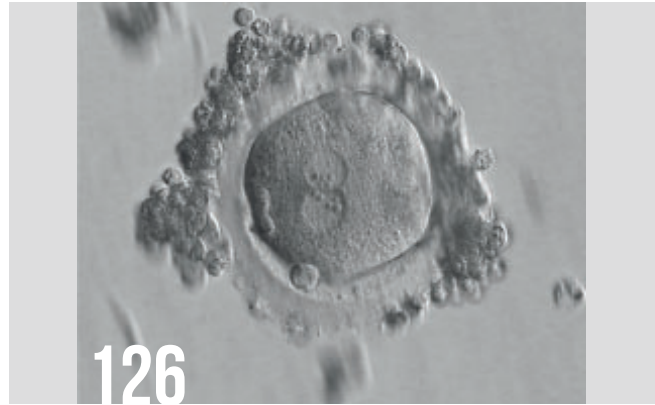
123. Зигота 18 годин після ICSI з нерівною кількістю та спрямуванням NPV (400×збільшення). PN щільно прилягають один до одного та знаходяться в центрі, NPV розміщені поруч з лінією з'єднання в одному PN та розкидані по відношенню до з'єднання в іншому PN. Полярні тільця розвернуті на $>30^\circ$ відносно повздовжньої або меридіанної вісі з великим проміжком між ними. Візуалізується чітка кортикальна зона та деякі темні включення. Перенос здійснено, проте імплантація була невдалою.



124. Зигота неправильної форми 18 годин після ICSI (400×збільшення). Видимі PN мають нерівномірний розподіл NPV, щільно прилягають один до одного та знаходяться в центрі, полярні тільця створюють великий кут відносно повздовжньої вісі PN. Перенос зробили, імплантація не відбулась.



125. Зигота з NPВ великих розмірів, що хаотично розкидані відносно з'єднання PN (400×збільшення). Візуалізується чітка кортикальна зона в цитоплазмі, ZP товста та дуже щільна. Полярні тільця утворюють великий кут відносно повздовжньої вісі PN. Перенос зробили, проте результат імплантації невідомий.



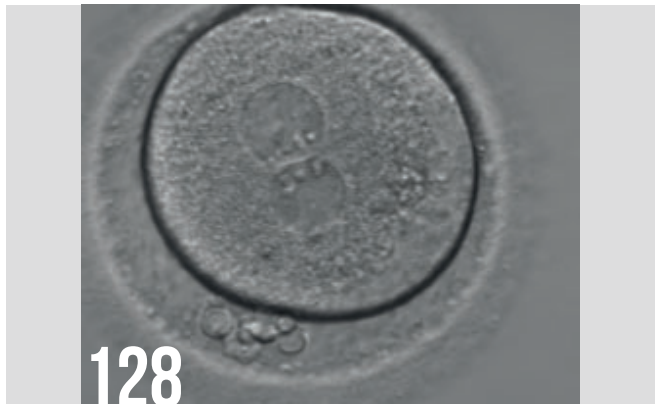
126. Зигота неправильної форми 16,5 годин після IVF, чітко візуалізуються два PN з NPВ вирівняними в обох пронуклеусах (400×збільшення). Полярні тільця утворюють правильний кут: одне розміщено рівно відносно повздовжньої вісі PN, інше відносно меридіальної вісі. Перенос здійснено, проте імплантація невдала.

С.3 Межі/поділ між PN

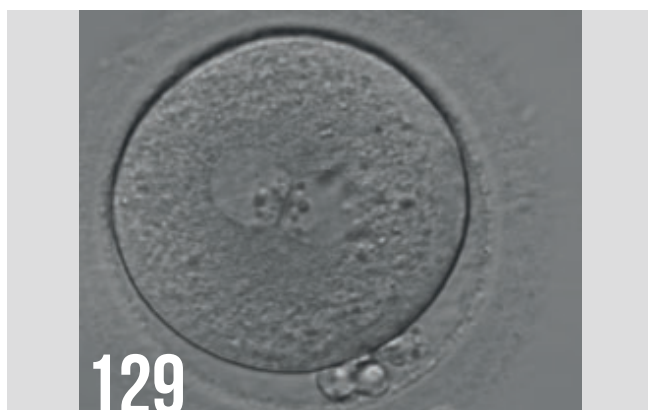
В яйцеклітинах людини астральна centrosома сперматозоїда утворює мікротрубочки, що контролюють межі та апозицію (положення) PN (мал. 127–131), та визначає формування полярних вісей при заплідненні шляхом окреслення лінії першого поділу. Подальші рухи та обертання сприяють розподілу мітохондрій та хроматину рівномірно, що необхідно для нормального розвитку.



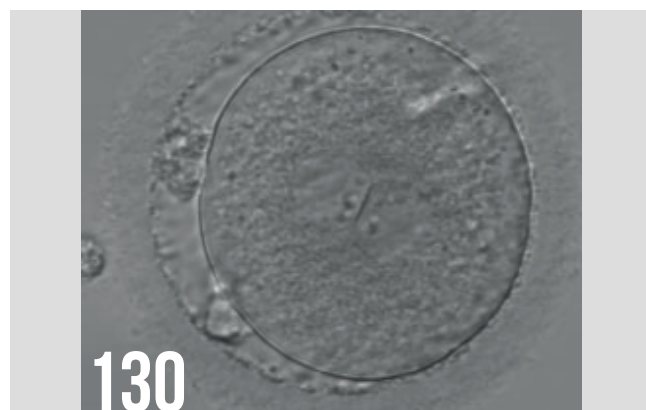
127. Зигота неправильної форми з двома PN, що розташовані близько один до одного та в центрі, з однаковою кількістю великих NPВ, вирівняних відносно з'єднання PN (200×збільшення). Фрагментовані полярні тільця розташовані паралельно відносно повздовжньої вісі PN ($\pm 30^\circ$). Візуалізується чітка кортикальна зона та груба зернистість цитоплазми. Цей ембріон та ще два інших перенесли на 3 добу розвитку, пацієнтка народила дві здорові дівчинки та одного здорового хлопчика.



128. Зигота з двома PN щільно розташованими відносно один одного в центрі цитоплазми, збільшений PVS та значна кількість залишків у PVS (400×збільшення). Ембріон перенесли, проте результат невідомий.



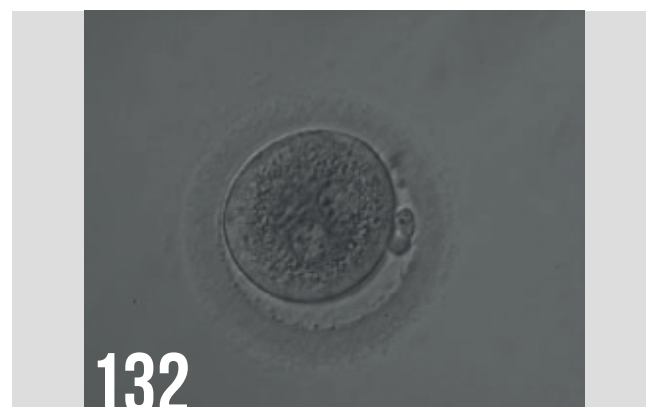
129. Зигота з двома PN щільно розташованими відносно один одного в центрі гранульованої цитоплазми з чіткою кортикальною зоною (400×збільшення). NPВ вирівняні в ряд, проте, різні за розміром. Ембріон перенесли, але імплантації не було.



130. Зигота з двома PN, що розташовані центрально та щільно зв'язані один з одним, цитоплазма дещо гранульована з чіткою кортикальною зоною (400×збільшення). Є залишки в PVS та фрагментація одного з полярних тілець (імовірно першого полярного тільця), яке значно відділене від іншого полярного тільця (імовірно друге полярне тільце). Перенос мав місце, але результат невідомий.

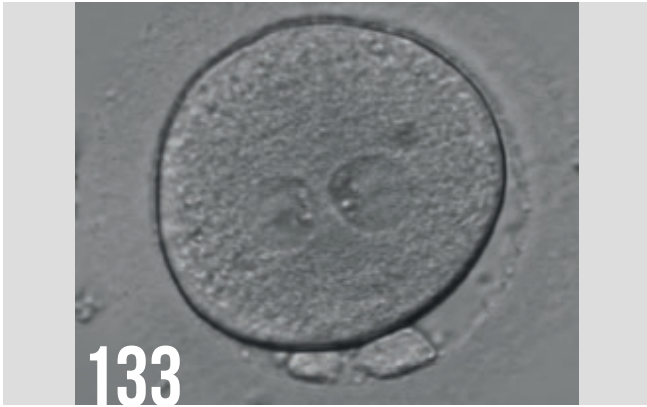


131. Зигота після IVF з товстою ZP (400×збільшення). PN розташовані близько один до одного в цитоплазмі з чіткою кортикальною зоною. NPВ маленькі та знаходяться на лінії з'єднання в одному PN та розкипані в іншому.

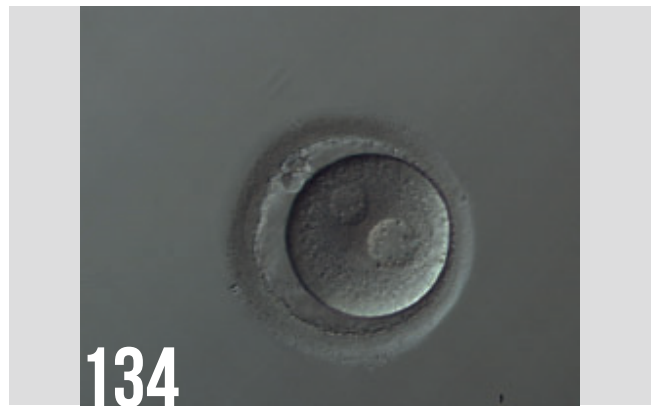


132. Зигота 18 годин після ICSI з двома PN, які розташовані на відстані один від одного (200×збільшення). NPВ різного розміру, паралельні в одному PN та розкидані в іншому. Цитоплазма дуже зерниста.

Недостатня прогресія щодо розташування та запліднення (мал. 132–134) в більшості залежить від активності centrosоми сперматозоїду. Згідно спостереження за зиготами з відокремленими PN при контролі запліднення та розвитку (мал. 135–136) має місце значна затримка або зупинка розвитку (мал. 136) в майже 80% випадків (Gianaroli et al., 2003). Таке явище часто пов'язують з патологією сперматозоїду, особливо це стосується зразків отриманих з придатків або з яєчка безпосередньо (мал. 133).



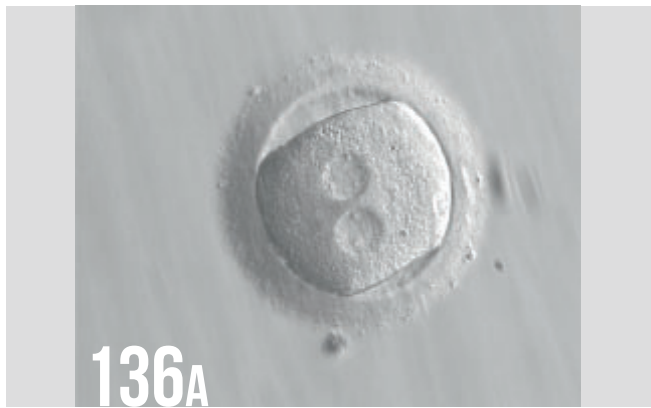
133. Зигота після ICSI, запліднена сперматозоїдом, отриманим з епідідімусу, контроль запліднення через 18 годин після інсемінації. PN знаходяться на відстані один від одного, різного розміру, NPB розподілені симетрично (400×збільшення). Перенос зробили, проте імплантація не відбулася.



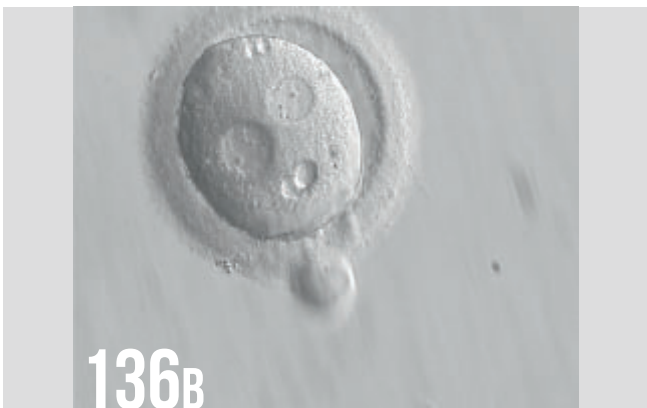
134. Зигота з PNs, що значно віддалені один від одного, різного розміру. Візуалізуються малі розкидані NPBs (150×збільшення). Цитоплазма дещо зерниста, PVS збільшений. Перенос ембріона зробили, проте, результат невідомий.



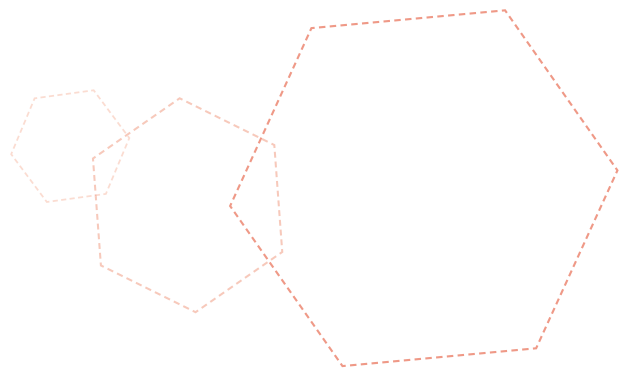
135. Зигота після застосування ICSI, контроль через 16, 17.5, 19 та 22 годин після інсемінації (200×збільшення). Два PN розташовані периферійно, на значній відстані один від одного, кількість NPB різна. Ембріон був утилізований.



136 (а). Зигота неправильної форми, після запліднення ICSI, контроль запліднення через 18 годин після інсемінації (400×збільшення). Мала місце біопсія полярного тільця. PNs розділені, з малими розкиданими NPBs.

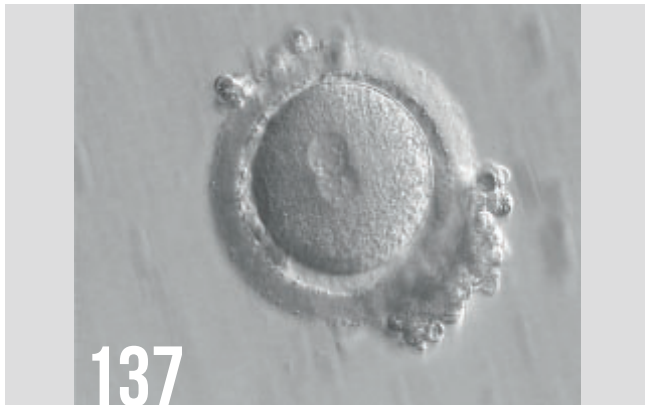


136 (b). Контроль запліднення через 20 годин після ICSI (400×збільшення). Колір цитоплазми нормальний, проте візуалізуються дві структури, подібні до вакуолей. Подальшого розвитку зиготи не було.



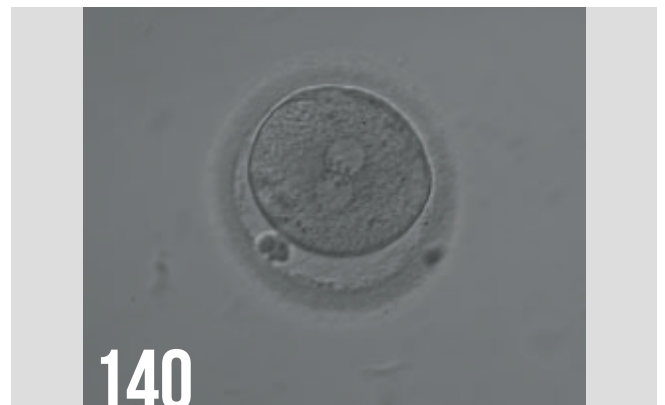
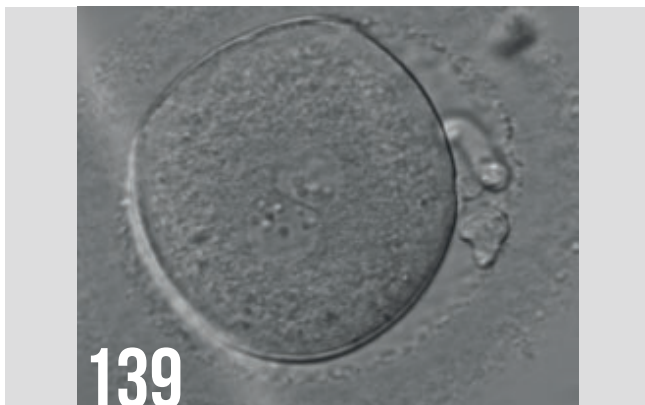
С.4 Центральне або периферійне розміщення PNs

Положення PN має відповідний вплив на площину першого поділу, яка, зазвичай, йде по пронуکلлярній осі (Scott, 2003). У більшості зигот з центрально розташованими PNs (мал. 137) перший поділ відбувається правильно, що призводить до нормального розвитку ембріонів. У зв'язку з динамікою рухів PNs всередині цитоплазми, їх орієнтація на полярній осі змінюється в залежності від прогресії обертання (мал. 138 і 139) в напрямку фінальної стадії, яка визначає площину першого поділу (мал. 140).



137. Зигота з PNs, розташованими в центрі, PNs дещо перекриваються один одним (400×збільшення). Повздовжня вісь PN паралельна полярним тільцям. NPBs розкидані в обох PNs на лінії з'єднання PN, проте, кількість їх різна. Ембріон перенесли, вагітність отримали.

138. Зигота з двома PN, розташованими по центру, де NPB розподілені симетрично та вирівняні відносно з'єднання PN (400×збільшення). В цитоплазмі є чітка кортикальна зона, ореол (halo), PVS дещо збільшений. Ембріон перенесли, результат невідомий.



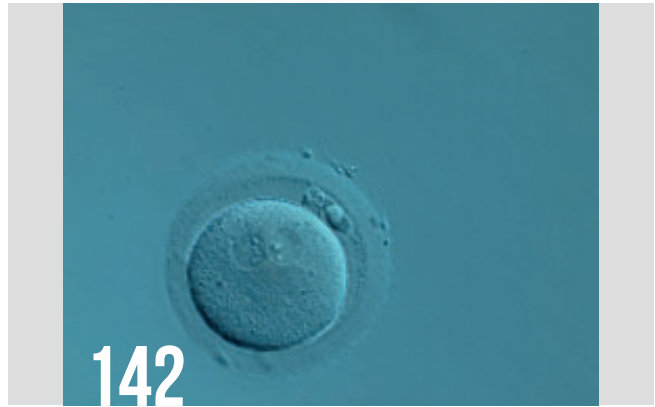
139. Зигота після ICSI, контроль через 18 годин після інсемінації, є PNs, розміщені в центрі, в яких NPBs різняться за розміром та кількістю (400×збільшення). Повздовжня вісь PN спрямована майже по дотичній у напрямку площини крізь полярні тільця. NPBs розподілені не симетрично, в одному PN вони в одній лінії, в другому — розкидані. ZP товста та щіткоподібна. Ембріон перенесли, але імплантації не відбулось.

140. Зигота з однаковою кількістю великих NPBs, що розташовані на лінії з'єднання PNs (200×збільшення). PNs розташовані в центрі та щільно прилягають один до одного; полярні тіла вирівняні по дотичній до поздовжньої осі, що проходить через PNs.

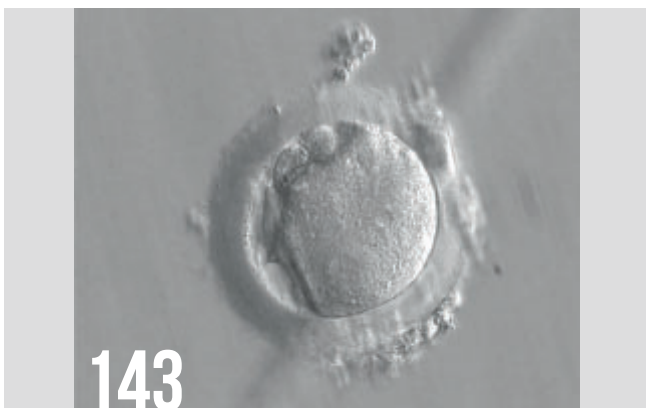
У випадках периферичного розташування PNs (мал. 141 та 142), поділ відбувається відповідно до пронуклеарної осі і часто призводить до аномальної морфології (мал. 143) чи поділу (мал. 144), або затримки розвитку (мал. 145). Проте імплантація може відбутися (мал. 146).



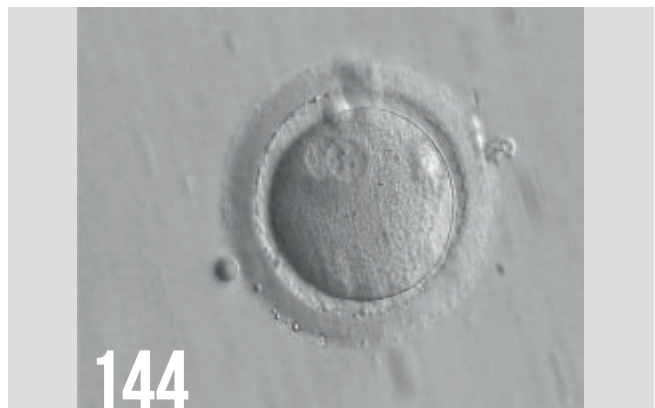
141. Зигота після застосування ICSI з двома PNs, що щільно прилягають один до одного, розташованими периферійно в цитоплазмі. Має місце зернистість в центрі через скупчення органел (400×збільшення). NPVs різняться за кількістю та розташуванням. Одне полярне тільце (ймовірно перше) фрагментоване, інше — ціле. Перенос відбувся, результат невідомий.



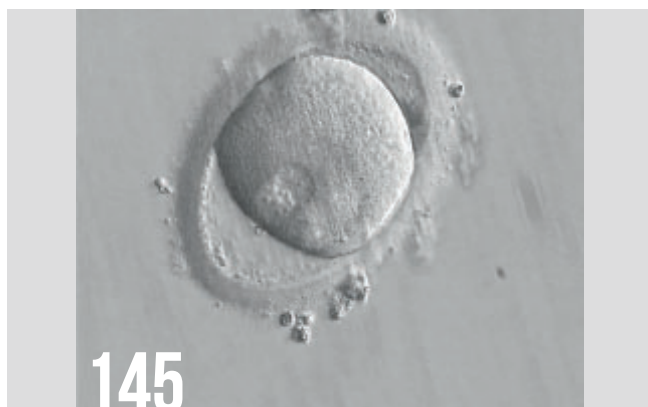
142. Зигота після IVF з PN нормального розміру, розташування дещо віддалене від центру цитоплазми (400×збільшення). Кількість NPV відрізняється. Результат переносу невідомий.



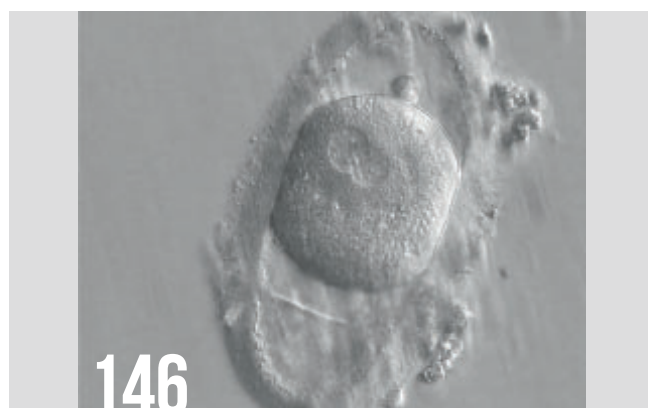
143. Деформована зигота, контроль запліднення через 16 годин після IVF. PNs розташовані в цитоплазмі периферійно (на 6–7 годину), паралельно площині з двома великими полярними тільцями (400×збільшення).



144. Зигота через 16 годин після IVF з PNs, що частково перетинаються, розташовані віддалено (400×збільшення). NPVs маленького розміру, розкидані в обох PN. Отриманий ембріон був дуже фрагментований з нерівними бластомерами, його утилізували.



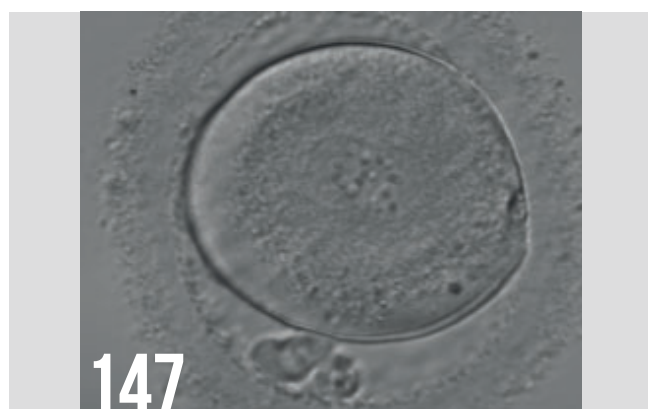
145. Зигота через 16 годин після ICSI з PNs, розташованими по периферії (400×збільшення). Великий PVS розміщений в середині деформованої ZP овальної форми. У яйцеклітини чітка кортикальна зона цитоплазми. Переносу не було внаслідок затримки розвитку.



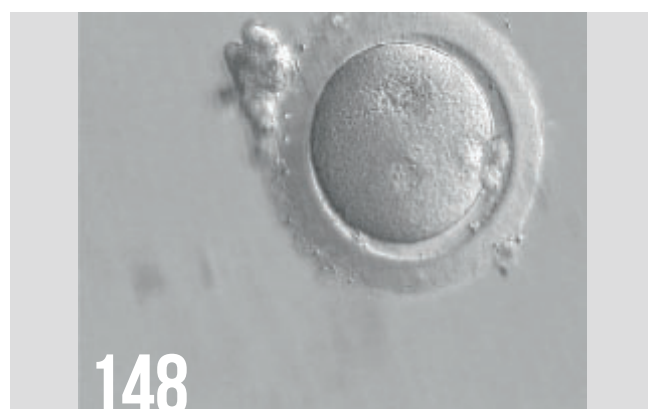
146. Зигота після ICSI з ZP овальної форми, відмічається подвоєння та розрив шарів (400×збільшення). Запліднений ооцит сферичної форми з двома PN, розташованими периферійно та які дещо перекриваються. NPVs малі та розкидані в обох PN. Ембріон перенесено, імплантація відбулась.

С.5 Розщеплення мембрани пронуклеуса/злиття

Після введення сперми, обидва PNs мігрують в напрямку один одного під час реплікації власної ДНК. При зіткненні ядерні мембрани тріскають за кілька годин до початку стадії першого дроблення (мал. 147 та 148). Відбувається запліднення (мал. 149) та злиття двох пар гаплоїдних геномів.



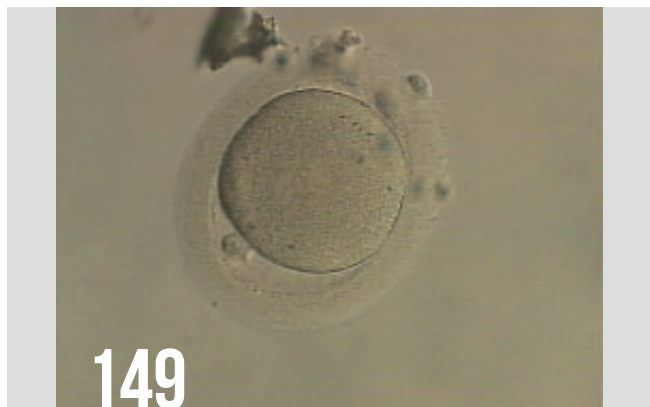
147. Зигота перед початком злиття, 18 годин після ICSI. (400×збільшення). Мембрани PN стають розпливчатиими, з великими за розміром NPV. ZP «щіткоподібна», в периферії цитоплазми є чітка кортикальна зона. В подальшому мало місце дроблення до 4 клітин та зупинкою поділу на 3 день розвитку ембріона.



148. Зигота перед злиттям, розрив мембрани особливо видно в верхньому PN (400×збільшення). Контроль запліднення проводили через 15 годин після ICSI. Один із PN та його NPV виражені дуже слабо. Ембріон перенесли, проте, результат був негативний.

Астральна centrosома, що містить дві центріолі, розпадається та переміщується на протилежні полюси біполярного веретена для початку біполяризації, що контролює поділ клітин. Центріолі займають ключову позицію на полюсах веретена, в той час як хромосоми формують екватор метафазної пластинки. Анафаза і телофаза буде завершенням першого мітотичного поділу.

На відміну від деяких видів тварин, злиття мембран PN (рис. 150) не є звичайним процесом в людських зиготах (мал. 150).



149. Зигота, запліднена методом ICSI, перед початком злиття, видно розрив пронуклеарної мембрани (200×збільшення). NPВ вже не видно. Перенос зробили, результат невідомий.

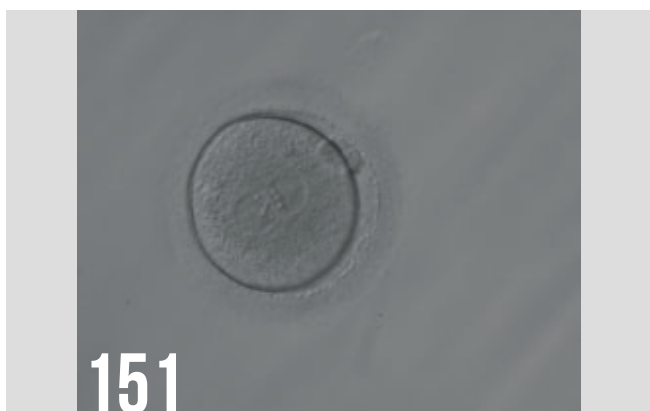


150. Зигота з PN перед злиттям (400×збільшення). Контроль був зроблений через 16 годин після ICSI. Мембрани PN чітко не виражені, особливо між PN, де вони зруйновані, тому виглядають як злиття мембран PN. NPВ великого розміру помітні у PN. Попередньо зробили біопсію полярних тілець. Перенос зробили, проте, вагітності не отримали.

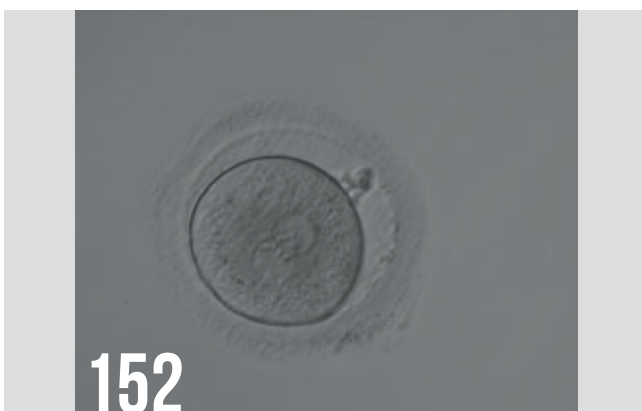
D. NPВ — ЯДЕРЦЯ (ТАК ЗВАНІ «ПРОНУКЛЕОЛІ» АБО «ПРОЯДЕРЦЯ»)

D.1 NPВ: вирівняні/розкидані/система диференціації між PN

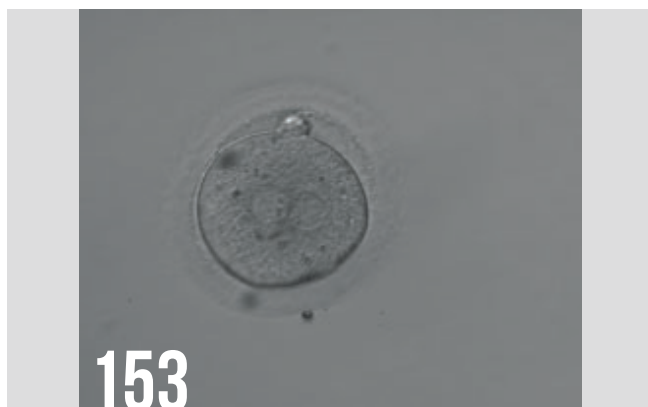
Так як PN формуються після запліднення, відбувається поляризований розподіл хроматину в борозну між ними (Van Blerkom et al., 1997). NPВ прикріплені до хроматину, тому можна припустити, що вони також мають поляризуватись або вирівнятись за умови наявності правильної поляризації хроматину, NB також виявляться поляризованими (мал. 151–154). Завдяки динаміці цього процесу в деяких зиготах відмічається симетрія щодо прояву PN, але затримка в попаданні хроматину в борозну або в мітотичну площину (мал. 155–157). Може мати місце прогресія NPВ та PN навіть в дуже дисморфних зиготах (мал. 158).



151. Зигота через 18 годин після ICSI з однаковою кількістю NPВ, вирівняних відносно з'єднання PN (200×збільшення). Результат переносу не відомий.



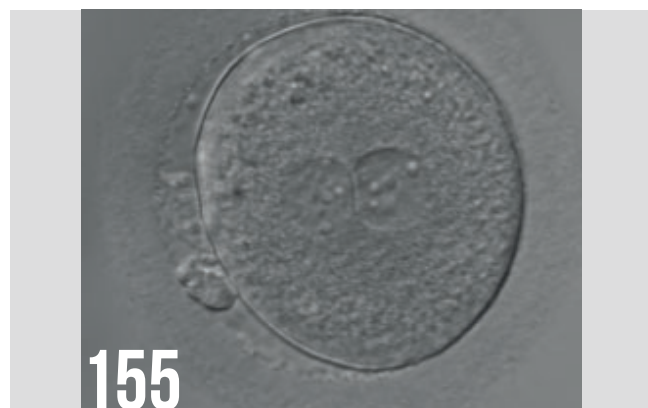
151. Зигота через 18 годин після ICSI з однаковою кількістю NPВ, вирівняних на з'єднання PN (200×збільшення). Візуалізується великий PVS та ZP неправильної форми. Полярні тілця деформовані та накладаються одне на одне. Результат переносу невідомий.



153. Зигота через 18 годин після ICSI з NPB, вирівняними на з'єднання PN (200×збільшення). NPB відрізняються за кількістю та розміром між PN. Полярні тільця перекривають одне одного. Ембріон утилізували у зв'язку з подальшим аномальним дробленням.



154. Зигота після ICSI, з двома PN, що мають гарну лінію з'єднання, в кожному з яких вирівняні NPB однакового розміру та кількості (400×збільшення). Результат переносу невідомий.



155. Зигота після ICSI з великими NPB, розкиданими відносно з'єднання PN (400×збільшення). Цитоплазма зерниста. Після переносу імплантація не відбулась.



156. Зигота після ICSI з NPB, розкиданими відносно межі з'єднання PN (400×збільшення). Полярні тільця фрагментовані; в PVS присутній дебрис. Результат переносу невідомий.



157. Зигота після ICSI з частковим перекриттям PN. NPB розкидані в обох PN (400×збільшення). Результат переносу невідомий.



158. Зигота через 16,5 годин після IVF (400×збільшення). Наявні малі NPB, розкидані відносно з'єднання PN, в PVS є багато клітинного дебрису. Ембріон утилізований.

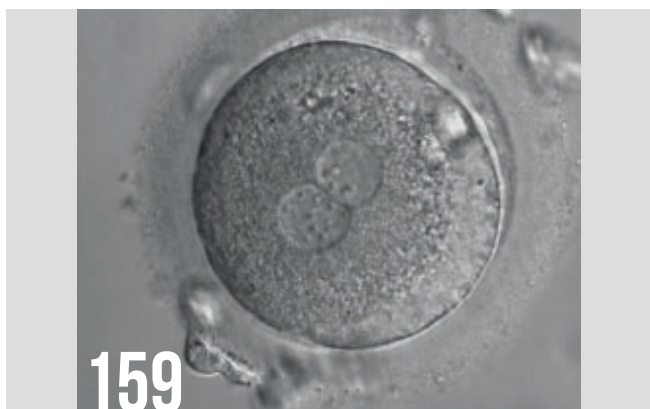
Під час прогресії клітинного циклу NPB змінюють кількість, розмір і позицію (мал. 101) та, врешті, зникають саме перед злиттям та початком першого дроблення (мал. 149). Останні дослідження за допомогою покадрової зйомки показали, що NPB дуже рухомі, характеристики NPB можуть змінюватись протягом короткого відрізка часу (Montag et al., 2011).

Потенційні можливості використання оцінки розташування, розміру, кількості та симетрії NPB в обох PN спочатку було досліджене як складова частина оцінки PN в пізні 90-ті (Scott and Smith, 1998).

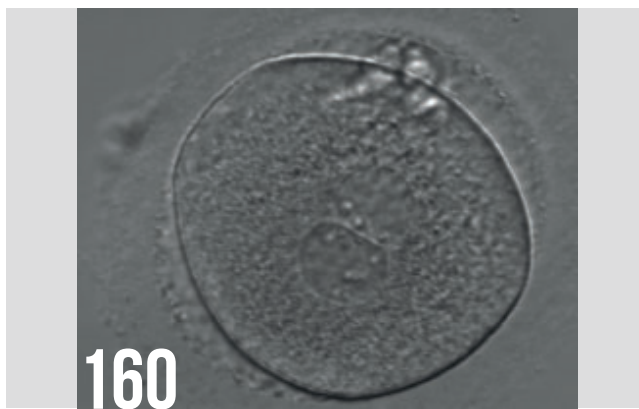
Деякі автори відмічають переваги оцінки PN, особливо розподілу NPB, для результативності лікування допоміжними репродуктивними технологіями (Tesarik and Greco, 1999; Scott et al., 2000; Balaban et al., 2001; Montag and van der Ven, 2001; Ebner et al., 2003; Senn et al., 2006). Інші не бачать жодних переваг (Payne et al., 2005; James et al., 2006; Nicoli et al., 2007; Brezinova et al., 2009).

На морфологію NPB впливають вік пацієнтів, також існує короткотривала різниця між морфологією зигот після IVF та ICSI. Таким чином, порівняльна оцінка PN/NPB повинна стати важливою умовою для формування чітких настанов з врахуванням часу, характеристики пацієнта і застосованих технік інсемінації.

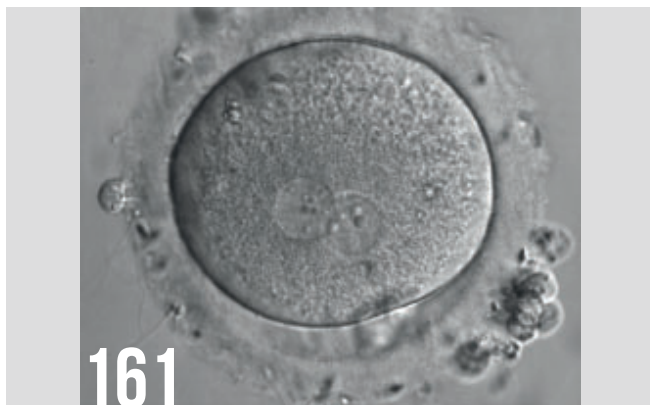
Багато клітинних циклів контролюються білками, що розташовані в ядрі, і можуть демонструвати в мітотичних клітинах, що асиметрія в кількості і формах NPB пов'язані з аномальним клітинним циклом та, в подальшому, з аномальним розвитком (Pedersen, 1998). Цілком імовірно, що асиметрія між PNs в зиготах (мал. 159–162) може призвести до аномального розвитку, збільшення фрагментації і неправильного дроблення, зниження життєздатності (Scott, 2003). Проте, імплантація певною мірою можлива (мал. 163 і 164).



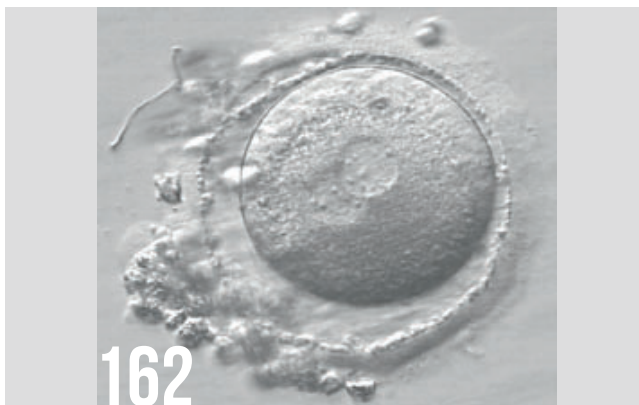
159. Зигота з нерівномірним розподілом NPB та їх кількістю. Ембріон був кріоконсервований.



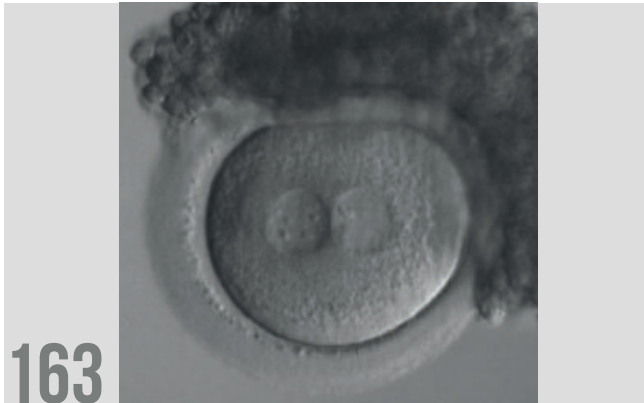
160. Зигота після запліднення методом ICSI з нерівномірним розподілом NPB та їх кількістю (400×збільшення). NPB вирівняні в одному PN та розкидані в іншому. Ембріон був утилізований внаслідок його поганого розвитку.



161. Зигота після IVF з різною кількістю та розташуванням NPBs (600×збільшення). Ембріон утилізували.



162. Зигота через 16 годин після ICSI з NPB малого розміру, розкиданими відносно з'єднання PN в обох PN (400×збільшення). ZP дуже тонка. Перенос був, але вагітності не отримали.



163. Зигота після ICSI з нерівномірно розподіленими NPВ (200×збільшення). До ZP щільно прилягає багато клітин гранульози. Ембріон перенесли і отримали вагітність.



164. Зигота через 15 годин після IVF, NPВ розкидані в одному PN та вирівняні в іншому (400×збільшення). ZP товста, PVS збільшена. Одне з двох полярних тілець фрагментоване. Перенос здійснено, результат негативний.

Робоча група (Alpha Scientists in Reproductive medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) розробила дещо змінену шкалу оцінки PN, взявши за основу оцінку пронуклеуса, розроблену вченим Скоттом (2003) (Z-шкала, яка поєднує оцінювання розміщення PN та характеристики NPВ), модифікували в три категорії:

- симетричні PN (що відповідає Z1 та Z2 шкали Скотта)
- несиметричні PN (інше розташування, периферійні PN)
- аномальні PN (PN без жодного або з одним NPВ, які називають відповідно PN «привиди» та PN «бичаче око». Обидва пов'язані з аномальним результатом в тваринних моделях.

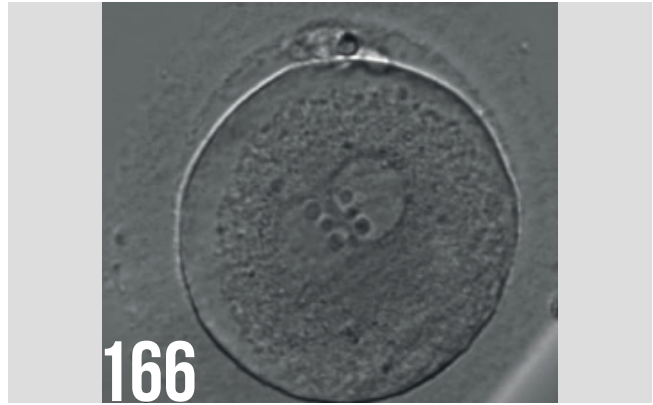
D.2 PNs — однакова кількість/різна кількість

Клітини людини зазвичай мають від двох до семи нуклеолей на одне ядро з однаковою кількістю в двох дочірніх клітинах після мітотичного поділу. Нуклеолі з'являються та зникають в залежності від стадії клітинного циклу: їх набагато більше на стадії G1, потім вони розщеплюються, та на стадії S1 є вже одна або дві великі нуклеолі на ядро. Коли виникає асинхронність, то це результат неправильної (аберантної) хромосомної функції.

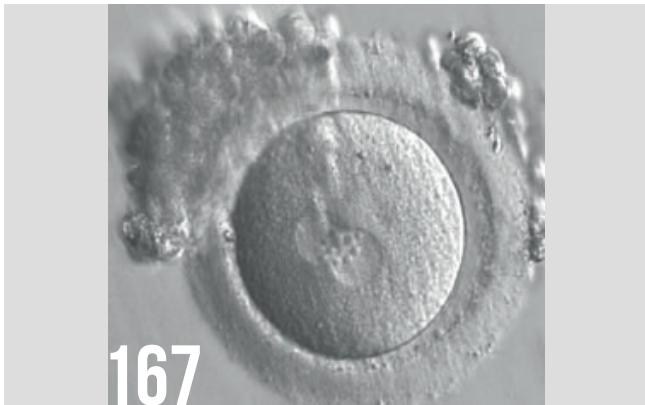
Переносячи дану модель на зиготу, ідеальні ооцити — це ооцити з симетричними за кількістю та розміром NPВ, що вирівняні в проміжку між двома PN (мал. 165–167). Однакова кількість NPВ, які не вирівняні в обох PN, також є показником синхронного розвитку (мал. 168). На противагу, будь яка нерівність у розмірі NPВ, їх кількості та розташуванні є поганим прогнозом для лікування (мал. 169–172).



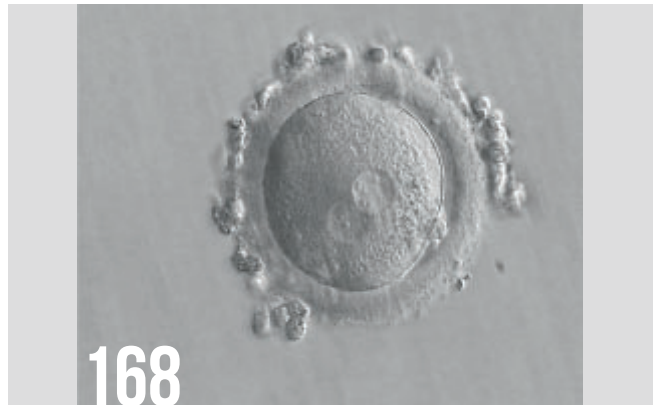
165. Зигота після ICSI з однаковою кількістю великих NPB, що вирівняні відносно з'єднання PN (200×збільшення). Перенос зробили, його результат невідомий.



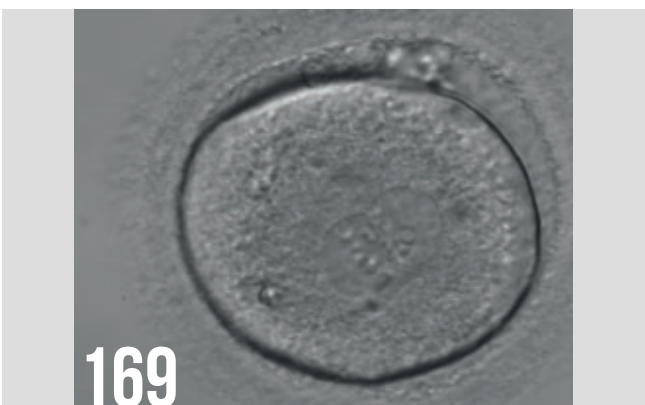
166. Зигота після ICSI з однаковою кількістю великих NPB, вирівняних відносно з'єднання PN (400×збільшення). Візуалізується ореол в кортикальній зоні; полярні тільця фрагментовані, ZP «щіткоподібна». Ембріон утилізували внаслідок аномального розвитку.



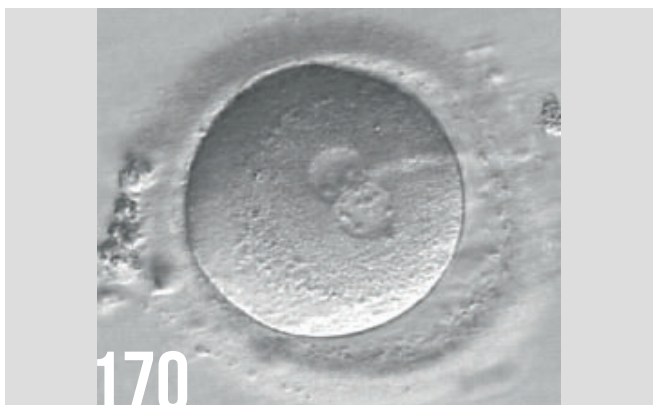
167. Зигота через 17 годин після IVF (400×збільшення). PN мають однакову кількість великих NPB, розташованих на лінії з'єднання. PVS дещо збільшений, ZP нормальної форми, оточена клітинами гранульози. Результат переносу негативний.



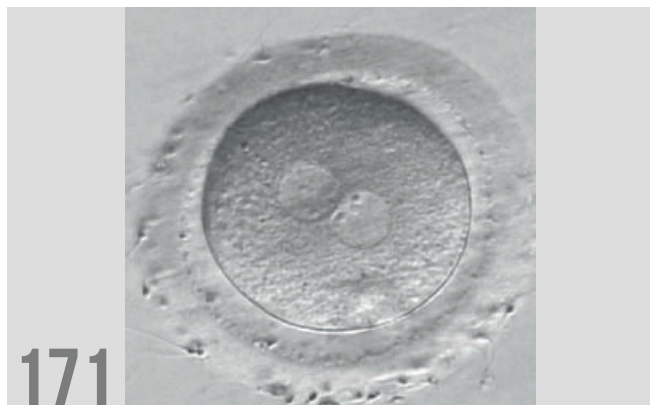
168. Зигота після IVF та використання розморожених сперматозоїдів з еякуляту для запліднення, через 15 годин після інсемінації (400×збільшення). Два PN приблизно однакового розміру чітко візуалізуються в цитоплазмі. Відмічається периферійна грануляція цитоплазми. NPB розкидані в обох PN. Обидва полярних тільця розташовані на 4 годину. Після переносу отримали позитивний результат.



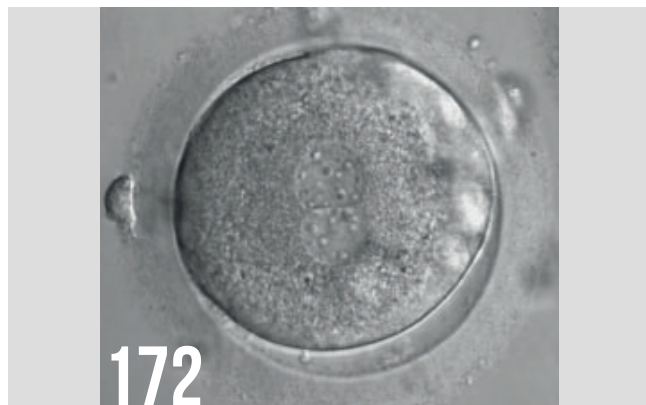
169. Зигота після ICSI з різною кількістю NPB (400×збільшення). Цитоплазма гранульована. Результат тесту після переносу був негативний.



170. Зигота через 16,5 годин після ICSI з нерівною кількістю та розміром NPB: середнього розміру розкидані в одному PN, більшого розміру вирівняні в іншому: (400×збільшення). Була проведена біопсія полярних тільць, в ZP механічно сформувалася тріщина, розташована на 3 годину. Ембріон було кріоконсервовано.



171. Зигота через 16 годин після IVF з різною кількістю та розміром NPВ: маленькі розкидані в одному PN, великі вирівняні в іншому (400×збільшення). Зиготу утилізували внаслідок зупинки розвитку.



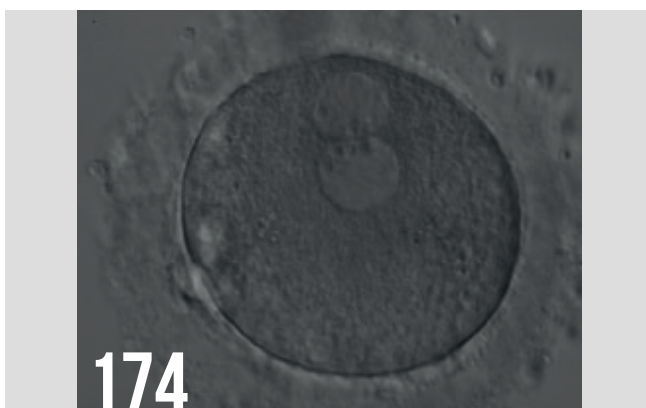
172. Зигота після ICSI з різною кількістю та розміром NPВ (600×збільшення). Ембріон утилізували внаслідок аномального розвитку.

D.3 NPВ однакового розміру/NPВ різного розміру

Динаміку формування нуклеолей пов'язують з тим, що наслідком злиття NPВ є зміна розміру NPВ в залежності від часу (Scott, 2003). Прогресивне збільшення розміру NPВ та відповідне зменшення їх кількості відбувається при розстановці нуклеолей у проміжок між PN (мал. 173–176).



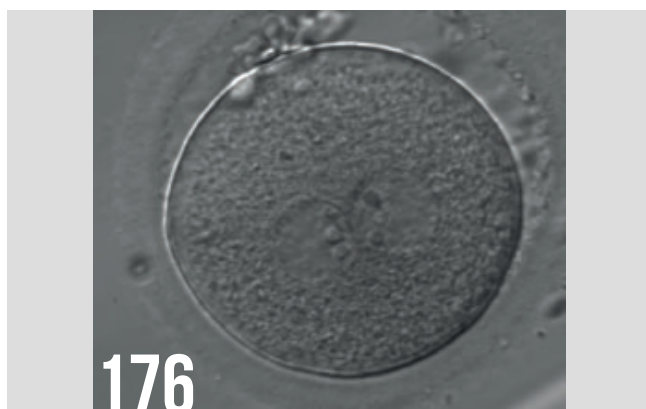
173. Зигота після ICSI з однаковою кількістю та розміром NPВ, які вирівняні на з'єднанні PN (200×збільшення). PN розташовані по дотичній лінії відносно полярних тілець. Перенос мав місце, отримано одну плідну вагітність та пологи.



174. Зигота після ICSI з периферійно розташованими PN та NPВ подібного розміру та кількості (200×збільшення). Подальший розвиток — нерівномірний поділ та зупинка на 3 день.



175. Зигота через 18 годин після ICSI. NPВ однакового розміру і вирівняні в обох PN (200×збільшення). Полярні тільця не ушкоджені, дещо збільшені. Цитоплазма гранульована з деяким включеннями. Ембріон утилізували внаслідок аномального розвитку.

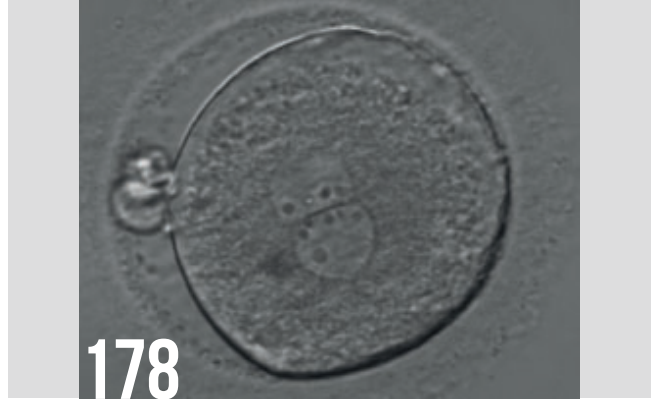


176. Зигота після ICSI з однаковою кількістю та розміром NPВ, які вирівняні відносно з'єднання PN (200×збільшення). Полярні тільця трохи фрагментовані. Результат переносу невідомий.

Наявність розкиданих NPB та NPB неоднакових розмірів (мал. 177–179) може свідчити про функціональні дефекти внаслідок зниження або неефективного синтезу rRNA. Ступінь затримки залежить від ступеню асинхронності та від кількості пошкоджених ядер, проте клінічна практика свідчить, що й в такому випадку імплантація можлива (мал. 180).



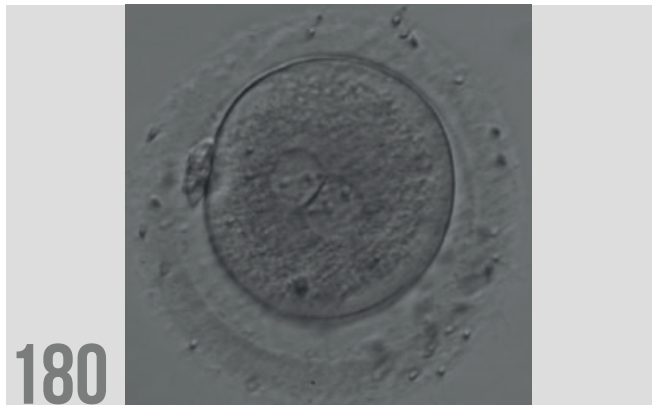
177. Зигота після ICSI з різною кількістю неоднакових за розміром NPB між PN (400×збільшення). Результат переносу невідомий.



178. Зигота після ICSI з різною кількістю NPB (400×збільшення). NPB в кожному PN різняться за розміром. Результат переносу невідомий.



179. Зигота після ICSI з різною кількістю та розміром NPB (400×збільшення). NPB в основному вирівняні відносно з'єднання PN. Результат переносу невідомий.



180. Зигота після IVF з великими NPB, розкиданим відносно з'єднання PN (200×збільшення). NPB в кожному PN відрізняються за розміром та більші в PN справа. Перенос зробили, отримали одноплідну вагітність та пологи.

D.4 PN «привиди» (відсутність NPB)/одиничні NPB в одному або більше PN)

Незважаючи на складність проведення порівняльного аналізу щодо відповідності оцінювання PN, низка процесів запліднення підтверджує важливість та значимість NPB та нуклеолей в оцінці життєздатності ембріону. В світлі цих думок, не дивно, що відсутність нуклеолей в PN під час перевірки запліднення, так званий PN «привид», (мал. 181–184), або наявність одиничного NPB, явище відоме як «бичаче око» PN, (мал. 185–189) пов'язують з епігенетичними дефектами та аномалією розвитку у тварин (Svarcova et al., 2009).



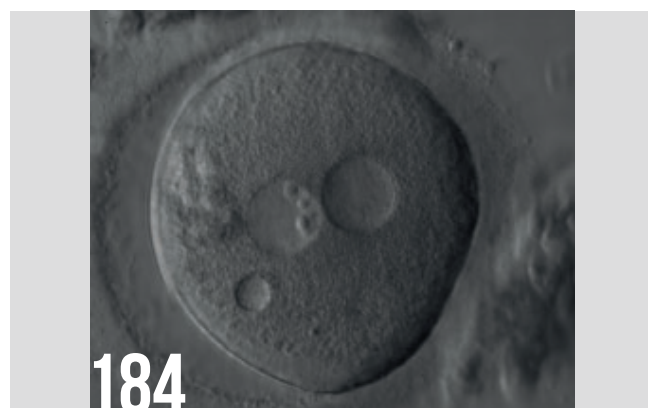
181. Одна з трьох зигот-сіблінгів (мал. 182 і 183) після ICSI з використанням розморожених сперматозоїдів з придатку яєчка через 18 годин після інсемінації. Три зиготи мають два виразних PN з чітко вираженими мембранами та без жодного NPB. Всі три перенесли, народились два живонароджені хлопчики.



182. Друга з трьох зигот-сіблінгів (мал. 181 та 183) після ICSI з використанням розморожених сперматозоїдів з придатку яєчка. Всі три зиготи містять включення в цитоплазмі.



183. Третя з трьох зигот-сіблінгів (мал. 181 та 182) після ICSI з використанням розморожених сперматозоїдів з придатку яєчка. Відмічена відсутність NPB та наявність включень у цитоплазмі, у зиготи великий перивітеліновий простір.



184. Зигота після ICSI зі схожими на два чітких PN утвореннями з чітким мембранами, NPB відсутні в одному PN (400×збільшення). Візуалізується одна маленька вакуоля під лівим PN. На 9 годину є два дуже фрагментовані полярні тільця. Не дивлячись на те, що після ICSI візуалізувались два полярних тільця, можливо, що це зигота 1PN, а структура справа це вакуоля (порівняно з мал. 209). Перенос зробили.



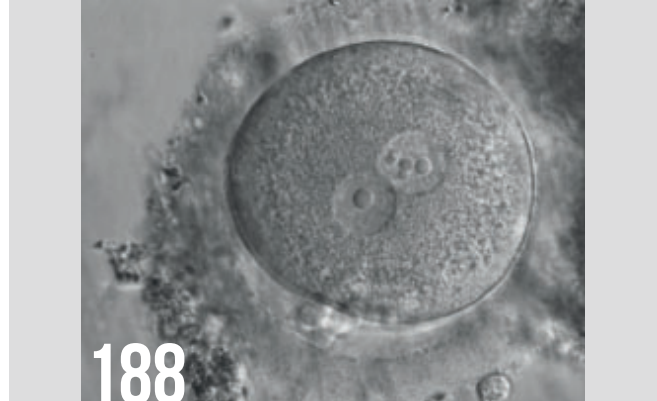
185. Зигота після ICSI з двома PN «бичаче око», кожен з одиничним NPB (200×збільшення). PN дещо відокремлені, лінія з'єднання ще не сформована. В цитоплазмі є кортикальна зона. Ембріон утилізували.



186. Зигота після ICSI овальної форми з одиничним NPB в одному з PN (явище «бичачого ока») та малими, розкиданими NPB в іншому (200×збільшення). PVS достатньо великий, полярні тільця дуже фрагментовані. Ембріон утилізовано.



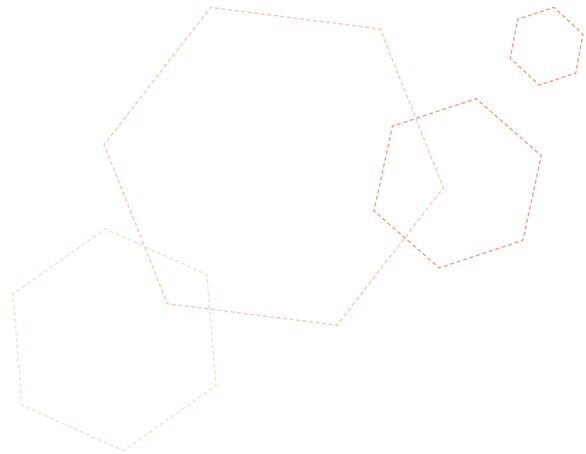
187. Зигота після ICSI з одним NPB («бичаче око») в одному PN та маленькі, різного розміру NPB в іншому PN (400×збільшення). Результат переносу невідомий.



188. Зигота після ICSI з двома PN, розташованими в центрі: в одному PN є одиничний великий NPB («бичаче око»), NPB в іншому PN меншого розміру. Ембріон утилізовано.



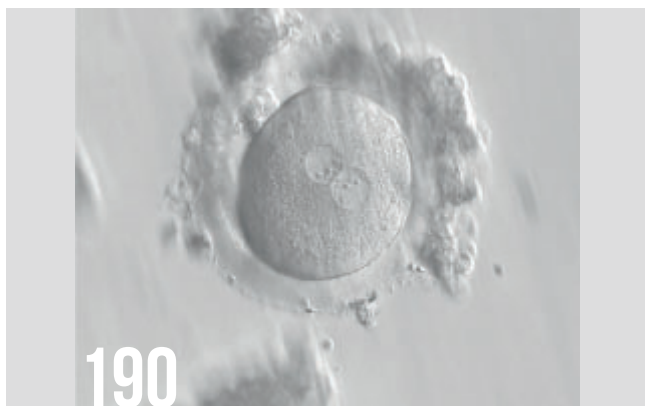
189. Зигота після ICSI з одним PN «бичаче око» (400×збільшення). NPB в кожному з PN вирівняні відносно з'єднання. Перенос зроблено, проте результат невідомий.



Е. ОЦІНКА МОРФОЛОГІЇ ЦИТОПЛАЗМИ

Е.1 Нормальна/гранульована

Однорідна цитоплазма важлива для зигот так само, як і для яйцеклітин. (мал. 190 та 191), проте невідомий вплив неоднорідної цитоплазми на розвиток. Таким чином, не дивлячись на те, що деякі вчені наголошують на те, що значні аномалії цитоплазми зиготи мають негативний вплив на розвиток та імплантаційний потенціал ембріону (Kahraman et al., 2000; Ebner et al., 2003; Balaban and Urman, 2006), немає достатньо вагомих доказів цих припущень. Не доведено, що прозорість периферійної цитоплазми заплідненого ооцита (відомого як «ореол» мал. 192), незначні дисморфізми, такі як залишки в PVS (мал. 193), наявність в цитоплазмі тілець, що переломлюються (мал. 194), не мають доведеного прогностичного значення для імплантації. Однак, варто ці явища фіксувати для збору даних, що можуть пролити світло на певний зв'язок з розвитком або потенціалом до імплантації.



190. Зигота після IVF з використанням розморожених сперматозоїдів, через 16 годин після інсемінації з нормальною морфологією цитоплазми (400×збільшення). NPВ помітно відрізняються в обох PN. Перенос відбувся, проте результат тесту був негативний.



191. Зигота після ICSI, пізніше буде проведена біопсія полярного тільця, з нормальною морфологією цитоплазми (400×збільшення). Її було утилізовано внаслідок анеуплоїдії.



192. Зигота після IVF з використанням розмороженої сперми, через 16 годин після інсемінації, з нормальною морфологією цитоплазми, з наявною кортикальною зоною, ореолом у цитоплазмі (halo) (400×збільшення). NPВ розкидані, вони різного розміру. Полярні тільця фрагментовані. Ембріон був криоконсервований.

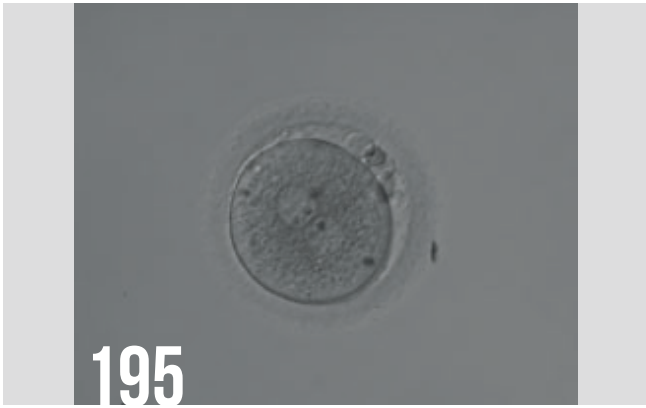


193. Зигота після ICSI з нормальною морфологією цитоплазми, ZP тонка, PVS збільшений з невеличкими включеннями (400×збільшення). Результат переносу невідомий.

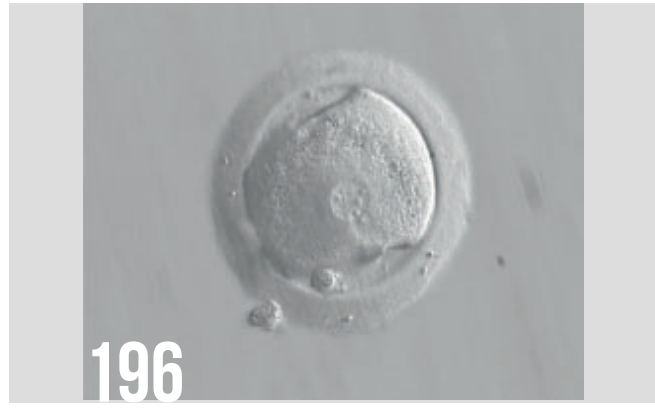


194. Зигота після ICSI з нормальною морфологією цитоплазми, на 3 годину візуалізується тільце, що переломлюється у світлі (400×збільшення). Результат переносу невідомий.

Нормальна цитоплазма чітко відрізняється від гранульованої цитоплазми, проте, для порівняльного аналізу необхідно приділити увагу системі оптики та культуральному середовищу, що застосовується. Ступінь грануляції оцінюють в залежності від діаметру та глибини зони грануляції, що може покривати всю зиготу (мал. 195), незначну (мал. 196–198) або велику частину цитоплазми (мал. 199–200).



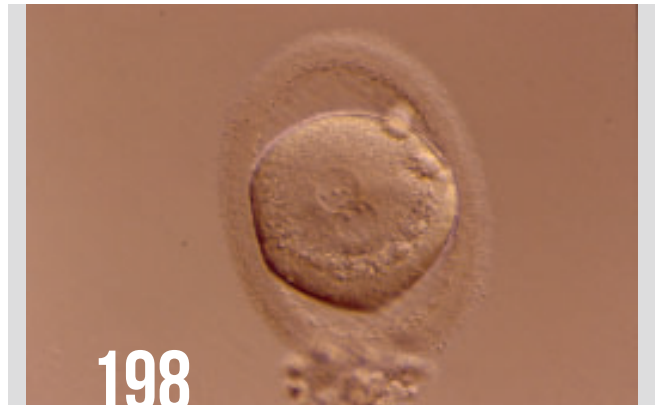
195. Зигота після ICSI з неоднорідною гранульованою цитоплазмою (200×збільшення). NPВ великого розміру, полярні тільця фрагментовані. Ембріон утилізовано внаслідок поганого розвитку.



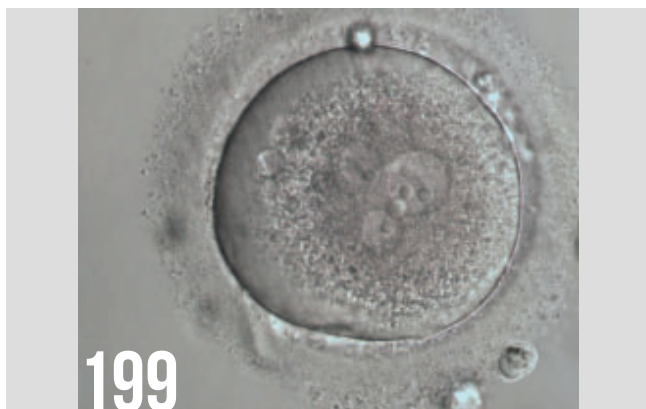
196. Зигота після IVF з використанням розмороженої сперми, через 17 годин після інсемінації, з оолею неправильної форми, дисморфною гранульованою цитоплазмою (400×збільшення). PN різні за розміром, розміщені віддалено. NPВ відрізняються за розміром та кількістю. Перенос зробили, однак, результат був негативний.



197. Зигота після ICSI з віддаленими PN (150×збільшення). Оолема неправильної форми, цитоплазма має неоднорідну зернисту структуру. ZP щільна та темна. Ембріон утилізовано.



198. Зигота після ICSI з гранульованою цитоплазмою, особливо в ділянці, близької до чіткої кортикальної зони (400×збільшення). PVS збільшений, ZP овальної форми. NPВ з відрізняються за розміром та кількістю. Результат переносу невідомий.



199. Зигота після ICSI з 4 PN (можливо це викликано фрагментацією початкового PN нормального розміру), цитоплазма дуже зерниста, кортикальна зона чітка (600×збільшення). Зиготу утилізовано.

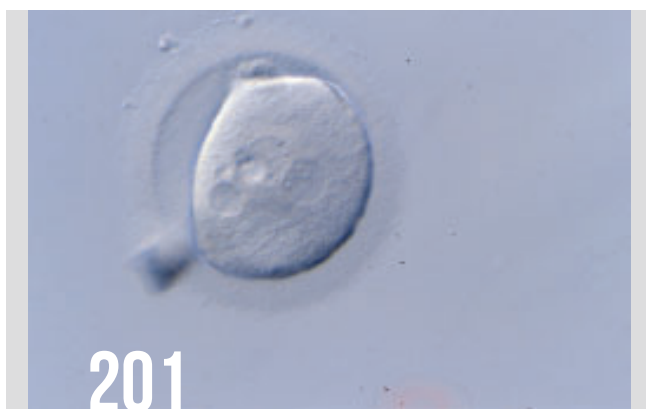


200. Зигота після ICSI з використанням розмороженої сперми (200×збільшення). PN розташовані периферійно, помітно велике включення нижче PN, яке має вигляд кратеру, як наслідок значного скупчення органел. Зиготу утилізовано.

Автори повідомляють про те, що половина яйцеклітин з дисморфними фенотипічними характеристиками, такими як скупчення органел, є анеуплоїдними, гіпогаплоїдність - переважаюча аномалія. (Van Blerkom and Henry, 1992). Таку значну перебудову цитоплазми пов'язують з низьким рівнем інтрацитоплазматичного рН та зниженим вмістом АТФ (Van Blerkom et al., 1997). Такі дисморфні зміни будуть успадковуватись зиготою. Очевидно, що скупчення інтрацитоплазматичних органел (мал. 200) є різновидом важного ступеню аномалії, що може повторюватись в наступних циклах та є поганою ознакою для настання вагітності та частоти імплантації, але на якість дроблення ембріону впливу немає (Meriano et al., 2001).

Е.2 Малі вакуолі/великі вакуолі

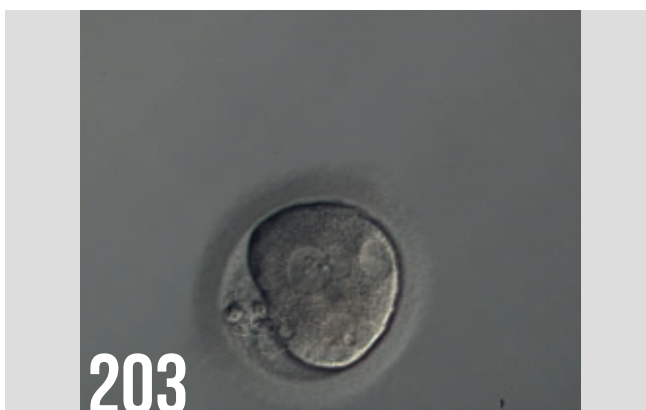
Наявність декількох малих вакуолей (діаметром 5–10 μm), що наповнені рідиною та прозорі (мал. 201 та 202), не свідчить про очевидні біологічні наслідки, проте варто приділити увагу зиготам з декількома великими, або багатьма малими вакуолями (мал. 203 та 204) або з іншими морфологічними аномаліями (мал. 205).



201. Зигота після ICSI неправильної форми, PN розташовані в центрі, на 8 годину в цитоплазмі розташована вакуоля середнього розміру (400×збільшення). Результат переносу невідомий.



202. Зигота після ICSI, PN розташовані по центру та різні за розміром, в цитоплазмі є дві маленькі вакуолі на 9 годину (400×збільшення). Результат переносу невідомий.

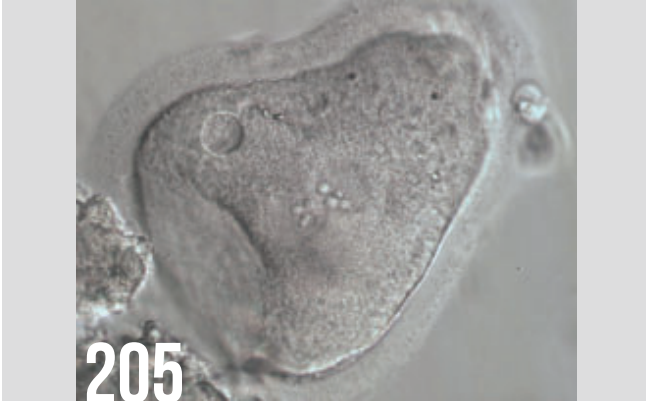


203. Зигота після ICSI з оолею неправильної форми, PVS збільшений, з можливо дуже фрагментованими полярними тільцями (150×збільшення). PN різного розміру перекривають один одного, розташовані периферійно, в цитоплазмі є декілька вакуолей на 2,5 та 6 години. Зиготу утилізували.



204. Зигота після ICSI, PN дещо перекривають один одного та розташовані периферійно, PVS великий з одним великим та одним фрагментованим полярними тільцями (150×збільшення). В цитоплазмі візуалізуються багато малих вакуолей. Зиготу утилізували.

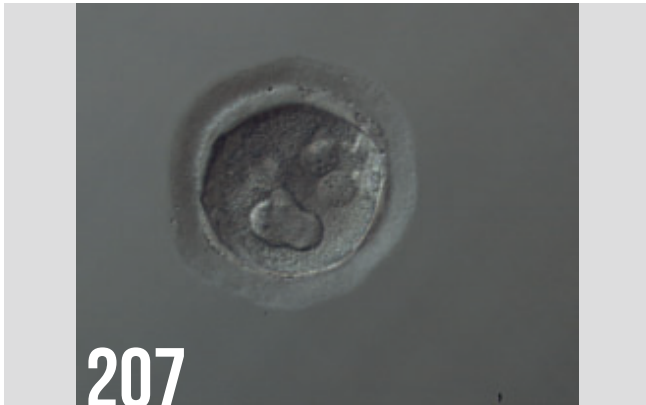
Великі вакуолі (>14 μm в діаметрі) в запліднених ооцитах (мал. 206–210) можуть впливати на процес дроблення та зменшувати кількість бластоцист (Ebner et al., 2005). З цієї причини, зазвичай такі ембріони не радять переносити.



205. Дуже дисморфна зигота після IVF з PN малих розмірів, ZP та оолема нерівної форми, PVS недостатній (600×збільшення). На 10 годину знаходиться мала вакуоля та включення. Зиготу утилізували.



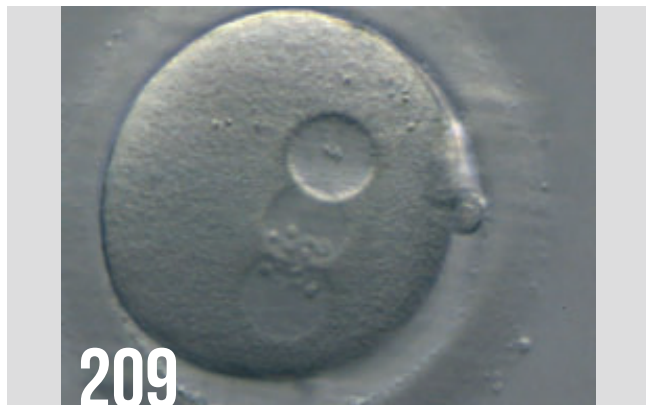
206. Зигота після ICSI з PN, що розташовані периферійно, на 12 годину візуалізується велика вакуоля (400×збільшення). Полярні тільця фрагментовані, ZP ненормальної товщини. Зиготу утилізовано.



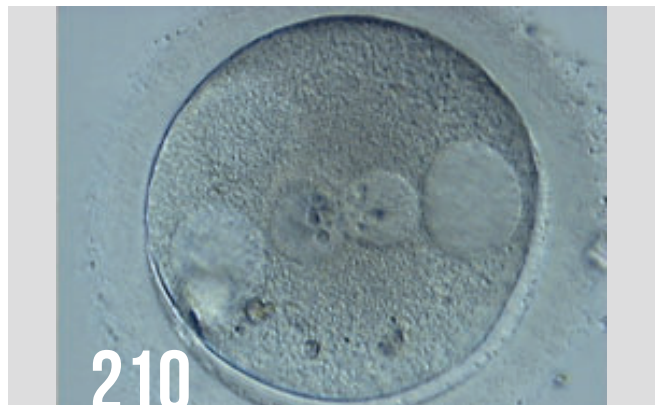
207. Зигота після ICSI з аномаліями цитоплазми (150×збільшення). PN з'єднані, розташовані периферійно, є велика вакуоля неправильної форми на 6 годину. Цитоплазма зерниста, ZP щільна та неоднорідна. Зиготу утилізовано.



208. Зигота після ICSI із значними аномаліями цитоплазми (150×збільшення). Візуалізується одна велика вакуоля з багатьма малими вакуолями навколо неї, цитоплазма зерниста. Зиготу утилізовано.



209. Зигота після ICSI, PN розташовані периферійно, NPВ однакового розміру та кількості (400×збільшення). Велика вакуоля розташована близько до PN, розмір майже такий як у PN. Зиготу утилізовано.



210. Зигота після ICSI з PN, що розташовані посередині, в цитоплазмі дві великі вакуолі безпосередньо біля кожного PN на 3 та 9 годину (400×збільшення). На 6–7 годину також візуалізуються тільця та включення, на 11 годину є ділянка скупчення органел. Зиготу утилізовано.

Під час перевірки запліднення, особливо після стандартного IVF, надзвичайно важливо уважно оцінювати цитоплазму на предмет дисків SER (див. Розділ Перший). Це явище має негативний вплив на клінічні результати (Otsuki et al., 2004).

СТАДІЯ ПОДІЛУ ЕМБРІОНА

Морфологічна оцінка якості ембріону на стадії ділення. Класифікація ембріонів. Принципи селекції

А. КІЛЬКІСТЬ КЛІТИН

Стадія розвитку ембріону, що визначається кількістю бластомерів на 1, 2 або 3 добу після запліднення, є важливим прогностичним фактором майбутньої імплантації та показників настання вагітності (1 клітина до >10 клітин; мал. 211–222). Для оцінки поділу ембріону (кількість бластомерів) на симпозиумі в Стамбулі був прийнятий наступний оптимальний порядок контролю показників поділу: 1 доба (26 ± 1 година після-ICSI, 28 ± 1 година після-IVF), 2-клітини; 2 доба (44 ± 1 година), 4-клітини та 3 доба (68 ± 1 година), 8-клітин (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Раннє дроблення (мал. 211 та 212), тобто перший мітоз, що має місце через 26 ± 1 годин (після ICSI) та 28 ± 1 годин (після IVF) відповідно, має зв'язок з кількістю ембріонів хорошої якості, бластуляцією та показниками вагітності (Lundin et al., 2001; Fenwick et al., 2002). Деякі дослідження показали, що при переносі 4-клітинного ембріону на 2 добу розвитку (мал. 215) показник імплантації та настання вагітності був вище, порівняно з переносами ембріонів з меншою (мал. 213 та 214) або більшою кількістю клітин (мал. 216) (Thurin et al., 2005; Holte et al., 2007; Scott et al., 2007).



211. Зигота на стадії першого мітозу, що не завершився через 25 годин після запліднення. Візуалізується мітотична борозна. Ембріон класифікують як ембріон з 1 клітиною.



212. Перший поділ ембріону, що наближається до завершення, проте, дві дочірні клітини все ще не відокремились. Цей ембріон вважають 2-клітинним.



213. 2-клітинний ембріон з бластомерами рівного розміру з ядром в кожному. Ембріон отримано після ICSI, однак, переносу не було.



214. 3-клітинний ембріон з одним великим бластомером та двома маленькими, тобто, спостерігається чітка відповідність стадії розвитку (див. Розділ С). Ембріон отримано після ICSI, однак, переносу не було.

Відповідно, деякі дослідження показали, що при переносі на 3 добу розвитку показник імплантації та показник живонароджуваності співвідносяться з підвищеною кількістю клітин на 3 добу, при цьому найвищі показники були для 8-клітинних ембріонів (які мали 4 клітини на 2 добу) (van Royen et al., 1999; Rasowsky et al., 2011). Стадія дроблення ембріону на момент переносу також має значення у прогнозуванні викиднів на ранніх строках вагітності. Згідно Hourvitz et al. (2006) п'ять або менше бластомерів у кращому ембріоні на 3 добу свідчить про високу ймовірність раннього викидня. Також опубліковано дані про співвідношення між кількістю клітин при чіткій візуалізації та хромосомних перебудовах. Згідно Munné (2006) у ембріону на 2 добу розвитку з 4 клітинами менше хромосомних аномалій, згідно Magli et al. (2007) теж саме спостерігали й для 7- та 8-клітинних ембріонів на 3 добу (мал. 218 та 219). Науковці Finn et al. (2010) описали, що рівень еуплоїдій у ембріонів з семи та восьми бластомерами на 3 добу вище (мал. 217), порівняно з ембріонами, які мали менше шести бластомерів (мал. 220) або більше дев'яти еластомерів (мал. 221 та 222).



215. 4-клітинний ембріон з чотирма бластомерами однакового розміру, в кожному є ядро. Отримано після ICSI. Ембріон перенесли, він імплантувався.



216. 5-клітинний ембріон, в якому одна клітина знаходиться дещо за межами фокусу. Є незначна відмінність в розмірі клітин, проте, така відмінність не є достатньою, щоб вважати ембріон нерівномірного розміру. Ембріон отримано після ICSI та було кріоконсервовано.



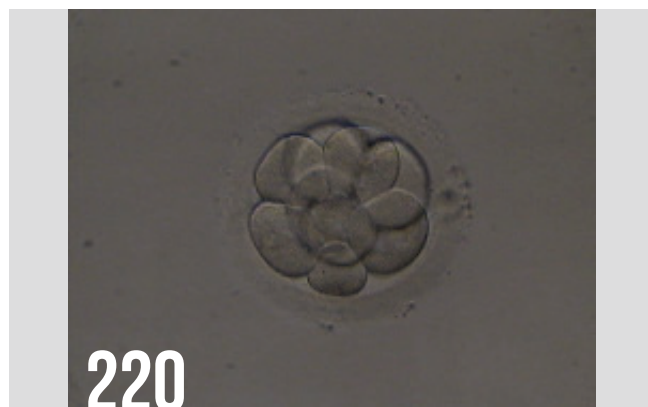
217. 6-клітинний ембріон з чотирма малими та двома більшими бластомерами, спостерігається чітка відповідність стадії розвитку (див. Розділ С). Ембріон отримано після IVF та було кріоконсервовано.



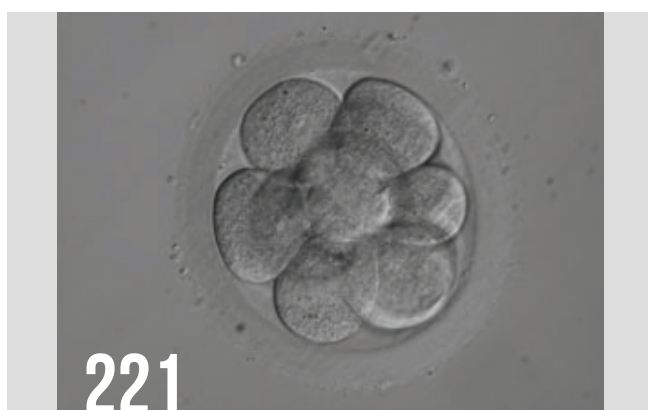
218. 7-клітинний ембріон з чотирма бластомерами з одним ядром. Ембріон перенесли, він імплантувався.



219. 8-клітинний ембріон з бластомерами однакового розміру, наявність ядер не спостерігається. Отримано після ICSI, ембріон перенесли, результат не відомий.



220. Кріоконсервований 9-клітинний ембріон, розморожений на 3 добу розвитку. Один бластомер дещо більший, один бластомер менший, ніж інші. Отримано після ICSI, результат переносу негативний.



221. 10-клітинний ембріон з ядрами в деяких бластомерах. Отримано після ICSI, ембріон був кріоконсервований.



222. Ембріон з більш, ніж 10 клітинами на 4 добу розвитку. Процесу компактизації ембріону не було, що не характерно для пізньої стадії. Отримано після ICSI, ембріон був кріоконсервований.

В. ФРАГМЕНТАЦІЯ

Часто під час поділу клітин формуються маленькі ділянки цитоплазми, які оточені клітинною мембраною та не несуть ДНК.

Таким чином, фрагментацію визначають як наявність без'ядерних формувань бластомерного походження (Keltz et al., 2006). Оцінка ступеню фрагментації є майже в усіх системах оцінки ембріонів. Ступінь фрагментації ембріону часто виражають у відсотках від всього об'єму цитоплазми. Визначають слабкий рівень фрагментації (<10%, мал. 223–225), середній (10–25%, мал. 226–235) та значний (>25%, мал. 236–242).



223. 4-клітинний ембріон на 2 добу з фрагментацією <10% та однаковими бластомерами. Отримано після ICSI, переносу не було.



224. 4-клітинний ембріон на 2 добу з фрагментацією <10% та однаковими бластомерами. Отримано після IVF, переносу не було.



225. 4-клітинний ембріон на 2 добу з фрагментацією <10% та рівними за розміром бластомерами. Фрагменти розташовані в одній зоні перивітелінового простору. Отримано після ICSI, результат переносу не відомий.



226. 4-клітинний ембріон с фрагментацією 10–15%, рівними бластомерами та одним ядром в кожному бластомері. Отримано після ICSI, ембріон після переносу імплантувався.



227. 4-клітинний ембріон з фрагментацією 10–15%, однаковими бластомерами та одним ядром в кожному бластомері. Ембріон отримано після IVF та було кріоконсервовано.



228. 4-клітинний ембріон із скупченою фрагментацією в 10–20%, рівними бластомерами, ядер не видно. Отримано після IVF, результат переносу негативний.



229. 4-клітинний ембріон із скупченою фрагментацією в 15–20%, однаковими за розміром бластомерами, ядер не видно. Отримано після ICSI, результат переносу позитивний.



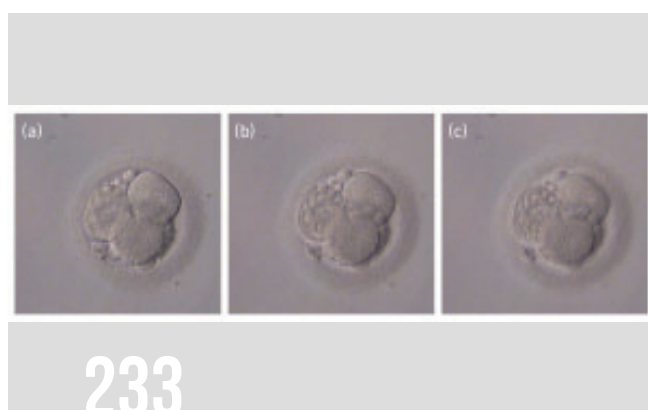
230. 4-клітинний ембріон, фрагментація 15–20%, одна ділянка є великим фрагментом, інші ділянки фрагментації менші та розкидані. Бластомери рівні за розміром без видимих ядер. Ембріон отримано після ICSI та було криоконсервовано.



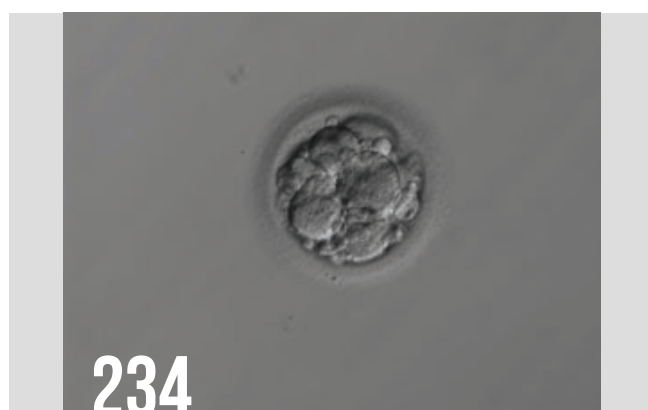
231. 4-клітинний ембріон з розсіяною фрагментацією 15–20%, різними бластомерами, ядер не видно. Ембріон отримано після IVF та було криоконсервовано.



232. 8-клітинний ембріон, ступінь розсіяної фрагментації близько 15–20%, з рівними бластомерами, в деяких бластомерах є ядра. Отримано після IVF, переносу не було.



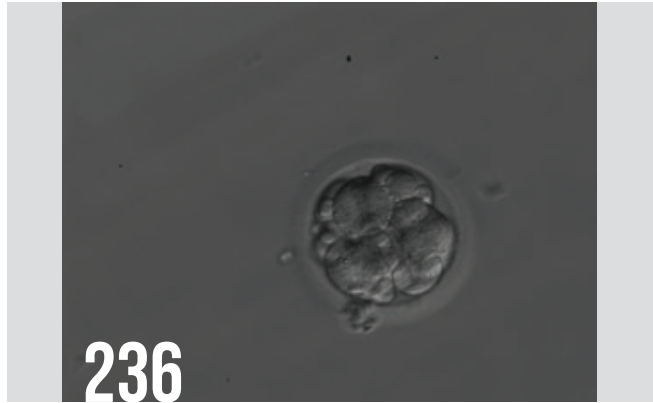
233. Три зображення одного й того ж самого ембріону під різними фокусними площинами. Це 4-клітинний ембріон з фрагментацією 20–25%, яка приблизно відповідає розміру клітини. Важливо оцінювати ембріон з різних фокусів, щоб встановити ступінь та тип фрагментації. Бластомери однакового розміру, є ядра. Отримано після ICSI та криоконсервовано.



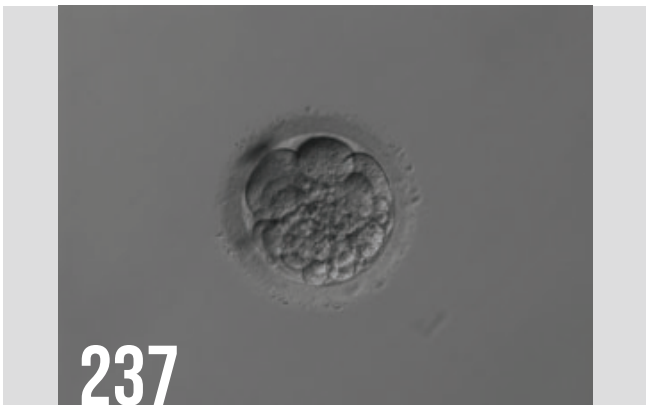
234. 8-клітинний ембріон з розсіяною фрагментацією у 25%, з рівними бластомерами. Отримано після ICSI, результат переносу негативний.



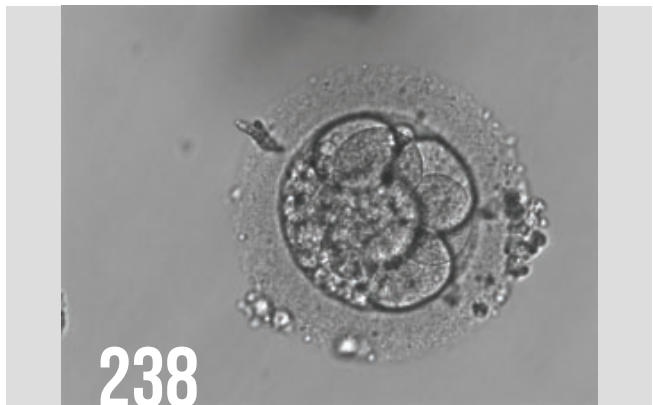
235. 2-клітинний ембріон на 2 добу, фрагментація 20–25% (повільний розвиток). Бластомери однакового розміру, з двома ядрами. Отримано після ICSI, переносу не було.



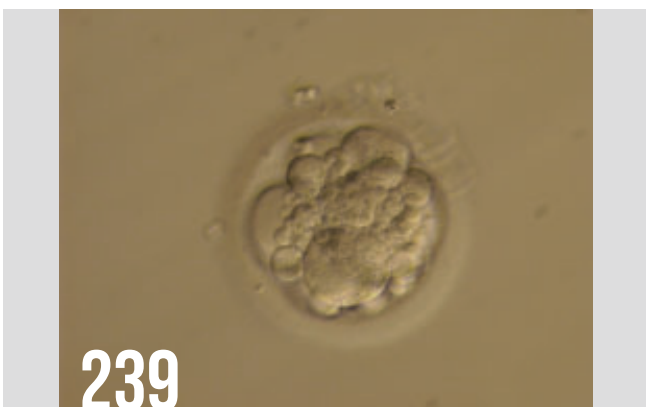
236. 7-клітинний ембріон, ступінь фрагментації 30%. Фрагменти розташовані по всьому перивітеліновому простору. Отримано після ICSI, переносу не було.



237. 6-клітинний ембріон з фрагментацією 30–40%, бластомери різні за розміром. Фрагменти в основному зосереджені в одній ділянці. Отримано після ICSI, переносу не було.



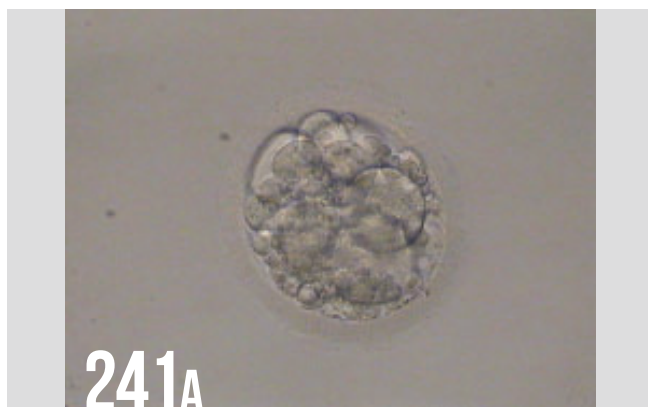
238. 6-клітинний ембріон з концентрованою фрагментацією у 30–40%, щільною ЗР. Отримано після ICSI, переносу не було.



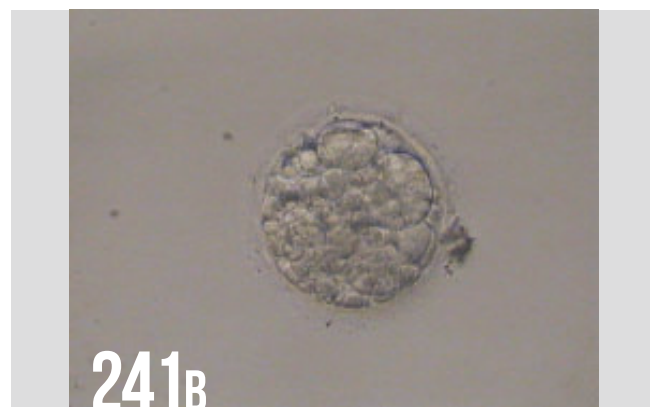
239. 4-клітинний ембріон, ступінь фрагментації приблизно 40%, фрагменти розкидані по ембріону. Бластомери різні за розміром. Отримано після ICSI, переносу не було.



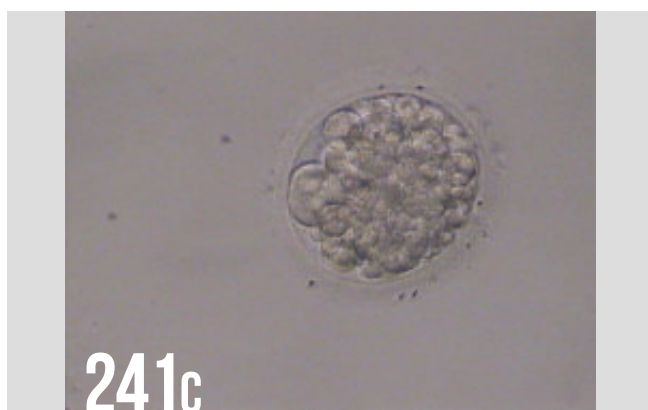
240. 3-клітинний ембріон, ступінь фрагментації приблизно 40%, фрагменти розкидані. Бластомери не однакові. Отримано після ICSI, переносу не було.



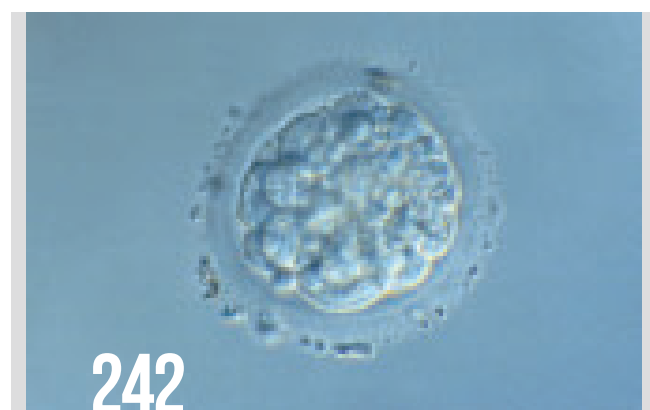
241(a). Три зображення ембріону з фрагментацією >50%. В одному фокусі (а) видно три-чотири клітини.



241(b). В інших площинах видно лише одну-дві клітини. (b). Отримано після ICSI, переносу не було.



241(c).



242. Ембріон на 3 добу розвитку, ступінь фрагментації >50%. Отримано після IVF, переносу не було.

Часто важко відрізнити великий фрагмент без ядра та малу клітину (з ядром). Згідно Johansson et al. (2003) частки цитоплазми, що були менше $45\ \mu\text{m}$ у діаметрі на 2 добу, на 3 добу не містили ДНК. Автори запропонували стандартизацію зазначених фрагментів як усіх формувань, що менші за ці розміри.

Високий рівень фрагментації негативно впливає на показники імплантації та вагітності (Racowsky et al., 2000). Наявність невеликого об'єму фрагментів немає негативного впливу (Alikani et al., 1999). Два різних види фрагментації людських ембріонів було зафіксовано за допомогою камери: чітка фрагментація, що характеризується сталими фрагментами, відокремленими від бластомерів, та псевдофрагментація, що характеризується тимчасовою появою під час або відразу ж після дроблення клітини, проте, її не видно під час подальшого розвитку (Van Blerkom et al., 2001).

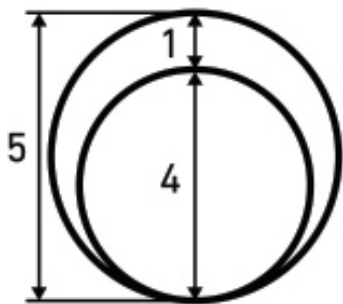
Підвищений ступінь фрагментації також негативно впливає на бластуляцію та може впливати на розміщення клітин під час поділу (Hardy et al., 2003). Об'ємний розподіл фрагментів у перивітеліновому просторі можна диференціювати згідно двох ознак, а саме розсіяний (мал. 224, 226, 227, 230–236, 239 та 240) та концентрований (мал. 223, 225, 228, 229, 237 та 238). Поява першого є ознакою високого рівня хромосомних аномалій (Magli et al., 2007). Чим вище ступінь фрагментації, тим важче диференціювати розсіяні та сконцентровані фрагменти (мал. 241 та 242). Фрагментацію вважають важливим параметром оцінки розвитку ембріонів, адже ембріони зі значною та сталою фрагментацією мають нижчий потенціал до імплантації.

С. РОЗМІР БЛАСТОМЕРУ

«Стадієспецифічні» чи «нестадієспецифічні»

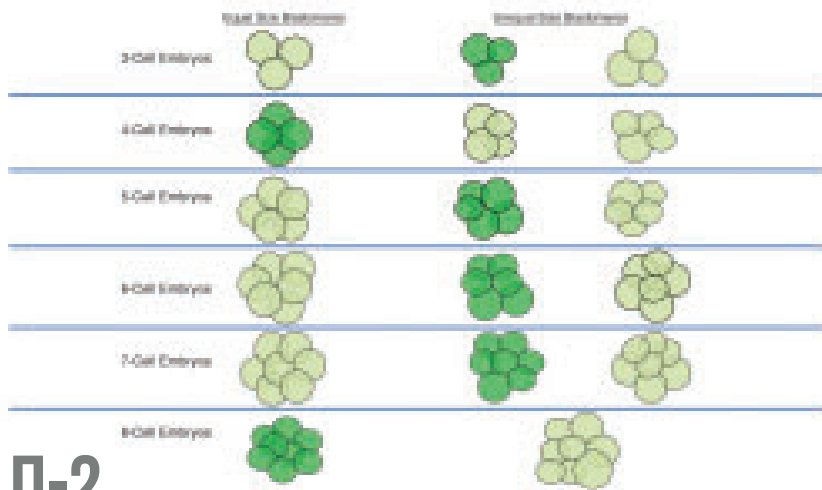
Досліди показали, що високий рівень однорідності в розмірі бластомерів у ембріонів на 2 добу пов'язаний з високим рівнем настання вагітності після застосування допоміжних репродуктивних технологій (Giorgetti et al., 1995; Ziebe et al., 1997; Hardarson et al., 2001; Holte et al., 2007). Нерівномірний поділ, тобто коли клітина дробиться на дві клітини різні за розміром, може стати причиною нерівномірного розподілу молекул цитоплазми, наприклад, білків та мРНК. Це може призвести до високої частоти мультіядерності та анеуплоїдій (Hardarson et al., 2001; Magli et al., 2001).

Відносний розмір бластомера ембріону залежить від стадій поділу та рівномірності кожної із стадій дроблення (діаграма 1 та 2). Бластомери 2-, 4- та 8-клітинних ембріонів мають бути однаковими (стадієспецифічні ембріони) (мал. 243-245), а не нерівними за розміром (нестадієспецифічні ембріони) (мал. 246-252). Для порівняння, бластомери ембріонів за виключенням 2, 4 та 8-клітинних мають бути різного розміру, так як існує асинхронія в поділі одного або більше бластомерів (мал. 253-256). 3-клітинний ембріон має мати один великий та два менших бластомери (мал. 253); 5-клітинний ембріон, три великих та два менших бластомери (мал. 254); 6-клітинний ембріон, два великих та чотири менших бластомери (мал. 255) та 7-клітинний ембріон, один великий та шість менших бластомерів (мал. 256). Такі ембріони вважають стадієспецифічними. Однак, 4-клітинний ембріон з одним або двома бластомерами набагато більшими за інші (мал. 248-251), 3-клітинний ембріон з усіма бластомерами рівного розміру (мал. 257), 5-клітинний ембріон з двома великими та трьома меншими бластомерами (мал. 258 та 259) або одним меншим та чотирма більшими бластомерами (мал. 260), 6-клітинний ембріон з бластомерами рівними за розміром (мал. 261) або надзвичайно різними за розміром (мал. 262) та 7-клітинний ембріон з трьома великими та чотирма меншими бластомерами (мал. 263) не вважаються такими, що мають нормальний розмір бластомерів по відношенню до кількості клітин та не вважаються стадієспецифічними (діаграма 1 та 2).



Д-1

Діаграма 1. Діаграма, що показує очікуваний розмір клітин ембріону, який дробиться: людський ембріон повинен мати 2 однакових за розміром бластомери на 2-клітинній стадії, таким чином, вони є стадієспецифічними. Неоднакові за розміром бластомери на 2-клітинній стадії (>25% різниця в діаметрі найменшої клітини, тобто менше, ніж пропорція 1:4) не вважаються стадієспецифічними на 2-клітинній стадії. Таке ж правило можна застосувати до 4- та 8-клітинних ембріонів. Числа показують пропорції розміру діаметра.



Д-2

Діаграма 2. Діаграма, що ілюструє концепцію стадієспецифічного та нестадієспецифічного зразку поділу. Темно-зелений колір показує ембріони на стадієспецифічній стадії дроблення, світло-зелений колір показує нестадієспецифічну стадію поділу ембріонів.



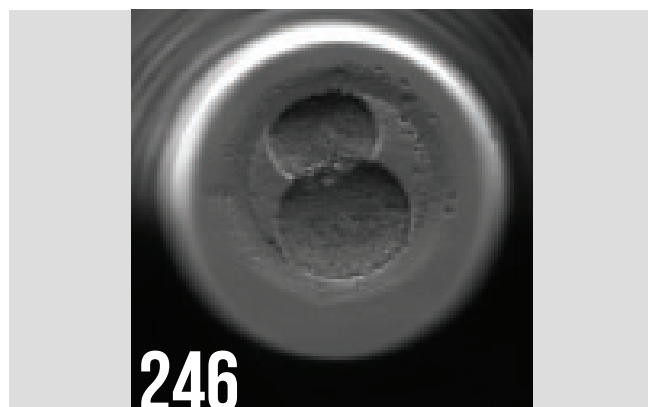
243. 2-клітинний ембріон з рівними за розміром бластомерами та без фрагментації на 2 добу. Бластомери мають стадієспецифічний розмір клітин. Ембріон перенесли, вагітності не отримали.



244. 4-клітинний ембріон з однаковими за розміром бластомерами, без фрагментації на 2 добу. Бластомери мають стадієспецифічний розмір клітин. Зверніть увагу на розташування бластомерів у формі конюшини. Ембріон перенесли та отримали вагітність.



245. 8-клітинний ембріон з бластомерами однакового розміру, без фрагментації на 3 добу. Бластомери відповідають стадієспецифічному розміру клітин. Перенос закінчився вагітністю.



246. 2-клітинний ембріон з бластомерами нерівного розміру для 2 доби. Бластомери неспецифічного розміру.



247. 2-клітинний ембріон з нерівними за розміром бластомерами, відсоток фрагментації до 10% на 2 добу. Бластомери неспецифічного розміру.



248. 4-клітинний ембріон, бластомери різного розміру на 2 добу, клітина праворуч на 25% менша, ніж клітина зліва. Бластомери неспецифічного розміру. Ембріон перенесли, вагітність отримали.





249. 4-клітинний ембріон з бластомерами різного розміру на 2 добу. Один бластомер при такому фокусі чітко не візуалізується. Бластомери нестадієспецифічного розміру.



250. 4-клітинний ембріон з бластомерами різного розміру та рівної форми. Два бластомери більші за інші два. Бластомери нестадієспецифічного розміру. ZP цього ембріону витягнута.



251. 4-клітинний ембріон з бластомерами різного розміру. Бластомери нестадієспецифічного розміру.



252. 8-клітинний ембріон з бластомерами різного розміру. Бластомери нестадієспецифічного розміру. Ембріон перенесли, вагітність не отримали.



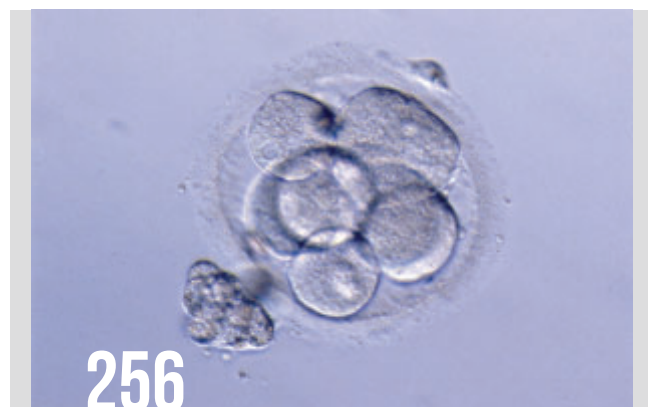
253. 3-клітинний ембріон з одним великим та двома маленькими бластомерами на 2 добу. Бластомери стадієспецифічного розміру. Ембріон перенесли, проте вагітність не отримали.



254. 5-клітинний ембріон з трьома великими та двома меншими бластомерами. Бластомери стадієспецифічного розміру.



255. 6-клітинний ембріон з двома великими та чотирма меншими бластомерами. Бластомери стадієспецифічного розміру.



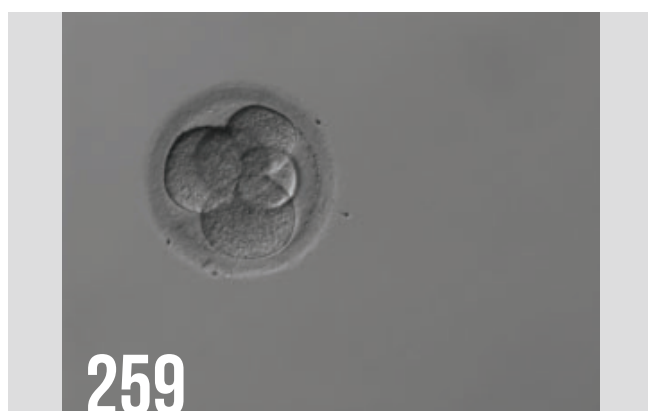
256. 7-клітинний ембріон з одним великим та шістьма меншими бластомерами. Бластомери стадієспецифічного розміру.



257. 3-клітинний ембріон з трьома бластомерами однакового розміру через 26 годин після інсемінації. Бластомери нестадієспецифічного розміру.



258. 5-клітинний ембріон з двома великими та трьома малими бластомерами; таким чином, бластомери нестадієспецифічного розміру.



259. 5-клітинний ембріон з двома великими бластомерами та трьома малими бластомерами, замість трьох великих та двох малих бластомерів, таким чином, розмір бластомерів нестадієспецифічний.

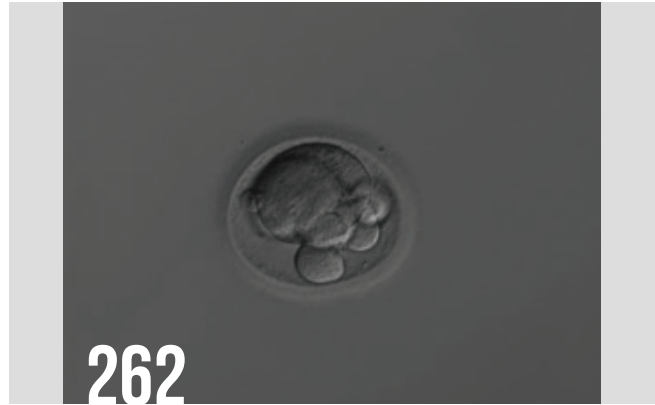


260. 5-клітинний ембріон з чотирма великими та одним меншим бластомером замість трьох великих та двох малих бластомерів; таким чином, бластомери нестадієспецифічного розміру.



261

261. Розморожений 6-клітинний ембріон з шістьма бластомерами однакового розміру, замість двох великих та чотирьох малих бластомерів, таким чином, розмір бластомерів нестадієспецифічний.



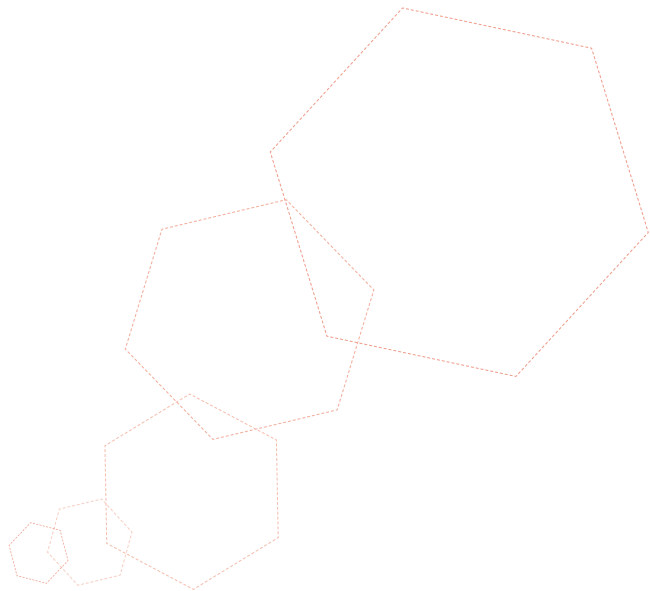
262

262. 6-клітинний ембріон з двома дуже великими бластомерами та чотирима дуже маленькими. Надзвичайна різниця в розмірі між великими та малими бластомерами робить цей ембріон нестадієспецифічним.



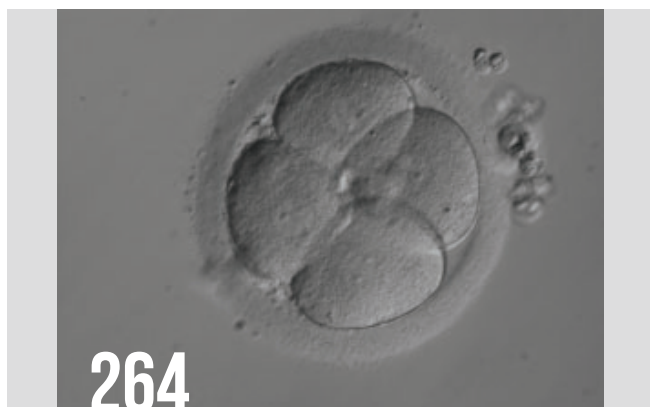
263

263. 7-клітинний ембріон з трьома великими та чотирма малими бластомерами, а мав би бути один великий та шість малих; тобто, розмір клітин нестадієспецифічний. Один з бластомерів є мультіядерним.



D. НУКЛЕАЦІЯ

Статус нуклеації визначається наявністю або відсутністю ядер в бластомері ембріону на стадії дроблення. В ідеалі, під нуклеацією кожного бластомеру в ембріоні розуміють наявність одного ядра в бластомері (мал. 264–266), коли ядро не візуалізується або в разі мультіядерності (мал. 267–270).



264. 4-клітинний ембріон з бластомерами одного розміру з одним ядром в бластомерах, що мають форму конюшини на 2 добу після запліднення. Візуалізується одينية ядро в кожному бластомері.



265. 4-клітинний ембріон з бластомерами одного розміру, з одينية ядром, бластомери розташовані у формі тетраедра на 2 добу після запліднення.



266. 4-клітинний ембріон з бластомерами одного розміру, з одينية ядром, бластомери розташовані у формі тетраедра на 2 добу після запліднення. Візуалізується одينية ядро в кожному бластомері.



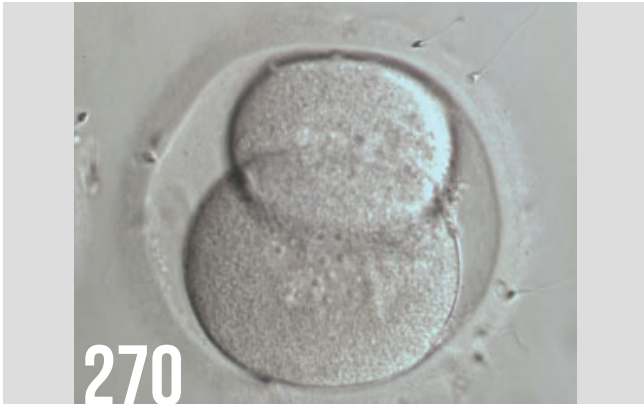
267. 4-клітинний ембріон з бластомерами різного розміру. Один бластомер бінуклеарний. Ембріон перенесли, проте вагітності не отримали.



268. 4-клітинний ембріон з бластомером, що має 2 ядра.



269. 2-клітинний ембріон з двома бластомерами, що мають два ядра, фрагментація 25–30%.



270. 2-клітинний ембріон з бластомерами різного розміру з декількома (чотирма) ядрами в кожному бластомері.

Найбільш вивчена стадія нуклеації — це мультіядерність, яку розуміють як наявність більш, ніж одного ядра, хоча б в одному бластомері в ембріоні (Jackson et al., 1998; Van Royen et al., 2003). Мультіядерність можна оцінити на 1 добу ($26-28 \pm 1$ год. після запліднення), 2 добу (44 ± 1 год. після запліднення) та 3 добу (68 ± 1 год. після запліднення) у ембріонів на стадії дроблення, хоча оцінка ембріонів на 3 добу може бути більш складною, що викликано малим розміром клітин та їх більшою кількістю (Van Royen et al., 2003). Якість ембріону співвідноситься з явищем мультіядерності, у 4-клітинних ембріонів на 2 добу та 8-клітинних на 3 добу явище мультіядерності рідше зустрічається порівняно з іншими клітинними стадіями, що спостерігаються в ці дні (Van Royen et al., 2003; Ziebe et al., 2003).

Потенціал імплантації знижується в разі мультіядерності (Jackson et al., 1998; Pelinck et al., 1998; Van Royen et al., 2003; Moriwaki et al., 2004), у ембріонів з багатьма ядрами рівень хромосомних аномалій вищий (Pickering et al., 1995; Hardarson et al., 2001; Agerholm et al., 2008), крім того, зростає показник спонтанних викиднів (Scott et al., 2007). Мультіядерність частіше зустрічається в бластомерах у ембріонів з неправильним дробленням, на відміну від ембріонів з бластомерами, що дробились рівномірно. (Hardarson et al., 2001).

Мультіядерність поділяють на двоядерність (два ядра на клітину мал. 268 та 269) та мульти/мікроядерність (більше ніж два ядра на клітину, мал. 270). Очевидно, причини таких явищ мають різну природу (Meriano et al., 2004). Мультія-

дерні ембріони, як правило, не переносять. Однак, бінуклеарні клітини на 1 добу можуть стати клітинами з нормальним набором хромосом (Staessen and Van Steirteghem, 1998). З іншого боку, високий ступінь мультіядерності очевидно не асоціюється з нормальним дробленням клітини.

Оцінка мультіядерності повинна бути включена в будь-який протокол оцінки ембріону для того, щоб обрати для переносу ембріон найвищої якості. З таких ембріонів можна отримати вагітність та пологи, проте, їх краще не переносити, якщо в наявності є інші ембріони.

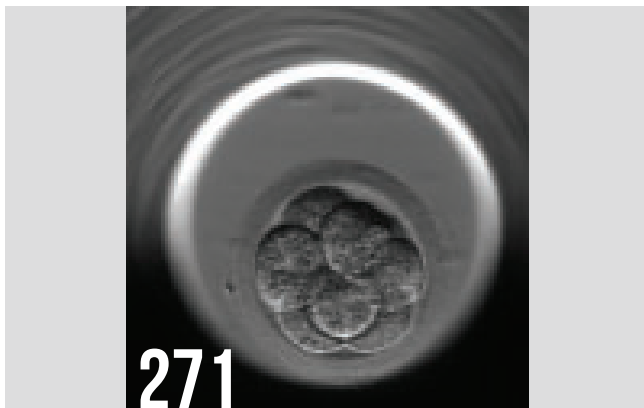
Наявність або відсутність одиничного ядра в бластомері – це показник потенціалу ембріону до імплантації (Moriwaki et al., 2004; Saldeen and Sundström, 2005). Наявність чотирьох бластомерів з одним ядром в 4-клітинному ембріоні (мал. 265 та 266) є показником високої ймовірності імплантації у порівнянні з випадками, коли є три бластомери (мал. 268) (Saldeen and Sundström, 2005). Проте, інші дослідження демонструють дані, що оцінка ядер ембріону на 2 добу немає цінності для прогнозування ймовірності імплантації на відміну від оцінки морфології ембріону на 3 добу (Bar-Yoseph et al., 2011).

Цитоплазма бластомерів може бути затемнена зернистістю в центрі, що пов'язано з кортикальним ореолом, так як органели цитоплазми ретрактують від центру бластомеру (мал. 273). У таких ембріонів здатність до імплантації знижена або вони мають високу ймовірність дегенерації (Veesk, 1999). У ембріонів зі змінними зонами зернистості та чистими зонами можливість дегенерації ще вища (мал. 274).

Е. АНОМАЛІЇ ЦИТОПЛАЗМИ

Цитоплазма ембріонів, що дробляться, зазвичай бліда, прозора або слабозерниста. (Hartshorne, 2000). Аномалії цитоплазми, такі як зернистість цитоплазми, пухирці в цитоплазмі та наявність вакуолей, іноді зустрічаються, їх також можна включити до морфологічної оцінки ембріонів на 2 та 3 добу розвитку. Однак, потенційна прогностична цінність таких показників щодо якості ембріонів або потенціалу до імплантації невідома.

Цитоплазматичний **ПІТИНГ** (pitting) (мал. 271 та 272) характеризується наявністю багатьох малих пухирців відповідного діаметру до 1.5 μm на поверхні цитоплазми (Biggers and Racowsky, 2002). Хоча пухирці в цитоплазмі на 3 добу розвитку ембріонів можна асоціювати з процесом бластуляції, поява зернистості цитоплазми немає прогностичної цінності відносно якості ембріона (Rienzi et al., 2003) або вагітності (Desai et al., 2000). Інші вчені показали, що умови культивування можуть викликати появу пухирців в цитоплазмі (Biggers and Racowsky, 2002; Ebner et al., 2005b), що в крайніх випадках може призвести до підвищеного ризику раннього викидня (Ebner et al., 2005b).



271. 8-клітинний ембріон з бластомерами одного розміру з цитоплазматичним пітингом. На поверхні цитоплазми візуалізуються багато маленьких пухирців.



272. 8-клітинний ембріон з бластомерами одного розміру з цитоплазматичним пітингом. Малі пухирці однорідно розташовані в цитоплазмі. 5 бластомерів у фокусі розташовані в одній поверхневій площині.



273. 2-клітинний ембріон з чистим ореолом в обох бластомерах, зернистість у центрі, органели в периферійному кортексі відсутні.



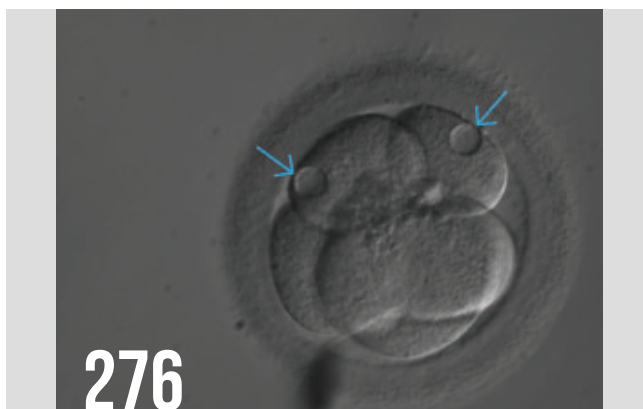
274. 4-клітинний ембріон на 2 добу розвитку з аномальним розподілом органел, що викликало нерівномірність зернистості та зон в кожній клітині.

Вакуолізація цитоплазми напевно є найчастішим цитоплазматичним дисморфізмом, що зустрічається в людських ооцитах/ембріонах. Вакуолі відрізняються за розміром та кількістю (мал. 275–280). Вони є мембранними цитоплазматичними включеннями, заповненими рідиною, яка практично ідентичні перивітиліновій рідині (Van Blerkom, 1990). Вакуолі людських ембріонів достатньо вивчені та описані, проте мало відомо про частоту, з якою вони зустрічаються, та їх роль у формуванні ембріонів. Окрім того, вакуолі видно під час забору ооцитів, вони можуть бути створені штучно в результаті ICSI, вакуолі також можуть виникнути на стадії компактизації (Ebner et al., 2005a).

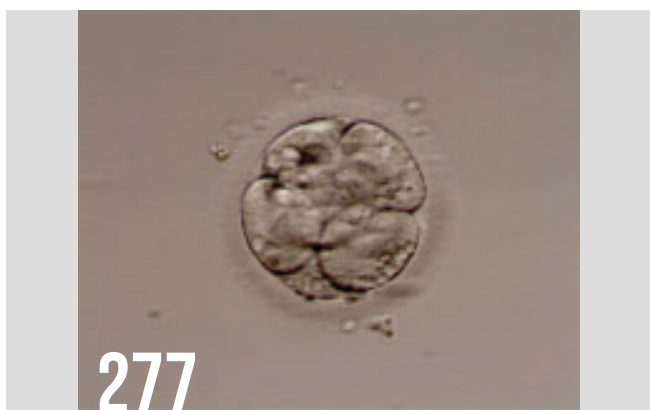
De novo формування вакуолей на 4 добу розвитку пов'язано із зупинкою розвитку та зі шкідливим впливом на процес бластуляції (Ebner et al., 2005a). Вважають, що виникнення незначної кількості малих вакуолей (мал. 275 та 276) не важливе (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), але у випадках значної вакуолізації (мал. 277–280) це може мати поганий вплив, особливо на формування просторового розвитку і таку оцінку слід застосувати до селекційного відбору.



275. 8-клітинний ембріон із одним бластомером з малою вакуолею.



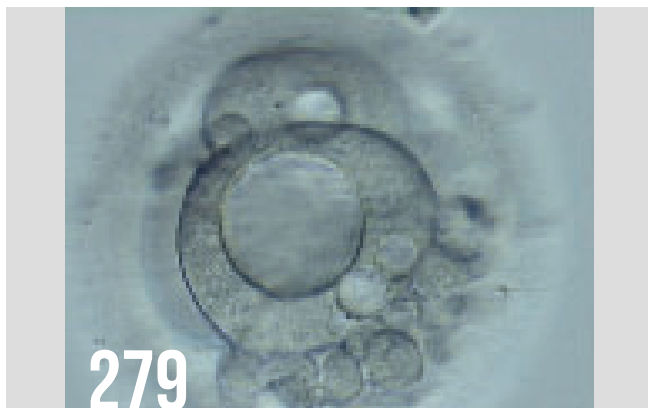
276. 5-клітинний ембріон із двома малими та трьома великими бластомерами. Є мала вакуоля в кожному малому бластомері.



277. Ембріон із значною кількістю дуже дрібних вакуолей.



278. 2-клітинний ембріон із великими вакуолями в обох бластомерах та фрагментацією в 15%.



279. 3-клітинний ембріон із великою вакуолею в бластомері на першому плані цього зображення. Є менша вакуоля в іншому бластомері. Високий рівень фрагментації, біля 40%, зосереджено в одному місці.



280. 3-клітинний ембріон із бластомерами різного розміру з великими та малими вакуолями.

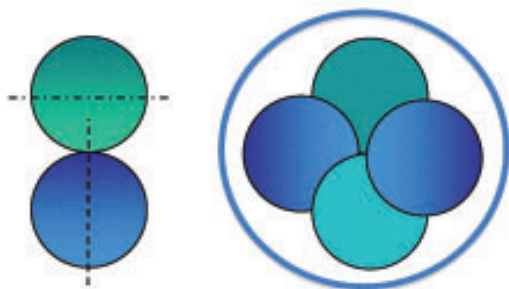
Ф. РОЗПОДІЛ КЛІТИН У ПРОСТОРИ

Людські ооцити поляризовані від початку раннього формування, складаються з анімального (зародкового) та вегетативного полюсу (Antczak and Van Blerkom, 1997, 1999; Edwards and Beard, 1997).

Цей анімальний та вегетативний градієнт розподіляється по-різному відносно до 4-клітинних бластомерів за допомогою комбінації меридіональних та екваторіальних ділянок поділу (Gulyas, 1975).

Перший поділ відбувається меридіонально і призводить до двох майже однакових дочірніх бластомерів, кожен з яких успадковує подібні полярності анімальної та вегетативної цитоплазми.

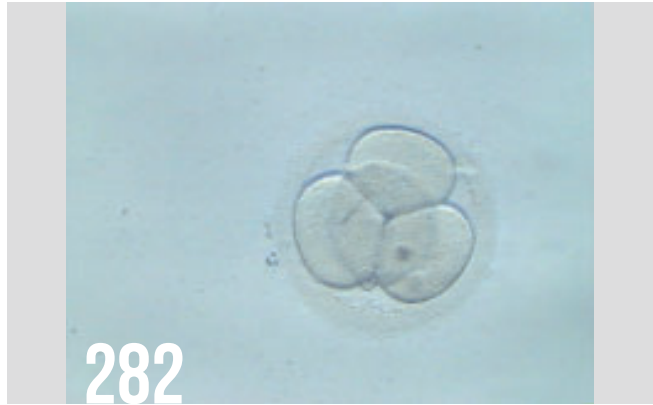
При другому поділі одна клітина ділиться меридіонально, тоді як інша клітина ділиться екваторіально, внаслідок чого з'являються чотири клітини, що мають різну полярність (Діаграма 3). Клітини двох дочірніх клітин, що утворились внаслідок меридіонального поділу, мають повну успадковану полярність, а дві дочірні клітини, що утворились внаслідок екваторіального поділу, відрізняються за полярністю, одна клітина має переважно анімальну цитоплазму, друга клітина має переважно вегетативну цитоплазму (Gulyas, 1975; Edwards and Hansis, 2005). Такі поділи призводять до типового пірамідального або тетрадрального розташування трьох бластомерів з анімальною цитоплазмою, зв'язаною з полярним тільцем; та один бластомер, що унаслідкує лише вегетативну цитоплазму, розташований далеко від полярного тільця (мал. 281 та 282; Edwards and Hansis, 2005). Інші види меридіонального та екваторіального поділу можуть призвести до різного розподілу анімальних та вегетативних полюсів в дочірніх клітинах, та внаслідок цього з'являється нететрадральна, або конюшиновидна форма 4-клітинних ембріонів (мал. 283–285). Форма конюшини може зберігатися при подальшому поділі (рис. 286).



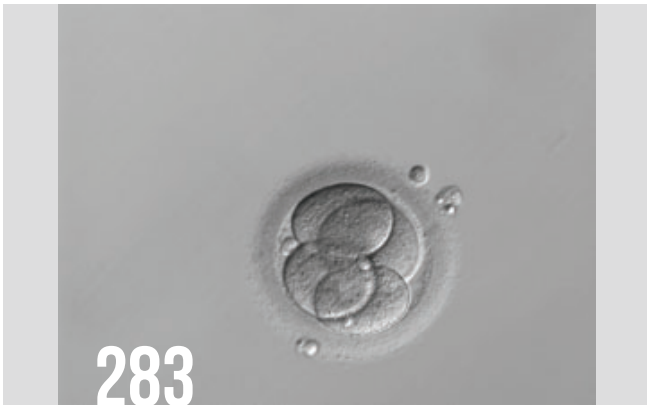
Діаграма 3. Діаграма показує розподільні площини другого мітотичного поділу, де одна клітина розщеплюється екваторіально, а друга клітина розщеплюється меридіонально, утворюючи чотири дочірні клітини з різною полярністю.



281. 4-клітинний ембріон із типовою пірамідальною або тетраедральною структурою. Ембріон отримано внаслідок IVF, його перенесли, він імплантувався.



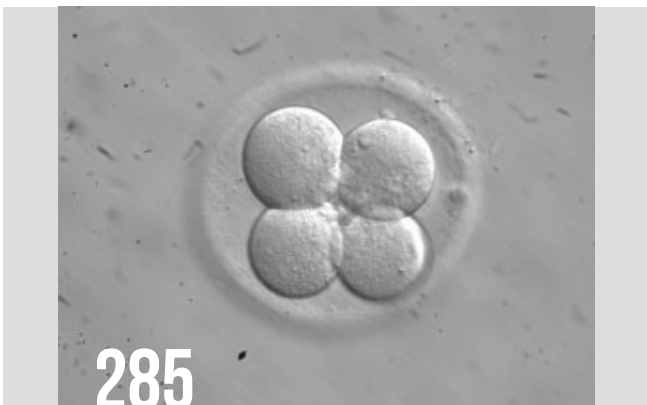
282. 4-клітинний ембріон із типовою пірамідальною або тетраедральною структурою. Ембріон отримано внаслідок IVF, його перенесли, проте він не імплантувався.



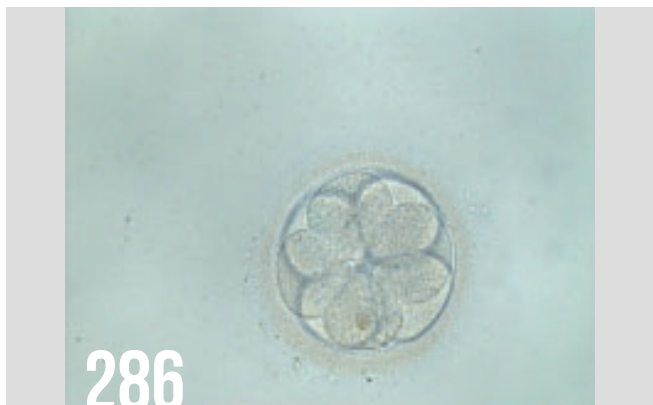
283. 4-клітинний ембріон із нететраедральною або конюшиновидною структурою. Отриманий внаслідок ICSI, ембріон був кріоконсервований.



284. 4-клітинний ембріон, отриманий після застосування ICSI з нететраедральною або конюшиновидною структурою. Його перенесли, проте він не імплантувався.



285. 4-клітинний ембріон із конюшиновидною структурою та збільшеною ЗР. Відносний розмір бластомерів відносно ЗР менший, ніж зазвичай у такому ембріоні.



286. Подвійний 8-клітинний ембріон із конюшиновидною структурою. Конюшиновидна структура 4-клітинного ембріону збереглася в наступному поділі.

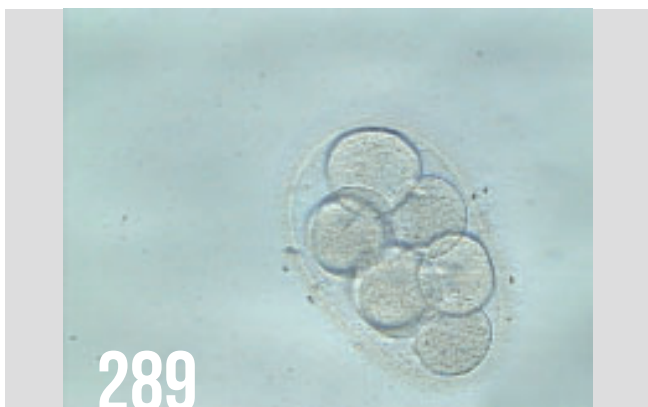
Ще однією особливістю є овальні ембріони, які було отримано з овальних ооцитів (мал. 287–290). В таких ембріонах просторовий розподіл бластомерів є обов'язково аномальним.



287. Ембріон овальної форми з 4 бластомерами, що розташовані у формі конюшини.



288. 7-клітинний ембріон, овальної форми, бластомери в основному розташовані навколо однієї просторової площини. ZP має перетинку.



289. Ембріон овальної форми з 8 бластомерами, розташованими в одній площині.



290. Ембріон овальної форми з 7 бластомерами, розташованими в одній просторовій площині. ZP неправильної форми.

Г. КОМПАКТИЗАЦІЯ

Людський ембріон стає однорідною масою клітин на 4 добу розвитку, морулою. Морула гарної якості складається з 16–32 бластомерів, всі бластомери повинні приймати участь в процесі компактизації (Tao et al., 2002).

Зростання міжклітинної адгезії має початися на стадії 8 клітин та з часом швидко прогресувати (мал 291–293). Білок клітинної адгезії E-кадгерін змінює розподіл від цитоплазми до клітинних мембран. Клітинні з'єднання, особливо тісні з'єднання, починають поширюватися (Alikani, 2005). Цей процес пов'язують з активацією геному ембріона (Desai et al., 2000), таким чином, вважають, що це добра ознака потенціалу розвитку ембріона. Склад культурального середовища та інші умови також можуть грати роль у кінетиці ранньої компактизації.



291. 8-клітинний ембріон без ознак компактизації. Клітини одного розміру та ледве торкаються одна одної.



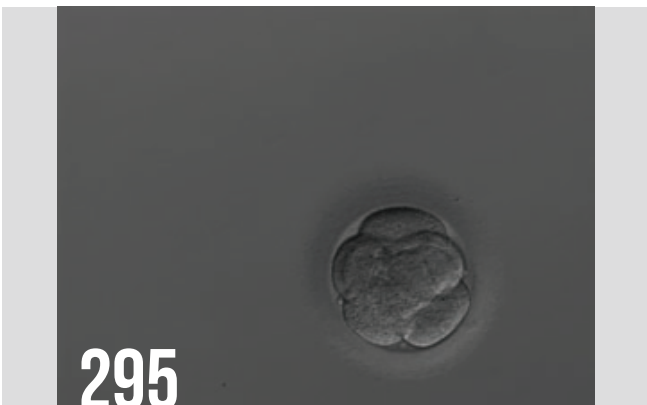
292. 8-клітинний ембріон з ознаками початкової компактизації. Клітини розташовані близько.



293. 8-клітинний ембріон з ознаками помірної компактизації. Окремі бластомери важко відрізнити.



294. 4-клітинний ембріон конюшиновидної форми з ознаками уже ранньої компактизації. Одиначне ядро чітко візуалізується в кожній клітині.



295. 7-клітинний ембріон з ознаками ранньої компактизації. Перенос мав місце, проте, результат тесту був негативний.



296. Ембріон із більш ніж 12 бластомерами без ознак компактизації. Це незвично, що ембріон із такою кількістю клітин не компактизувався.

Компактизацію можна спостерігати до стадії 8 клітин (мал 294 та 295), в той же час ембріони з більш, ніж 10 бластомерами, без ознак компактизації зустрічаються не часто (мал. 296). Дослідження Skiadas et al. (2006) показало, що ембріони з ранньою компактизацією мали підвищений потенціал до імплантації; однак, це стосувалось лише ембріонів доброї якості (<10%фрагментації).

Згідно Istanbul consensus ембріон на 4 добу розвитку вважають доброї якості, коли всі клітини формують морулу (мал. 297), в той же час ті ембріони, в яких деякі клітини або фрагменти не приймають участь у процесі компактизації (мал 298–300), мають знижений потенціал до імплантації.



297. Морула гарної якості. Всі бластомери приймають участь в компактизації, окремі клітини вже не візуалізуються.



298. Морула середньої якості. Окремі проміжки між клітинами все ще візуалізуються, декілька малих клітин (фрагментів) не повністю включені до процесу компактизації.



299. Морула середньої якості. Проміжки між клітинами все ще візуалізуються, окрема клітина не включена в процес компактизації.



300. Морула поганої якості. Деякі клітини та фрагменти знаходяться поза межами головної маси компактизованих клітин.

Клітини, що знаходяться зовні компактизованих ембріонів, напевно, втратили тотипотентність, так як вони зв'язані з формою трофектодерми (Cauffman et al., 2009). Наступна фаза розвитку — це початок формування порожнини, що призводить до формування бластоцисти (мал. 301 та 302).



301. Ембріон з ранньою кавітацією, починає формуватись порожнина — бластоцель



302. Ембріон з ранньою кавітацією. Починає з'являтися порожнина — бластоцель. ZP розірвана після біопсії бластомеру.



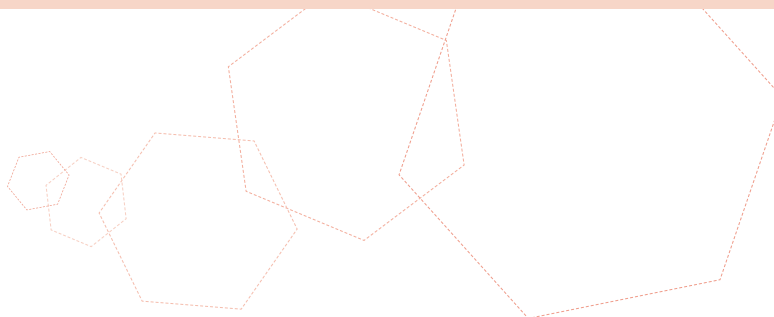
ОЦІНКА ЯКОСТІ БЛАСТОЦИСТИ

Морфологічна оцінка якості ембріону на стадії ділення. Класифікація ембріонів. Принципи селекції

А. СТУПІНЬ ЕКСПАНСІЇ

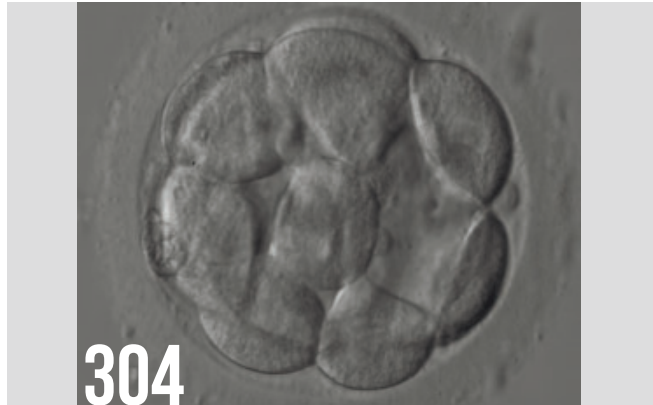
Визначним моментом ембріонального розвитку є той момент, коли починає акумулюватись рідина між клітинами на стадії морули. Зі зростанням об'єму рідини, з'являється порожнина, що утворює бластоціль. Це, як правило, трапляється між 4 та 5 добою розвитку у ембріонів людини *in vitro*. Це нова стадія в житті ембріону — стадія бластоцисти. При зростанні кількості рідини в сформованій бластоцисті, а також зростанні кількості клітин, можна говорити про прогресивне збільшення об'єму бластоцисти та її порожнини та про подальше стоншення зони пеллюцида (ZP). В решті решт бластоциста розриває оболонку, це зветься хетчингом. Кількість клітин, що формують бластоцисту, може змінюватись від 24 до 322 клітин (Hardarson et al., 2003), що часто відображається на морфології бластоцисти. Фізіологічні події, які лежать в основі цієї трансформації «клітинної маси» на стадії компактизації до високоструктурованої бластоцисти, не є повністю зрозумілими. Однак, клітини, які розташовані за збігом обставин в зовнішній частині ембріону, починають вирівнюватись, контактуючи з сусідніми клітинами за допомогою тісних зв'язків. Таким чином, формується бар'єр між зовнішньою та внутрішньою площиною ембріона, що передує формуванню бластоцисти. Формування бластоцисти починається через початкову секрецію між клітинами морули, ця маленька площа розвивається та збільшується через дії мембранних каналів $\alpha/\text{K-ATPase}$, що викликають збільшення концентрації солі у ембріона, притягуючи воду внаслідок осмосу (Watson et al., 2004). Збільшення тиску води поступово протягом розвитку бластоцисти збільшує порожнину.

Документ Стамбульської групи (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) використовує спрощену систему градації бластоцист лише на чотири групи, поєднуючи перші дві та останні дві групи шкали Gardner та Schoolcraft (1999). У цьому Атласі ми прийняли систему класифікації, яка розподіляє оцінку експансії на шість категорій, а ВКМ (Розділ В) і ТЕ-клітини (Розділ С) класифікуються за трьома категоріями, подібно до шкали Гарднера та Schoolcraft (1999), але використовували цифрову систему оцінки, запропоновану Стамбульською групою: бластоцисти 1 класу — це ті, в яких порожнина менше половини об'єму ембріона (рис. 303–308); бластоцисти 2 класу — це ті, де порожнина в половину або більше половини об'єму ембріона (рис. 309–314); бластоцисти 3 класу — це ті, де порожнина повністю заповнює ембріон (рис. 315–320); бластоцисти 4 класу — бластоцисти з порожниною, більшою за початковий розмір ембріону та із стоншеною зоною пеллюцида (рис. 321–326); бластоцисти 5 класу або бластоцисти в стадії хетчингу — бластоцисти, де порожнина більша за початковий об'єм ембріону, а клітини ТЕ формують вклинення шляхом природного розривання ZP (рис. 327–332) та бластоцисти 6 класу або бластоцисти, що вилупились — бластоцисти, що повністю вийшли внаслідок природного розриву ZP (рис. 333–338). Останні два класи варто відрізнити від бластоцист, що вилуплюються через штучний допоміжний хетчинг чи після біопсії ембріону, коли розрив ZP достатньо великий, що дозволяє бластоцисті вилупитися раніше, задовго до повного розширення бластоцїлі. У бластоцист після допоміжного хетчингу може бути набагато менше клітин, ніж у тих, що мали природній хетчинг.





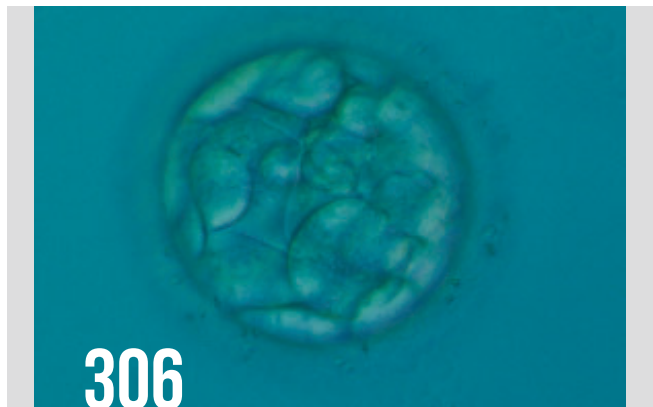
303. Дуже рання бластоциста з малою порожниною. Бластоцисту перенесли, проте, результат переносу невідомий.



304. Рання бластоциста з порожниною, що займає <50% об'єму ембріону. Варто відмітити раннє формування клітин трофектодерми, які вирівнюються відносно прозорої оболонки (ZP). Бластоцисту перенесли, отримано ектопічну вагітність.



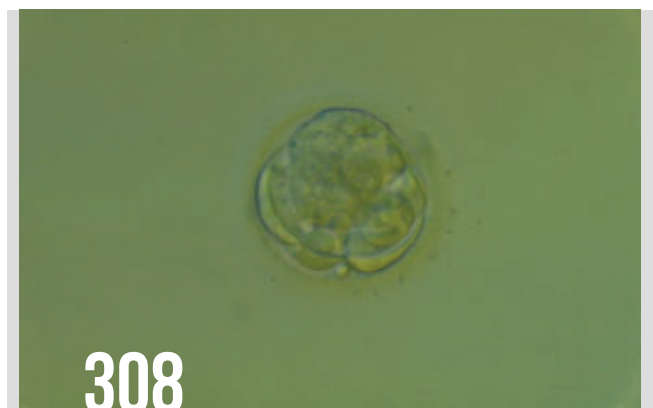
305. Дуже рання бластоциста з невеликою порожниною, розташованою посередині, її можна побачити в позиції на 12 годину при даному ракурсі. Є клітинні домішки, що не включені в формування ранньої бластоцисти, а знаходяться окремо в перивітеліновому просторі (PVS).



306. Рання бластоциста з порожниною, що займає <50% об'єму ембріону. Зверніть увагу на сплюснуті пластиноподібні клітини трофектодерми (TE), що покривають ліву половину порожнини при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, проте тест на вагітність негативний.



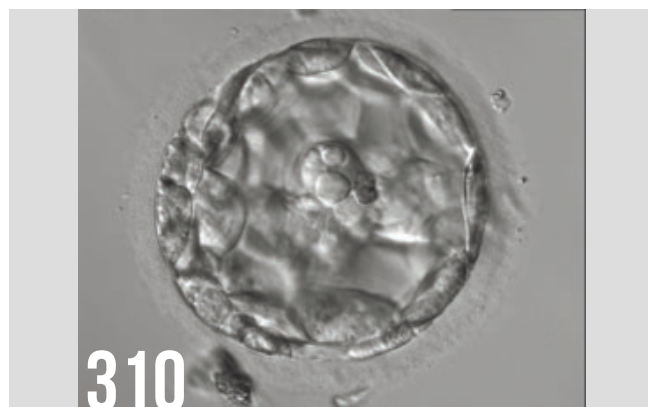
307. Рання бластоциста з порожниною, що займає <50% об'єму ембріону. Зверніть увагу на великі сплюснуті клітини трофектодерми, що покривають початкову порожнину бластоцілі та одиничний сперматозоїд, що міститься в прозорій оболонці ZP на 11 годину при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, проте результат переносу невідомий.



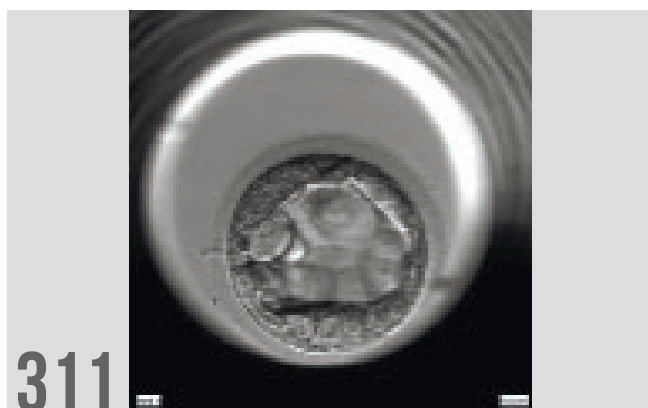
308. Рання бластоциста з порожниною, що починає формуватись. Зверніть увагу на раннє формування клітин трофектодерми, що для цієї стадії є надто великою за розміром, дві клітини розтягнені по лінії порожнини з 9 години до 3 години при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, проте вагітність не отримали.



309. Рання бластоциста з порожниною, яка чітко візуалізується, та займає половину об'єму ембріона. Бластоцисту перенесли, проте результат переносу невідомий.



310. Рання бластоциста з порожниною, що займає <50% об'єму ембріону. Весь об'єм ембріону залишається незмінним, ZP не тонка. Великі клітинні домішки не приймають участі в формуванні бластоцисти.



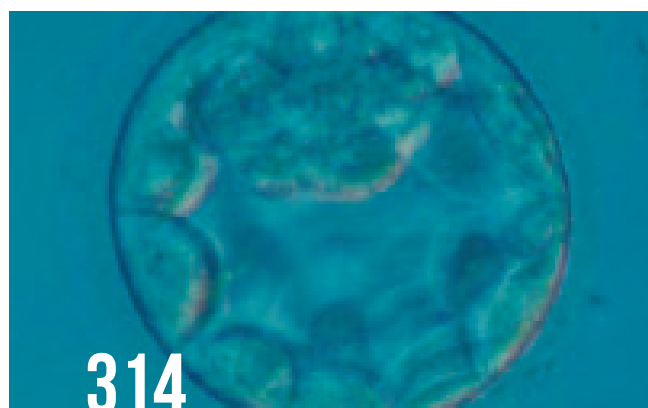
311. Рання бластоциста з порожниною, що займає <50% об'єму ембріону. На цій стадії клітини трофодерми дуже великі.



312. Рання бластоциста з порожниною, що займає <50% об'єму ембріону. Весь об'єм бластоцисти залишається незмінним, без стоншення ZP. Рання внутрішньоклітинна маса візуалізується з лівої сторони бластоцисти при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, тест на вагітність позитивний.



313. Рання бластоциста з порожниною, що займає <50% об'єму ембріону. Весь об'єм бластоцисти залишається незмінним, без стоншення ZP. Рання внутрішньоклітинна маса візуалізується біля основи бластоцисти при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, проте, вагітність не отримали.



314. Рання бластоциста з порожниною, що займає <50% об'єму ембріону. Весь об'єм бластоцисти залишається незмінним, без стоншення ZP. Рання внутрішньоклітинна маса візуалізується у позиції на 12 годину при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, отримали біохімічну вагітність.



315. Бластициста (клас 3:2:1) з порожниною, що займає весь об'єм ембріону. Рання внутрішньоклітинна маса візуалізується на 3 години при такому ракурсі. Бластицисту перенесли, проте результат переносу невідомий.



316. Бластициста (клас 3:1:1) з великою, внутрішньоклітинною масою грибоподібної форми на 10 годину при такому ракурсі. Внутрішньоклітинна маса складається з багатьох клітин, що дуже компактизовані. Бластицисту перенесли, отримали вагітність та пологи (здорова дівчинка).



317. Бластициста (клас 3:1:1) з компактною внутрішньоклітинною масою. Бластицисту перенесли, отримали вагітність та пологи (здоровий хлопчик).



318. Бластициста (клас 3:3:2), внутрішньоклітинна маса чітко не візуалізується, клітини трофектодерми великі та розтягнені на велику відстань відносно сусідньої клітини.



319. Бластициста (клас 3:1:1) з щільною внутрішньоклітинною масою, що чітко візуалізується на 10 годину при такому ракурсі. Клітини трофектодерми відрізняються за формою, проте, формують зв'язаний епітелій. Бластицисту перенесли, проте результат переносу невідомий.

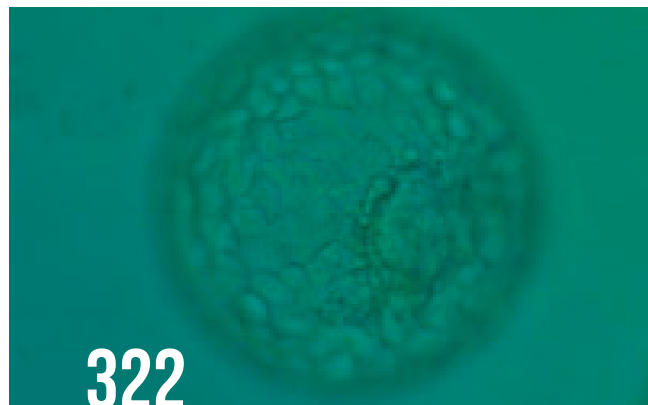


320. Бластициста (клас 3:1:1) з щільною, майже трикутною внутрішньоклітинною масою, що чітко візуалізується в основі бластоцисти при такому ракурсі. Бластицисту перенесли, проте вагітність не отримали.



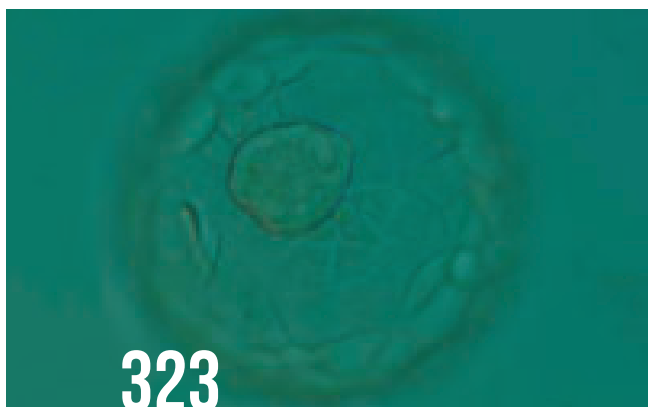
321

321. Експандована бластоциста (клас 4:1:1) гарної якості з великою внутрішньоклітинною масою грибоподібної форми. Бластоциста на цій стадії має більший об'єм, ніж ембріон, ZP тонка. Бластоцисту перенесли, проте вагітність не отримали.



322

322. Експандована бластоциста (клас 4:1:1), внутрішньоклітинна маса чітко візуалізується на 4 годину при такому ракурсі. Є багато маленьких клітин, що формують зв'язаний шар трофектодерми, що оточений збільшеною бластоциллю. ZP дуже тонка. Бластоцисту перенесли, проте результат переносу невідомий.



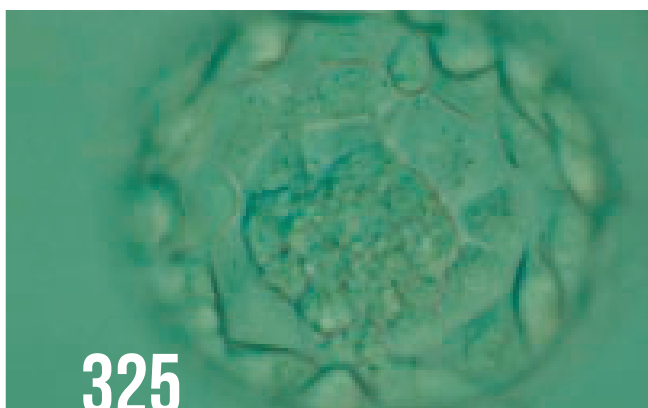
323

323. Експандована бластоциста (клас 4:1:1) з великою внутрішньоклітинною масою, що розташована в основі бластоцисти при такому ракурсі. Вона складається з багатьох клітин, що дуже тісно розташовані одна біля одної. Об'єм бластоцисти зараз більший, ніж первинний розмір ембріону, що спричиняє стоншення ZP. Бластоцисту перенесли, проте результат тесту невідомий.



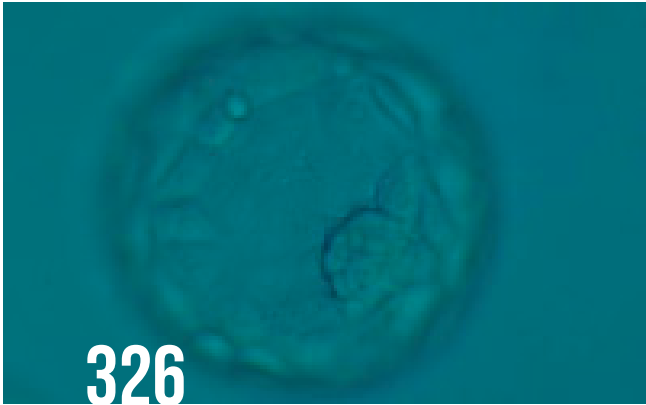
324

324. Експандована бластоциста (клас 4:1:1) з великою внутрішньоклітинною масою на 4 годину при такому ракурсі. Внутрішньоклітинна маса складається з багатьох клітин та дуже компактизована. Бластоциль зараз більша, ніж первинний об'єм ембріона, ZP дуже тонка. Бластоцисту перенесли, проте результат тесту невідомий.



325

325. Експандована бластоциста (клас 4:1:1) з великою внутрішньоклітинною масою біля основи бластоцисти при такому ракурсі. Клітин трофектодерми мало, вони формують зв'язаний епітелій, що оточує збільшену порожнину бластоцилі. ZP дуже тонка. Бластоцисту перенесли, тест на вагітність негативний.



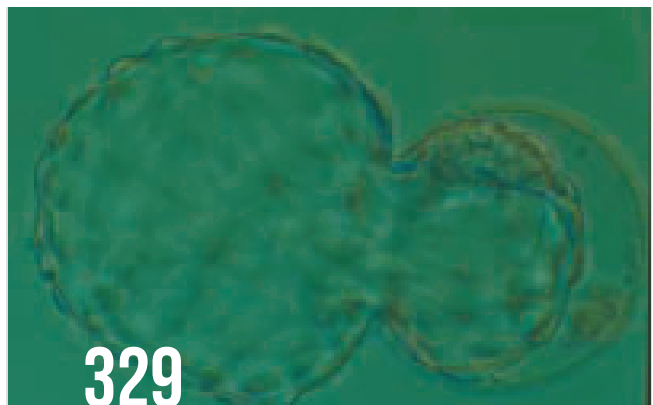
326. Експандована бластоциста (клас 4:1:1) з компактною внутрішньоклітинною масою на 4 годину при такому ракурсі. Об'єм бластоцисти зараз більший, ніж первинний розмір ембріону, що спричинює стоншення ZP. Бластоцисту перенесли, тест на вагітність негативний.



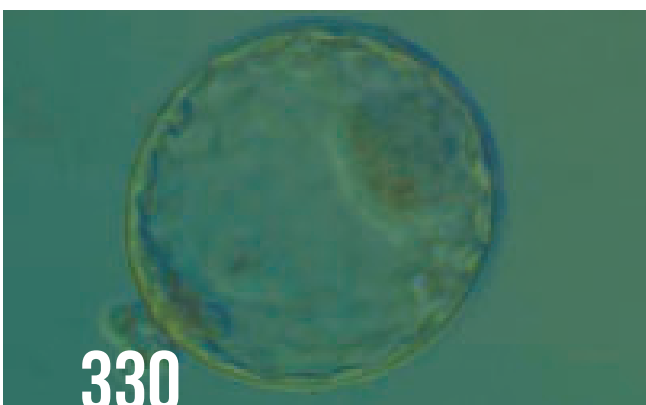
327. Бластоциста в стадії хетчингу (клас 5:2:1) з малою внутрішньоклітинною масою трикутної форми, що витягнута вздовж випуклих клітин трофектодерми на 1 годину при такому ракурсі. Клітин трофектодерми однакового розміру багато, вони вистеляють порожнину ZP тонка. Бластоцисту перенесли, проте результат тесту невідомий.



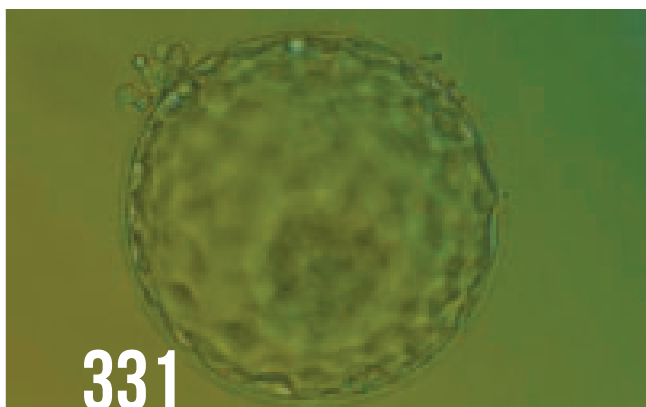
328. Бластоциста в стадії хетчингу (клас 5:1:1) з компактною великою внутрішньоклітинною масою на першу годину при такому ракурсі. Приблизно 25% бластоцисти вийшло із отвору в тонкій ZP на 8–10 годину при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, проте результат тесту невідомий.



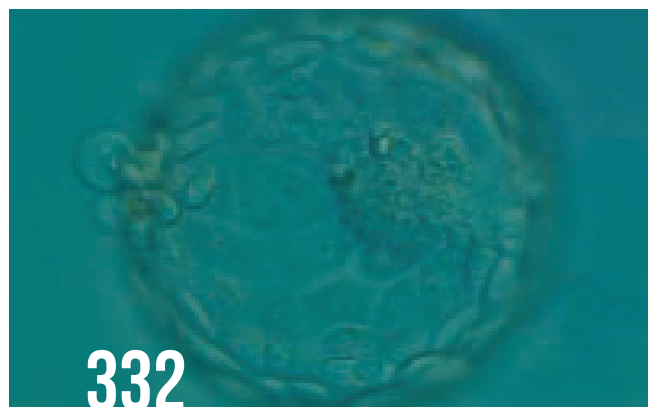
329. Бластоциста в стадії хетчингу (клас 5:1:1) з компактною великою внутрішньоклітинною масою хрестоподібної форми, вона розташована в межах ZP на 12 годину при такому ракурсі. Клітин трофектодерми багато, приблизно 75% бластоцисти вийшло із отвору в тонкій ZP на 8–10 годину при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, проте результат тесту невідомий.



330. Бластоциста в стадії хетчингу (клас 5:1:1) з компактною великою внутрішньоклітинною масою на 2 годину при такому ракурсі. Клітин трофектодерми багато, вони однакового розміру, вистеляють поверхню порожнини. Декілька клітин трофектодерми бластоцисти вийшло із отвору в тонкій ZP на 8 годину при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, тест позитивний.



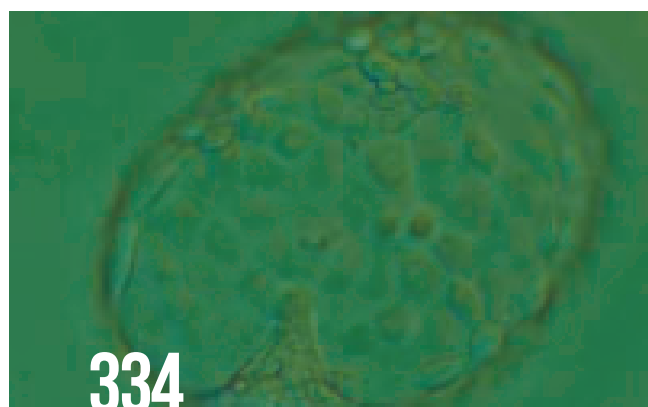
331. Бластициста в стадії хетчінгу (клас 5:1:1) з компактною великою внутрішньоклітинною масою в основі бластицисти на 5 годину при такому ракурсі. Клітин трофектодерми багато, вони формують зв'язаний епітелій. Декілька клітин трофектодерми бластицисти вийшло із отвору в тонкій ЗР на 11 годину при такому ракурсі. Бластицисту перенесли, тест позитивний.



332. Бластициста в стадії хетчінгу (клас 5:1:1) з компактною, великою, дещо гранульованою внутрішньоклітинною масою на 3 годину при такому ракурсі. Клітин трофектодерми багато, вони формують зв'язаний епітелій. При такому ракурсі декілька клітин трофектодерми бластицисти вийшло із отвору в тонкій ЗР на 9 годину. Бластицисту перенесли, проте результат тесту невідомий.



333. Бластициста в стадії хетчінгу (клас 6:1:1) повністю без ЗР. Внутрішньоклітинна маса компактна, велика, знаходиться в основі бластицисти на 4 годину при такому ракурсі. Бластициста збільшилась вдвічі, порівняно з первинними розмірами ембріона. Бластицисту перенесли, тест на вагітність негативний.



334. Бластициста в стадії хетчінгу (клас 6:1:1) повністю без ЗР, внутрішньоклітинна маса компактна і розташована на 6 годину при такому ракурсі. Вона приєднана до трофектодерми широким трикутним містком. Бластициста збільшилась вдвічі. Бластицисту перенесли, проте результат тесту невідомий.



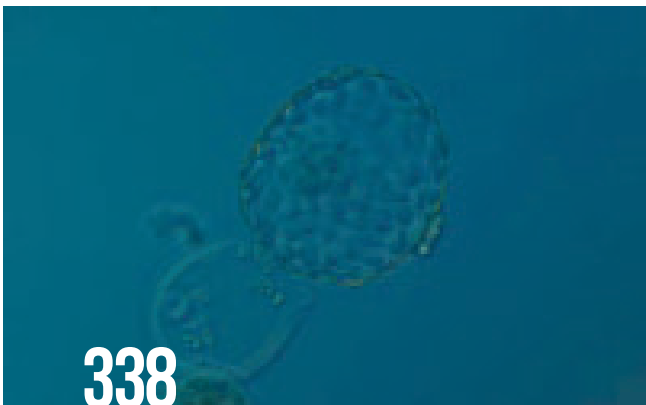
335. Бластициста в стадії хетчінгу (клас 6:1:1) повністю без ЗР, внутрішньоклітинна маса знаходиться по центру в основі бластицисти, приєднана до трофектодерми декількома містками. Клітин трофектодерми однакового розміру багато, вони формують зв'язаний епітелій. Бластициста збільшилась вдвічі.



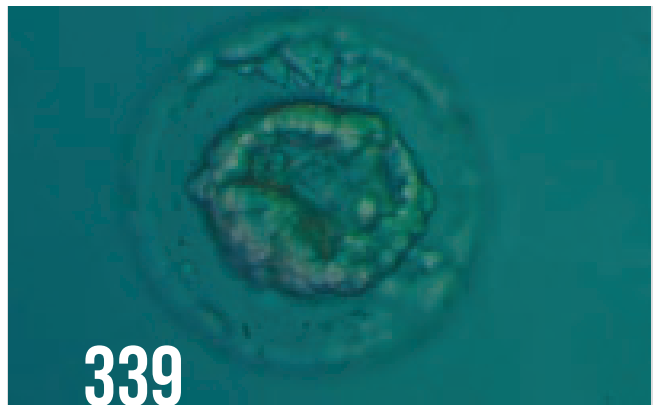
336. Бластициста в стадії хетчингу (клас 6:1:1) повністю без ZP. Декілька клітинних залишків візуалізуються позаду порожньої ZP. Внутрішньоклітинна маса компактна та велика, знаходиться в основі бластоцисти. Клітини трофектодерми формують зв'язаний епітелій. При такому ракурсі можливо побачити, що діаметр бластоцисти виріс, порівняно з ембріоном.



337. Бластициста в стадії хетчингу (клас 6:1:1) повністю без ZP. Отвір в ZP великий. У внутрішньоклітинній масі та трофектодермі багато клітин, бластоциста дещо колапсувалась та видається більш щільною. Бластицисту перенесли, проте результат тесту невідомий.



338. Бластициста в стадії хетчингу (клас 6:1:1) повністю без ZP. Внутрішньоклітинна маса дещо поза фокусом при такому ракурсі, складається з багатьох клітин. Клітин трофектодерми багато, вони формують зв'язаний епітелій. В ZP є клітинні домішки. Бластицисту перенесли, проте результат тесту невідомий.



339. Колапсована бластоциста, судячи з товщини ZP, принаймні 3 класу. Однак внутрішньоклітинну масу та клітини трофектодерми важно оцінювати. Бластицисту перенесли, результат тесту невідомий.



340. Колапсована бластоциста, судячи з товщини ZP, принаймні 3 класу. При такому ракурсі внутрішньоклітинна маса візуалізується на 3 годину та класифікується як 1 клас. В PVS є екстраембріональний клітинний залишок. Бластицисту перенесли, тест на вагітність негативний.



341. Колапсована бластоциста на стадії хетчінгу (клас 5), чітко візуалізується місце хетчінгу у отворі ZP на 11 годину при такому ракурсі. Візуалізується екстраембріональні клітинні домішки у порожнині та поза бластоцистою в PVS. Внутрішньоклітинну масу та клітини трофектодерми оцінити важко. Бластоцисту перенесли, тест на вагітність негативний.

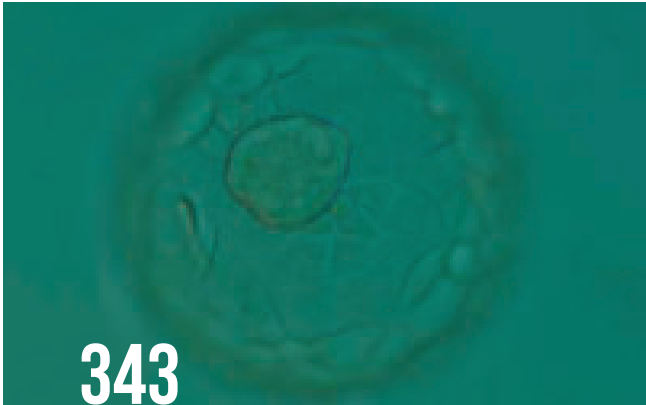
Декілька дослідників показали важливість оцінки експансії бластоцисти (Dokras et al., 1993; Gardner et al., 2000; Shapiro et al., 2008; Ahlström et al., 2011). Проте, варто пам'ятати, що традиційно ембріологи обирають для переносу найбільш розвинену бластоцисту з високим рівнем експансії, якщо така є. Згідно останніх даних, людські ембріони жіночої статі проходять стан інактивації X- хромосоми з 8 клітинної стадії дроблення до стадії бластоцисти, це потребує часу. Таким чином, жіночі ембріони можуть бути менш експандованими, ніж ембріони чоловічої статі (van den Berg et al., 2009).

В. МОРФОЛОГІЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ МАСИ

Як тільки бластоциста досягає стадії експансії, можна чітко побачити різницю між двома сформованими клітинним популяціями. Зовнішні клітини бластоцисти, що утворюють власне структуру бластоцисти, називаються клітинами трофектодерми. Клітини, розташовані всередині бластоцілі, що часто утворюють клітинні скупчення на полюсі бластоцисти, називаються внутрішньоклітинною масою (ВКМ). Саме ВКМ стане власне ембріоном та його екстраембріональними структурами. Морфологічно ВКМ може бути як дуже великою з щільно розташованими клітинами, так і майже відсутньою з вільно розташованими клітинами. Відповідно до морфології ВКМ поділяють на три класи (Gardner and Schoolcraft, 1999; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Найкраща категорія (1) ВКМ має багато клітин, вони тісно зв'язані між собою (рис. 342–345), середня категорія ВКМ (2) складається з декількох клітин, які згруповані вільно (рис. 346–349), та найгірша категорія (3) — ВКМ має в своєму складі дуже мало клітин, між ними немає тісних зв'язків (рис. 350–353). Кількість клітин, що формують ВКМ, може змінюватись, власне як і морфологія клітин всередині ВКМ. Дані деяких авторів показують позитивне співвідношення між морфологією ВКМ та клінічним результатом, є припущення, що чим більша ВКМ, тим вищими є шанси імплантації (Balaban et al., 2000; Richter et al., 2001).



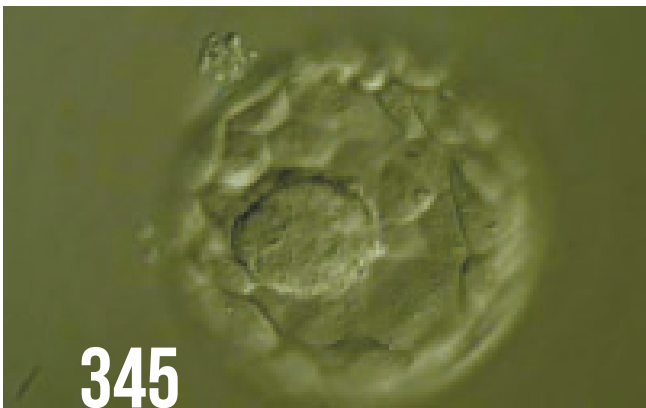
342. Експандована бластоциста (клас 4:1:1) з великою ВКМ на 4 годину при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, результат тесту невідомий.



343. Експандована бластоциста (клас 4:1:1) з великою ВКМ в основі бластоцисти при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, результат тесту невідомий.



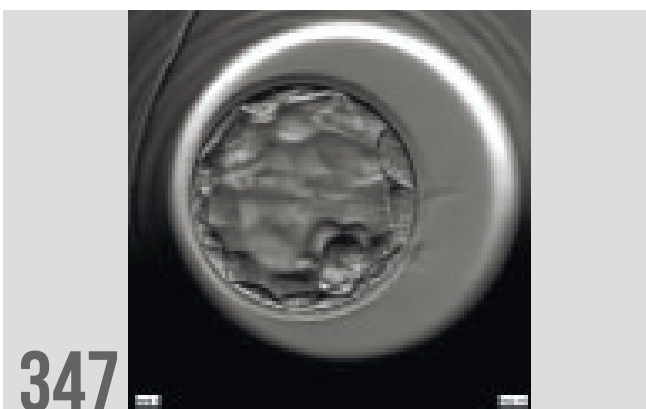
344. Бластоциста (клас 3:1:1) з дуже великою ВКМ, грибоподібної форми, розташована на 10 годину при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, отримано вагітність та пологи здоровою дівчинкою.



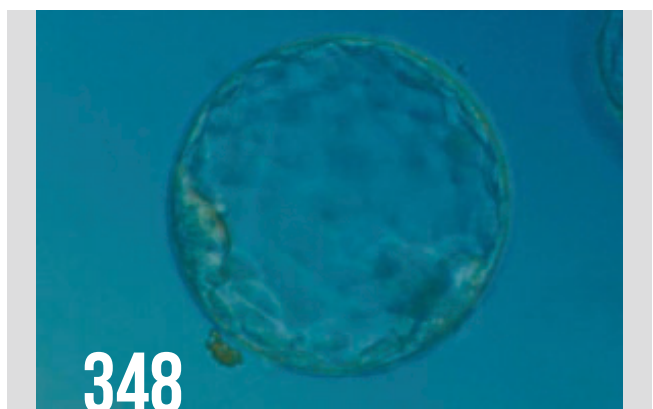
345. Бластоциста, що вилуплюється (клас 5:1:1), з великою ВКМ в основі бластоцисти при такому ракурсі. ВКМ складається з багатьох клітин, що тісно зв'язані між собою. Бластоцисту перенесли, результат тесту невідомий.



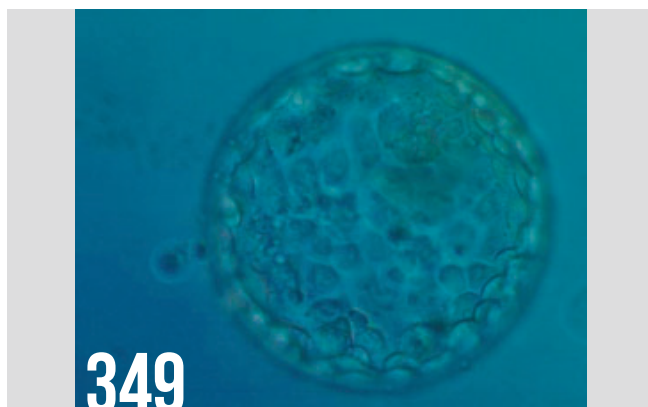
346. Бластоциста (клас 3:2:1) з компактизованою ВКМ на 11 годину при такому ракурсі. ВКМ малого розміру відносно діаметру бластоцисти, складається з декількох клітин. Бластоцисту перенесли, результат тесту негативний.



347. Бластоциста (клас 3:2:1) з компактизованою ВКМ на 5 годину при такому ракурсі. ВКМ компактизована, дуже мала, складається з декількох клітин, розташована на 11 годину при такому ракурсі.



348. Бластоциста, що вилуплюється (клас 5:2:1), з компактизованою ВКМ на 8 годину при такому ракурсі. ВКМ дуже мала, складається з декількох клітин, відповідних до розміру бластоцисти. Бластоцисту перенесли, результат тесту невідомий.



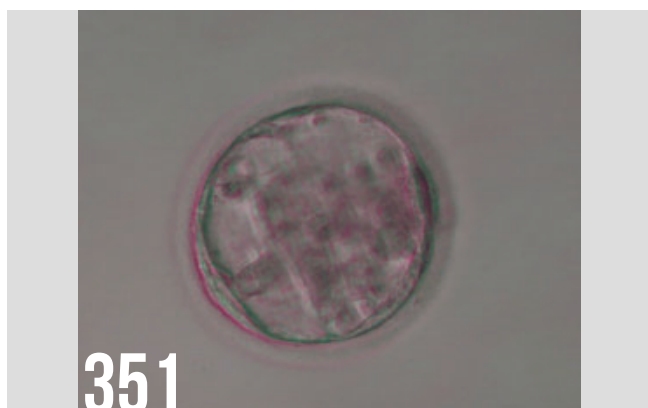
349

349. Бластициста, що вилуплюється (клас 5:2:1), з компакткованою ВКМ на 1 годину при такому ракурсі. ВКМ дуже мала, складається з декількох клітин, що відповідають розміру бластоцисти. Візуалізуються малі, темні, дегенеровані центри в клітинах трофектодерми. Бластицисту перенесли, результат тесту негативний.



350

350. Бластициста (клас 3:3:2) без чіткої візуалізації ВКМ, клітини трофектодерми достатньо великі та розтягнені.



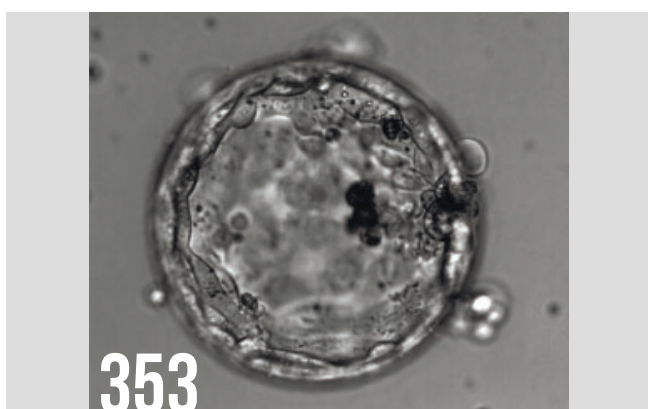
351

351. Бластициста (клас 3:3:3) без чіткої візуалізації ВКМ та з розсіяними клітинами трофектодерми, які не формують зв'язаний епітелій.



352

352. Експандована бластоциста (клас 4:3:3) без чіткої візуалізації ВКМ. Клітини трофектодерми розсіяні, вони не формують зв'язаний епітелій.



353

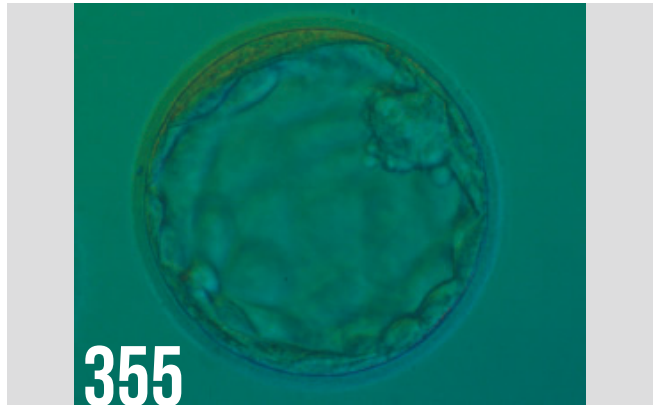
353. Бластициста, що вилуплюється (клас 4:3:1), без чіткої візуалізації ВКМ, проте, трофектодерма складається з багатьох клітин, формуючи зв'язаний епітелій. Візуалізуються темні, дегенеровані клітини на 3 годину при такому ракурсі.

Форма ВКМ може бути досить різноманітною за зовнішнім виглядом. Було повідомлено, що оптимальною формою ВКМ стосовно потенціалу імплантації є більш овальні, ніж більш круглі або більш витягнуті форми (Richter et al., 2001). Форма ВКМ могла б у цьому випадку відобразити кількість клітин, що її формують. Цей Атлас виявляє деяку подальшу мінливість форми ВКМ і виділяє грибоподібну форму (рис. 354–356), зірчастоподібну форму (рис. 357–359) та форму півмісяця (рис. 360–362), значення варіації форми для імплантаційного потенціалу невідоме.



354

354. Експандована бластоциста хорошої якості (клас 4:1:1) з великою ВКМ грибоподібної форми. Візуалізуються цитоплазматичні веретена, що простягаються від ВКМ до трофектодерми. Бластоцисту перенесли, тест позитивний.



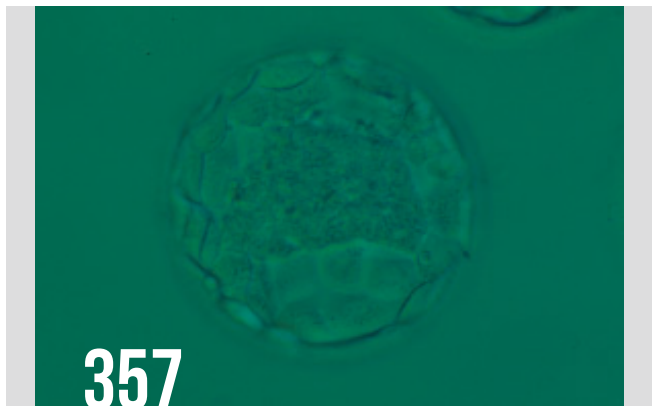
355

355. Експандована бластоциста (клас 4:2:1) з маленькою компактизованою ВКМ, грибоподібної форми. Візуалізуються клітинні домішки між ЗР та трофектодермою на 10–12 годину. Бластоцисту перенесли, результат тесту невідомий.



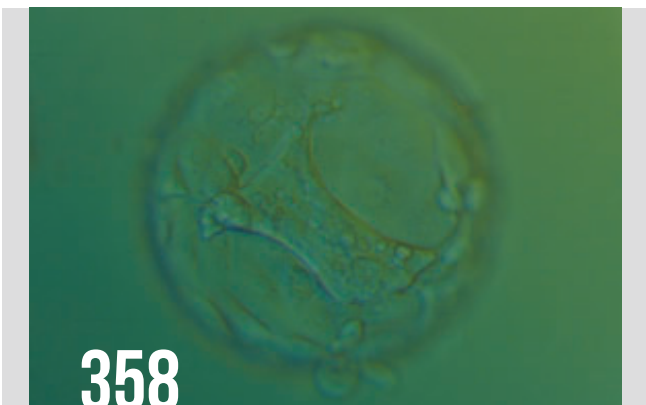
356

356. Бластоциста (клас 3:1:1) з дуже великою ВКМ, грибоподібної форми, розташована на 10 годину при такому ракурсі, складається з багатьох клітин, що щільно розташовані одна до одної. Бластоцисту перенесли, були пологи здоровою дівчинкою.



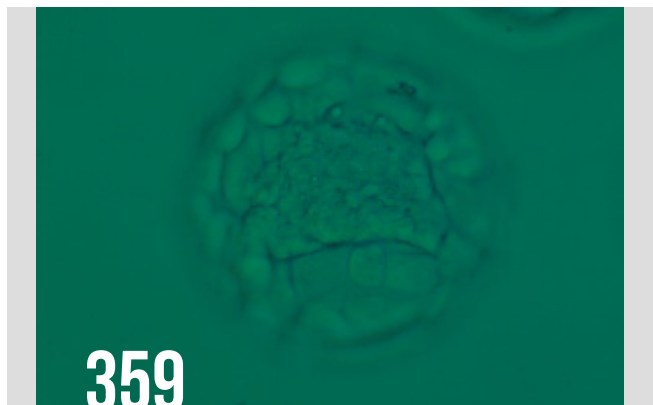
357

357. Експандована бластоциста (клас 4:1:1) з великою зіркоподібною ВКМ. Бластоцисту перенесли, тест позитивний.



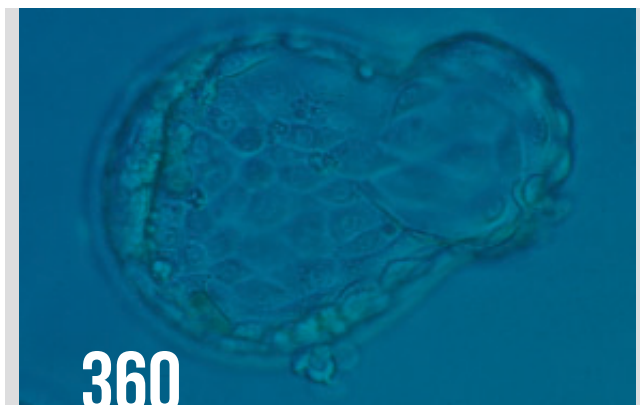
358

358. Бластоциста, що вилуплюється (клас 5:1:2), з великою зіркоподібною ВКМ в основі бластоцисти при такому ракурсі. Здається, що ВКМ поєднана з клітинами трофектодерми короткими трикутними цитоплазматичними веретенами або містками. Бластоцисту перенесли, проте тест на вагітність негативний.

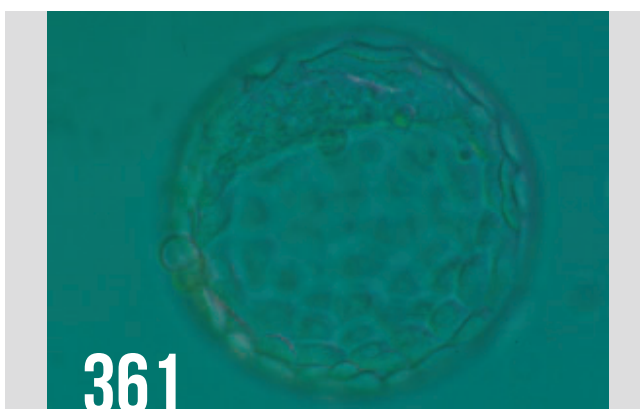


359

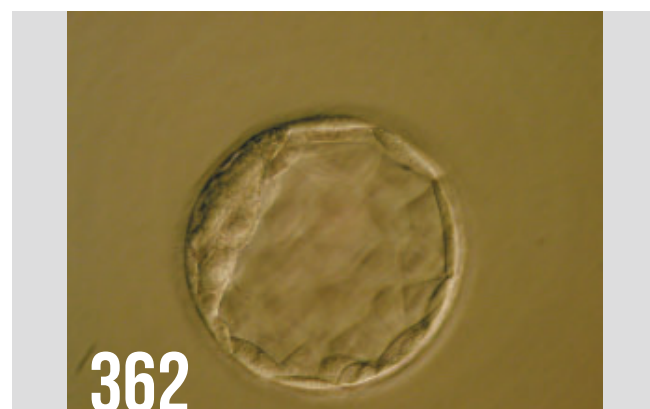
359. Експандована бластоциста (клас 4:1:1) з великою зіркоподібною ВКМ в основі бластоцисти при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, тест позитивний.



360. Бластициста, що вилуплюється (клас 5:1:1), з компактизованою ВКМ, хрестоподібної форми, що тісно прилягає до трофектодерми на 9 годину при такому ракурсі. На 3 годину трофектодерма вийшла через отвір в ZP, є також ще малий отвір на 6 годину. Бластициста розвивалася після запліднення методом ICSI, таким чином, отвір на 6 годину може бути результатом проколу з цієї сторони. Тест на вагітність негативний.



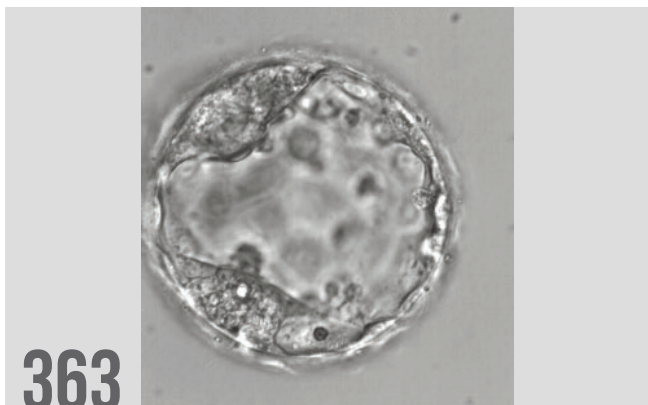
361. Бластициста, що вилуплюється (клас 5:1:1), з великою ВКМ, хрестоподібної форми на 12 годину при такому ракурсі. Бластицисту перенесли, тест на вагітність позитивний.



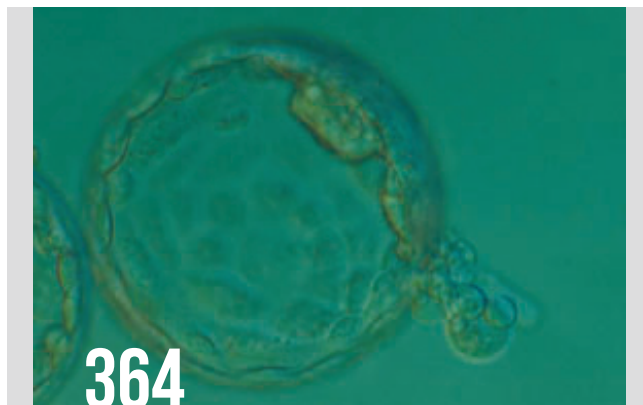
362. Бластициста (клас 3:1:1) з ВКМ хрестоподібної форми на 12 годину при такому ракурсі. Результат переносу цієї бластоцисти невідомий.

Є поодинокі випадки наявності двох окремих ВКМ у бластоцисті. Chida (2000) повідомляє про частоту подвійної ВКМ у 3,1% для бластоцист мишей, культивованих *in vitro*. З'ясували, що частота подвійної ВКМ була значно вищою у бластоцист, запліднених *in vitro*, ніж у бластоцист, запліднених *in vivo* (0,6%). Таким чином є припущення, що умови запліднення *in vitro* можуть впливати на частоту подвійної ВКМ, і як наслідок на частоту випадків монозиготних близнюків.

Meintjes et al. (2001) повідомляють про випадки отримання монозиготних близнюків після переносу бластоцисти з двома ВКМ після застосування IVF. Насправді, це була трійня, отримана в результаті переносу 2 бластоцист на 5 добу. Монозиготна вагітність була біхоріальною, біамніотичною, з роздвоєнням трофектодерми. Payne et al. (2007) в 2007 році на ESHRE представив доповідь, в якій продемонстрував зйомку розвитку кріоконсервованих-розморожених ембріонів до 5 доби. Серед 26 бластоцист у 2 була подвійна ВКМ. Повідається про випадки монозиготних близнюків після переносу бластоцисти з двома ВКМ навіть на ранній стадії бластоцисти. Важливо, що друга ВКМ розвинулась після ектопічної адгезії клітин ВКМ у клітини трофектодерми внаслідок раннього колапсу порожнини бластоцисти.



363. Експандована бластоциста (клас 4:1:1), чітко візуалізуються дві ВКМ на 7 та 11 годину при такому ракурсі. Обидві нормального розміру та компактизовані.

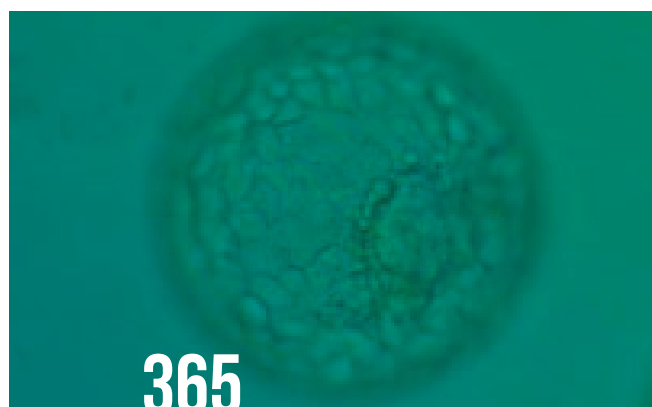


364. Бластоциста, що вилуплюється (клас 5:1:1) з двома окремими ВКМ, що зв'язані між собою на 2 годину при такому ракурсі. Одна ВКМ є меншою, ніж інша, та починає витікати з отвору у ЗР на 4 годину разом з декількома клітинами трофектодерми. Бластоцисту перенесли, тест на вагітність негативний.

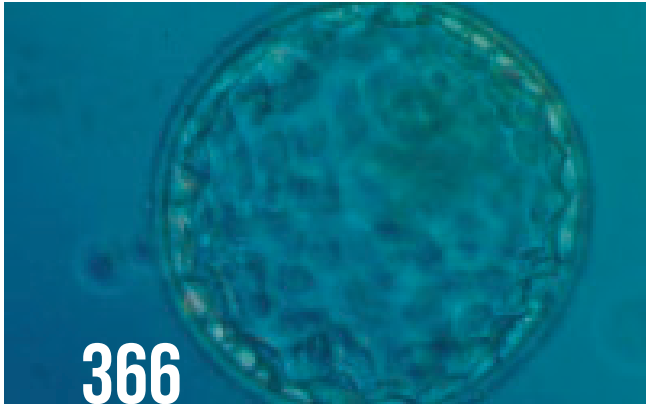
С. МОРФОЛОГІЯ ТРОФЕКТОДЕРМИ (ТЕ)

Клітини трофектодерми легко відрізнити від внутрішньоклітинної маси тоді, коли бластоциста починає експандуватися (наприклад, експансія класу 3 або вище). Роль клітин ТЕ на ранніх стадіях бластоцисти до кінця невідома, проте їх роль у створенні рідини, що наповнює бластоциль, може бути ключовим параметром для диференціації внутрішньоклітинної маси. Значення клітин ТЕ краще зрозуміле під час та після імплантації, тому що вони відіграють важливу роль в апозиції, адгезії та інвазії ендометрія. Таким чином вони дозволяють бластоцисті прикріпитися в порожнині матки. Клітини ТЕ також продукують деякі молекулярні фактори, що допомагають в процесі імплантації (Arlin, 2000). Без правильного функціонування клітин ТЕ, ембріон би залишився в межах ЗР, тому що ці клітини беруть активну участь у розриві ЗР (Sathananthan et al., 2003). Кінцева доля клітин ТЕ — стати екстраембріональними мембранами плоду, а також плацентою.

Традиційно, клітини ТЕ поділяють, подібно до клітин внутрішньоклітинної маси, тобто за кількістю та зв'язком, на три класи (1–3). Найкраща ТЕ — категорії 1 — має багато клітин, які формують зв'язаний епітелій (рис. 365–368), середній клас ТЕ — категорія 2 — складається з невеликої кількості клітин, що формують вільний епітелій (рис. 369–372) та найгірша категорія ТЕ — категорія 3 — клітин дуже мало, клітини великі, вони не можуть сформувати зв'язаний епітелій (рис. 373–376). Оцінка клітин ТЕ згідно деяких публікацій має зв'язок з імплантацією (Zaninovic et al., 2001; Ahlström et al., 2011), інші публікації не відмічають такого зв'язку (Richter et al., 2001).

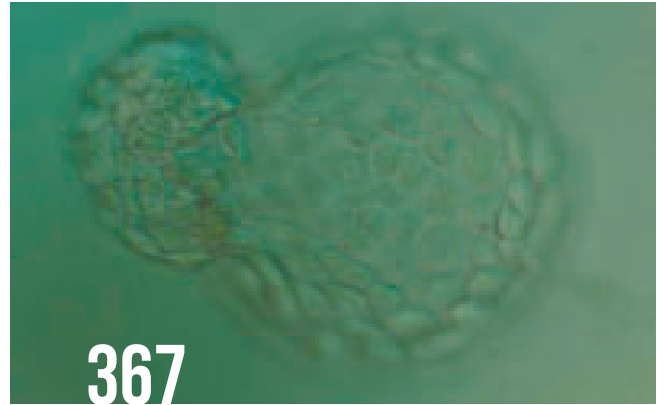


365. Експандована бластоциста (клас 4:1:1) з багатьма клітинами однакового розміру, що формують зв'язану ТЕ, яка оточує збільшену порожнину. ВКМ (внутрішньоклітинна маса) чітко візуалізується на 4 годину при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, проте результат невідомий.



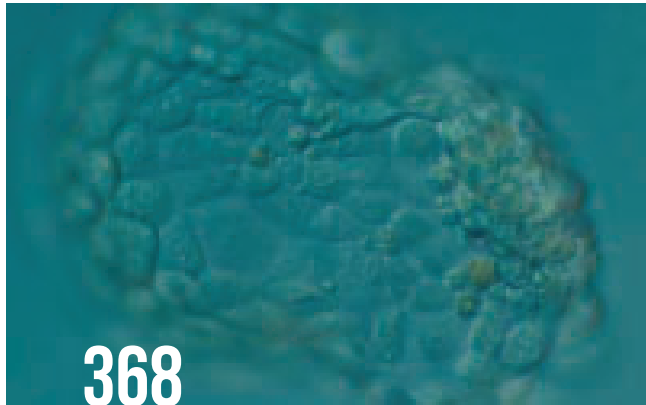
366

366. Експандована бластоциста на стадії хетчингу (клас 5:1:1) з багатьма клітинами, що формують зв'язаний епітелій. При такому ракурсі ВКМ чітко не візуалізується. Бластоцисту перенесли, тест на вагітність негативний.



367

367. Бластоциста на стадії хетчингу (клас 5:1:1) з багатьма клітинами, що формують зв'язаний епітелій. ВКМ виходить з отвору у ЗР на 10 годину при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, тест на вагітність негативний.



368

368. Бластоциста на стадії хетчингу (клас 5:1:1) з багатьма клітинами. Деякі з них різняться за розміром, вони формують зв'язаний епітелій. Бластоцисту перенесли, тест на вагітність негативний.



369

369. Бластоциста (клас 3:3:2) з клітинами ТЕ, що містяться великого розміру та дуже розтягнуті. ВКМ не візуалізується.



370

370. Бластоциста на стадії хетчингу (клас 5:1:2) з декількома клітинами ТЕ, що формують вільний зв'язаний епітелій, при такому ракурсі ВКМ грибоподібної форми візуалізується на 12 годину.

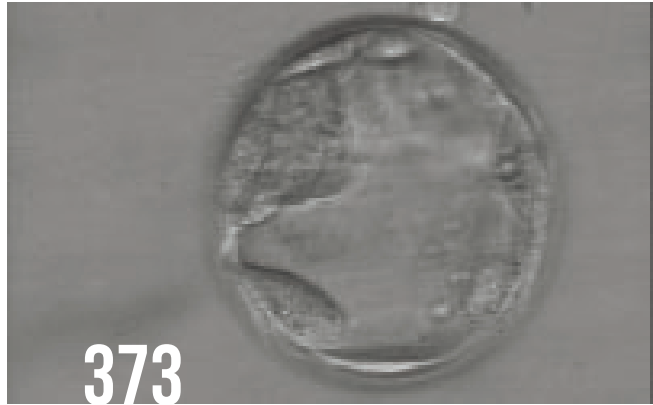


371

371. Бластоциста на стадії хетчингу (клас 5:1:2). Клітини ТЕ різняться за розміром. Деякі з них дуже великі за розміром та формують вільний епітелій. Візуалізується ВКМ зіркоподібної форми на 8 годину при такому ракурсі. Бластоцисту перенесли, тест на вагітність негативний.



372. Експандована бластоциста (клас 4:1:2). Клітини ТЕ різняться за розміром, деякі з них дуже великі за розміром, особливо по краю бластоцисти, де клітини розтягнуті. Бластоцисту перенесли, проте результат невідомий.



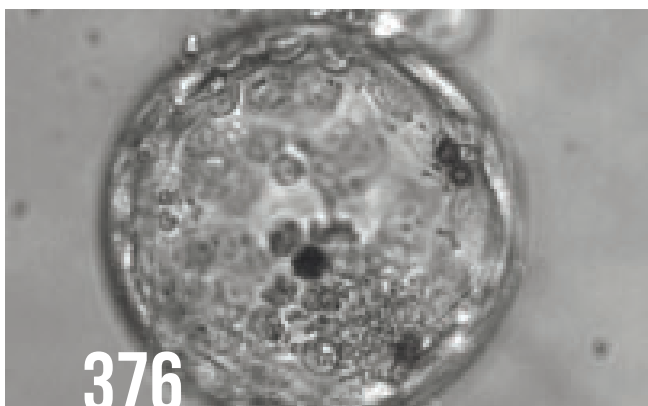
373. Експандована бластоциста на стадії хетчингу (клас 5:1:3) з дуже нещільною ТЕ, що не утворює зв'язаний епітелій. ВКМ візуалізується на 10 годину при такому ракурсі.



374. Бластоциста (клас 3:3:3) з нещільною ТЕ, що не утворює зв'язаний епітелій. ВКМ не візуалізується.



375. Експандована бластоциста (клас 4:3:3) з нещільною ТЕ, що не утворює зв'язаний епітелій. ВКМ ледь візуалізується, не дивлячись на експансію порожнини бластоцисти.

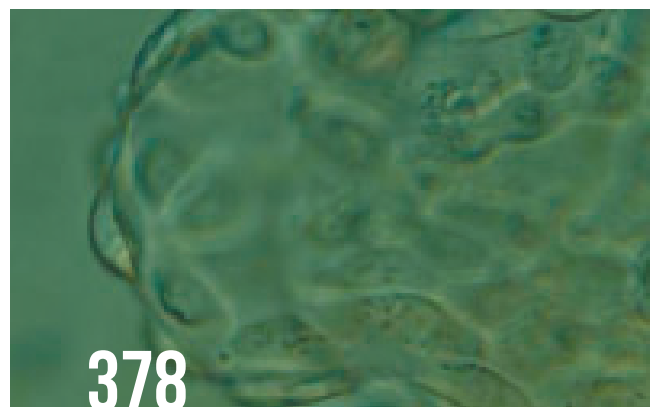


376. Бластоциста на стадії хетчингу (клас 5:3:3). ТЕ різниться за розміром та не утворює зв'язаний епітелій. Декілька вільних зв'язаних клітин ВКМ можна побачити на 5 годину при такому ракурсі. В бластоцисті є декілька темних дегенерованих ділянок.

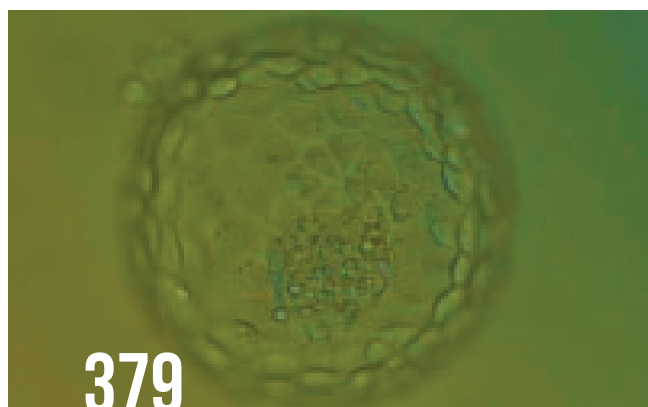
Fong et al. (2001) описує детально ультраструктурні ознаки клітин, щоб відрізнити ті що вилупилися природно, від тих, які вилупилися за допомогою ферментів. Не відмічено різниці між ультраструктурним виглядом клітин ТЕ після дії ферментів: зовнішній шар тісний, присутні адгезивні з'єднання, десмосоми, нексус, мікрворсинки, мітохондрії (від овальних до трубчастих) з добре розвиненими кристами, які є типовими для бластоцист. Груба ендоплазматична сіточка, комплекс Гольджі, поодинокі центріолі, лізосоми, мультивезикулярні тільця та сферичні ліпідні кульки візуалізуються в багатьох клітинах. Можна побачити темні гранули в багатьох клітинах ТЕ під світлом мікроскопа, що очевидно є ліпідними кульками (рис. 377–379).



377. Експандована бластоциста (клас 4:1:1). Зверніть увагу на декілька темних гранул у більшості клітин ТЕ. В клітинах ВКМ є декілька фрагментів. Бластоцисту перенесли, тест негативний.



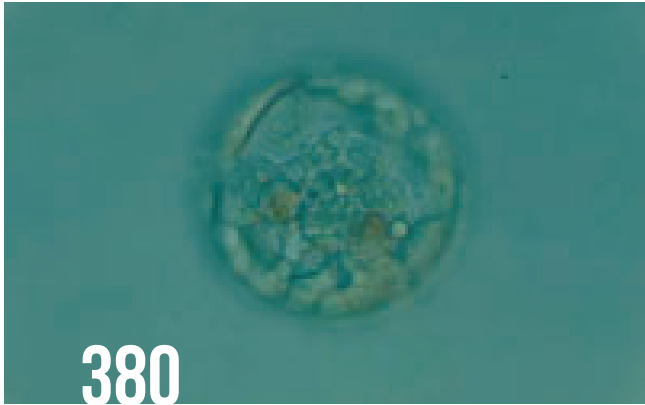
378. Бластоциста в стадії хетчингу (клас 5:1:1), при значному збільшенні видно, що клітини ТЕ виходять за межі. Бластоцисту перенесли, результат невідомий.



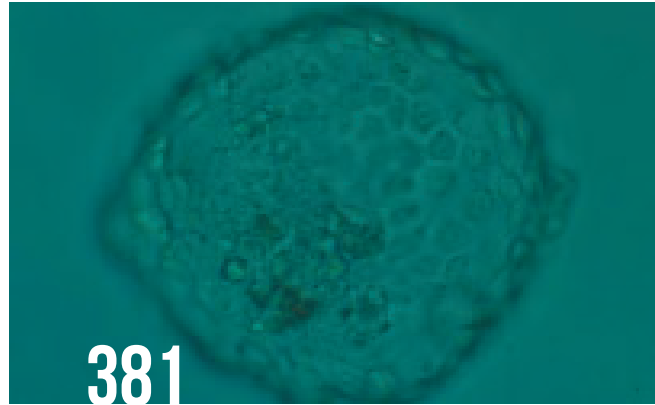
379. Бластоциста в стадії хетчингу (клас 5:1:1), багато клітин ТЕ мають темні гранули. Деякі фрагменти нагадують компактнізовані клітини ВКМ. Бластоцисту перенесли, тест позитивний.

Д. КЛІТИННА ДЕГЕНЕРАЦІЯ БЛАСТОЦИСТ

Смерть клітини може наступити внаслідок некрозу або апоптозу — двох процесів із двома різними морфологічними ознаками та значенням. Некроз — це набухання клітин та розрив мембрани, що викликає незворотне пошкодження (Wyllie, 1980). Смерть клітини, що викликана апоптозом, характеризується усиханням клітини та включає в себе агрегацію нуклеарного хроматину, конденсацію цитоплазми та появу нуклеарних та цитоплазматичних мембран (рис. 380–382). Ядро стає фрагментованим, клітина формує пухирці та фрагменти в апоптичні тіла (Hardy 1997; 1999).



380. Бластициста (клас 3:1:1) з компактною ВКМ в основі бластоцисти, що нагадує декілька гранульованих клітинних фрагментів та двома темними ділянками дегенерації клітини. Клітини ТЕ видаються здоровими та формують зв'язаний епітелій. Бластицисту перенесли, проте вагітності не отримали.



381. Бластициста на стадії хетчингу (клас 6:1:1) з багатьма клітинами в ТЕ, що утворюють зв'язаний епітелій. Багато з клітин ТЕ мають темні гранули. ВКМ візуалізується не чітко при такому ракурсі, має декілька дегенованих ділянок (темні клітини), що пов'язані з ВКМ та полярною ТЕ. Бластицисту перенесли, тест позитивний.



382. Дегенована бластициста поганої якості, більшість клітин мають темні дегенеративні зміни.

Hardy et al. (1989) продемонстрували шляхом диференційного маркування ядер ТЕ та ВКМ у надлишкових людських бластицистах, що відсоток загибелі клітин був подібним як в ВКМ, так і в ТЕ-клітинах і збільшувався при культивуванні бластицистів до 7-го дня. Індекс мертвих клітин був <10% серед бластицист гарної якості 5 та 6 доби, проте був значно підвищеним серед морфологічно ненормальних і поліспермічних (ті, що запліднені більш ніж одним спермієм — прим. перекладача) бластицист 6-го дня до 27,0 та 38,5% відповідно. Мертві клітини в бластицисті можуть розчинитись шляхом фагоцитозу.

Ізольовані ділянки дегенерації варто відрізнити від загальних дегенеративних змін всередині бластицисти, як описано згідно класифікації BG3I Dokras et al. (1993; рис. 382). Такі бластицисти дуже поганої якості продовжують подальшу дегенерацію та не мають жодного потенціалу до імплантації та розвитку.

Клітини, що зупинилися у розвитку, можуть з'явитись в будь-який проміжок часу на протязі преімплантаційного періоду, часто виключені з процесу формування бластицисти, зосереджуються в перивітеліновому просторі (PVS) і можуть спостерігатися в бластицисті, що продовжує розвиватися, між бластицистою і зоною пеллюцида (ZP) (рис. 383–385). Іноді саме такі клітини, або, ймовірно, клітини, що зупинили свій розвиток пізніше, залишаються всередині бластицисти під час її формування, і потрапляють в бластоциль (рис. 386–388). Продemonстровано, що виключені клітини мають поганий нексус з ембріоном (Hardy et al., 1996). Було висунуто гіпотезу, що наявність ізольованих клітин у бластицистах у той час, коли фагоцитоз можливо вказує на відсутність маркера клітинної поверхні, що сприяє їх поглинання сусідніми клітинами (Hardy, 1997).



383

383. Бластициста (клас 3:1:2) з великою ВКМ грибоподібної форми на 1 годину при такому ракурсі. На позиції з 6 до 3 години візуалізується значна кількість клітинного залишку, малого та великого, між муральною ТЕ та ЗР.



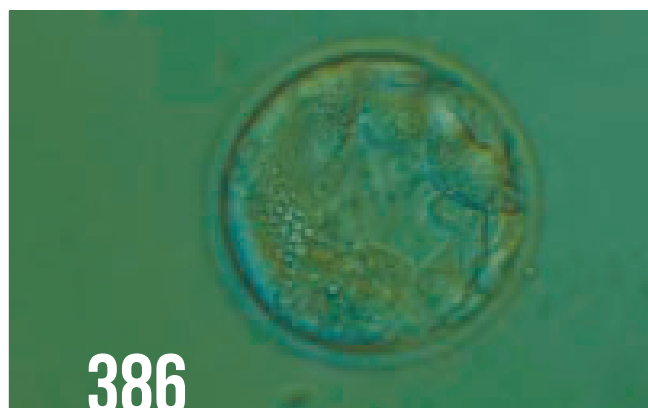
384

384. Бластициста на стадії хетчингу, що колапсувалась у щільну масу клітин, тому важко оцінити клітини ВКМ та ТЕ. Декілька клітин, що не беруть участь у формуванні бластоцисти, можна побачити у PVS.



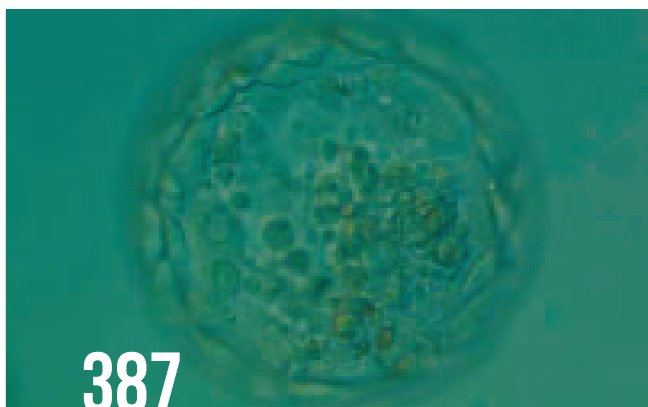
385

385. Рання бластоциста з великою порожниною. Відзначається значний клітинний дебрис, ізолюваний в PVS, який не бере участі в формуванні бластоцисти.



386

386. Рання бластоциста (клас 2), ВКМ ще не чітко візуалізується. Багато клітин ТЕ мають темні гранули. Є багато малих фрагментів, які краще побачити в позиції між 8 та 9 годинами при такому ракурсі. Бластицисту перенесли, результат невідомий.



387

387. Експандована бластоциста (клас 4:1:1). ВКМ ще не чітко візуалізується при такому ракурсі. Клітини ТЕ відрізняються за розміром, проте формують зв'язаний епітелій. В середині порожнини є декілька фрагментів (малих та середніх), деякі з них темного кольору. Бластицисту перенесли, тест негативний.



388

388. Бластициста на стадії хетчингу (клас 5:1:1), на 7 годину візуалізується велика компактна ВКМ, на 12 годину візуалізується ТЕ, що витекла. В порожнині бластоцисти видно декілька фрагментів. Бластицисту перенесли, тест негативний.

Kovacic et al. (2004) вивчили потенціал розвитку морфологічно субоптимальних бластоцист, класифікувавши їх по різних категоріях. Було виявлено, що частота живонароджуваності після переносу бластоцист поганої якості була нижчою порівняно з частотою живонароджуваності в контрольній групі з бластоцистами гарної якості (45,2%) в наступному порядку категорій: бластоцисти з цитоплазматичними фрагментами та некротичною ТЕ (32,8%); бластоцисти з максимум 20% виключених бластомерів (16,7%); некротична ТЕ та ВКМ (7,7%) і, врешті решт, бластоцисти дуже малого розміру з >20% виключених клітин (1,2%).

Е. ЦИТОПЛАЗМАТИЧНІ МІСТКИ МІЖ ВКМ ТА ТЕ

ТЕ-клітини проліферують в ранній бластоцисті, але коли бластоциста розширюється, мітотична активність пристінних клітин ТЕ (відокремлених від ВКМ бластоціллю) зменшується. Це означає, що до моменту імплантації ембріона поділ клітин відбувається тільки в полярній області як в полярних ТЕ-клітинах, так і в ВКМ (Copp, 1978). Кількість клітин в ВКМ збільшується, проте це не стосується полярної ТЕ внаслідок міграції клітин полярної ТЕ до муральної ТЕ зони, яка є мітотично неактивною (Copp 1979). Дослідження ультраструктури бластоцист продемонстрували, що деякі клітини ТЕ на полярно-муральному з'єднанні можуть розширюватися до поверхні клітин ВКМ (рис. 389–391; Ducibella et al., 1975). У роботі Salas-Vidal and Lomeli (2004) таке цитоплазматичне витягнення або філоподія була детально описана у бластоцист мишей. Вони мають в своєму складі капілярний актин та їх можна класифікувати на коротку та довгу філоподію. Коротка філоподія розтягується від ВКМ та муральної ТЕ у порожнину бластоцілі і часто зустрічається. Довга, тонка філоподія перетинає бластоціль від муральної ТЕ до центральної ВКМ, виявляється у 40% бластоцист мишей, отриманих *in vivo*.

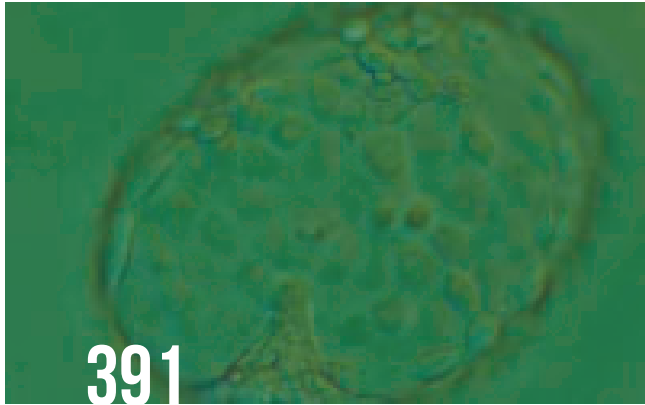
Однак, вони зустрічалися майже в усіх бластоцистах культивованих *in vitro*, показуючи можливий дефект, пов'язаний з культивуванням *in vitro*. Зазвичай ці довгі розтягнення трапляються в ранніх бластоцистах та зникають в експандованих бластоцистах, коли клітини полярної ТЕ мігрують до муральної ТЕ. Коли ці розтягнення все ще присутні під час експансії, то це може свідчити про погану якість ембріонального розвитку, поломку поляризації або погані умови культивування (Scott, 2000). За допомогою відеозйомки Salas-Vidal and Lomeli (2004) спостерігали, як бульбашки, схожі на везикули, рухались вздовж довгих філоподій, що свідчить про клітинну активність. Імунолокалізація FGFR2 та ErbB3 рецепторів також припускає сигнальну трансдуктивну активність всередині цих філоподій, показуючи прямий зв'язок між муральною ТЕ та клітинами ВКМ.



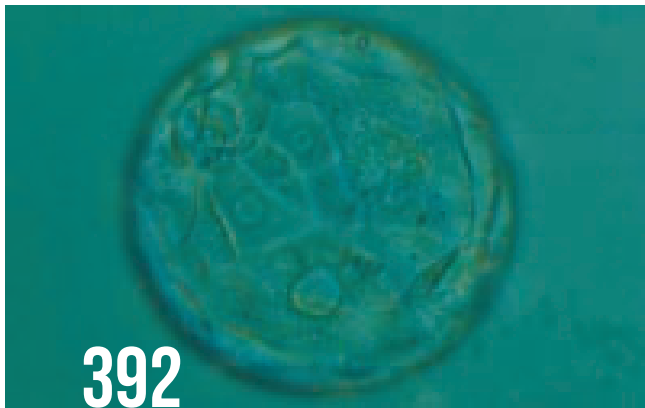
389. Експандована бластоциста гарної якості (клас 4:1:1) з великою ВКМ грибоподібної форми та добре вираженою ТЕ. Візуалізуються цитоплазматичні веретена від ВКМ до ТЕ. Бластоцисту перенесли, тест позитивний.



390. Бластоциста на стадії хетчингу (клас 5:1:2) з великою зіркоподібною ВКМ, що приєднана до клітин ТЕ тонкими трикутними веретенами або містками. Бластоцисту перенесли, але тест негативний.



391. Бластициста на стадії хетчингу (клас 6:1:1), що вже вільна від ZP, з компактною ВКМ, яка з'єднана з ТЕ широким трикутним містком. Бластицисту перенесли, але результат невідомий.

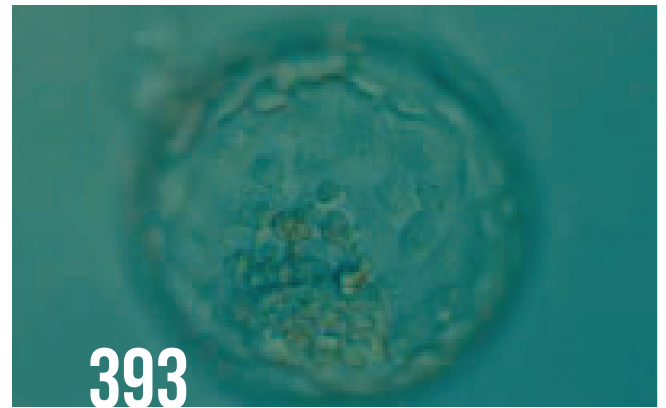


392. Експандована бластициста (клас 4:3:2), візуалізується вакуоля на 6 годину між клітинами ТЕ. Бластицисту перенесли, результат невідомий.

Г. ІНШІ МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ

Г.1 Вакуолі/вакуолізація

Вакуолі можуть з'явитись під час культивування людських ембріонів *in vitro* на будь-якій стадії розвитку (Ebner et al., 2005). Перші, що виявляються на 4 добу розвитку, мають найбільш сильний вплив на утворення бластицисти (Ebner et al., 2005). Вакуолі, що з'являються в ранньому розвитку, часто не можуть бути виявлені в межах бластицисти або можуть виявлятися лише у виключених клітинах (Ebner et al., 2005). Вакуолі у бластицистах частіше зустрічаються у ТЕ, аніж у ВКМ (мал. 392–394; Ebner et al., 2005). Такі вакуолі треба відрізнити від дегенеративних змін або вакуолізації, описаної та класифікованої як бластицисти BG3 вченими Dokras et al., 1993.



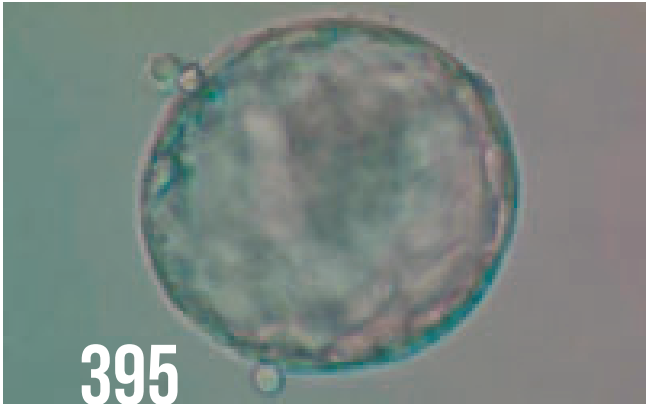
393. Бластициста на стадії хетчингу (клас 5:1:1) з компактною ВКМ на 6 годину, що зв'язана з декількома клітинними фрагментами. ТЕ складається з багатьох клітин, які формують зв'язаний епітелій, проте, у ТЕ є дві вакуолі середнього розміру, що знаходяться поруч з ВКМ на 9 годину. Бластицисту перенесли, проте тест негативний.



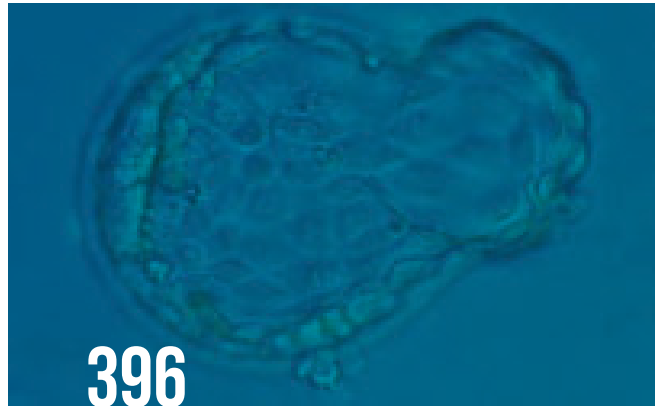
394. Бластициста (клас 2) з великою вакуолізацією ТЕ, що відокремлена від порожнини бластицисти і розташована на 10 годину при такому ракурсі. Бластицисту перенесли, результат невідомий.

Г.2 Більше, ніж один факт природнього хетчингу

У класифікації бластицист рідко зустрічаються дві або більше ділянки хетчингу (мал. 395–397; 2%; Fong et al., 2001). Припущено, що це може з'явитися у бластицист після ICSI внаслідок неповного закриття зони розриву, утвореного мікропіпеткою (Fong et al., 1997). Хетчинг в більш ніж одній ділянці ZP, особливо коли один із отворів дуже малий, може стати причиною затримки бластицисти у ZP, так як тиск у порожнині бластицисти знижувався б і не був би зконцентрованим в одній ділянці хетчингу.



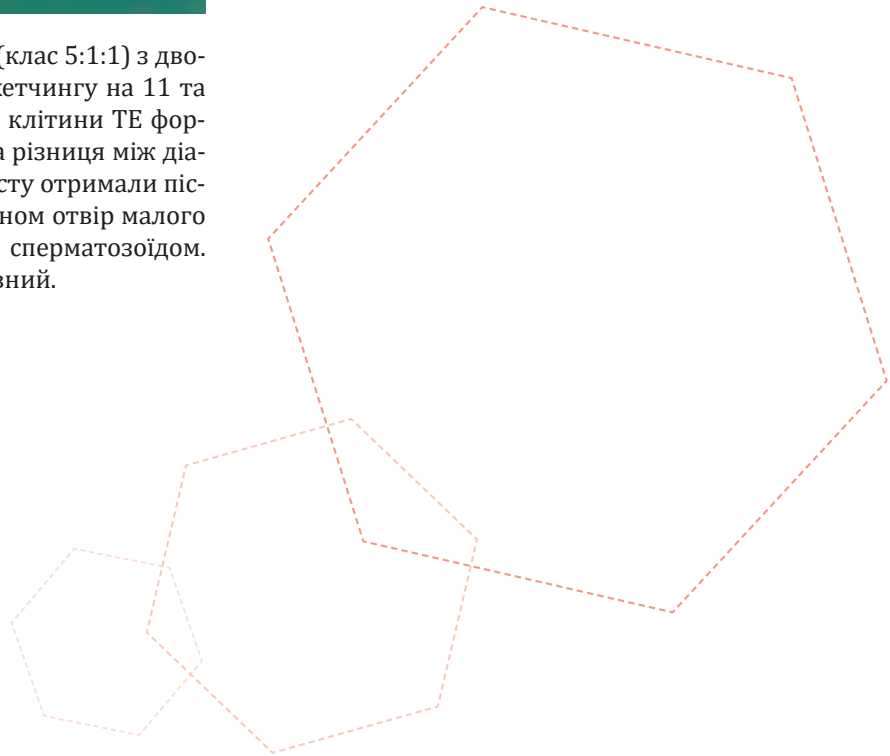
395. Бластициста на ранній стадії хетчингу (клас 5:1:1), яка починає природно вилучатись з двох різних малих отворів в ZP. ВКМ велика та компактна, клітин TE багато, вони формують зв'язаний епітелій. Бластицисту перенесли, результат невідомий.

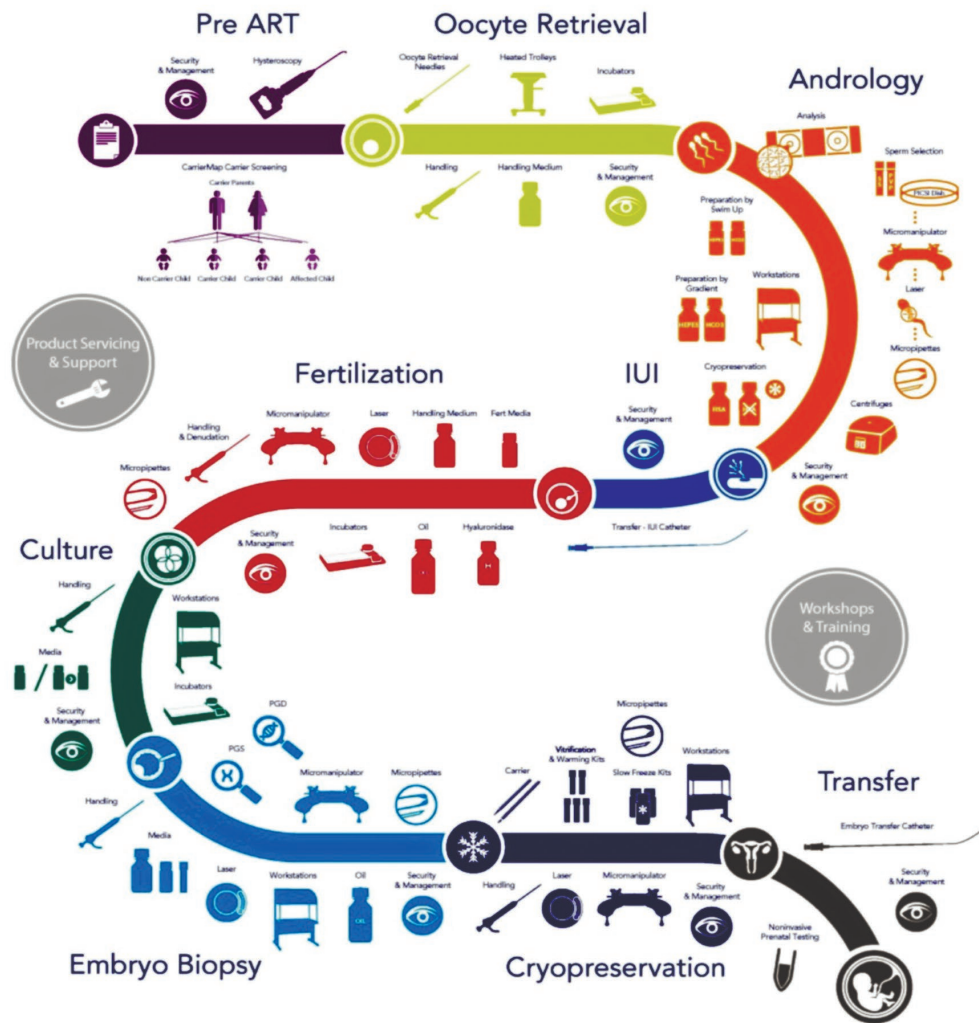


396. Бластициста на стадії хетчингу (клас 5:1:1) з великою кількістю клітин TE, що вийшли з отвору в ZP на 3 годину, також візуалізується малий отвір на 6 годину. Бластицисту отримали після ICSI, отже отвір на 6 годину може бути місцем уколу. Тест після переносу цієї бластицисти негативний.



397. Бластициста на стадії хетчингу (клас 5:1:1) з двома чіткими ділянками природного хетчингу на 11 та 6 годину. ВКМ велика та компактна, клітини TE формують когезивний епітелій. Є значна різниця між діаметрами двох отворів у ZP. Бластицисту отримали після стандартної інсемінації, таким чином отвір малого діаметру не є результатом ін'єкції сперматозоїдом. Бластицисту перенесли. Тест негативний.





Забезпечення IVF лабораторій								Генетичні дослідження
Торгова марка	Origio	Sage	Humagen	RI	Planer	K-systems	Wallace	
Обладнання								
Середовища культуральні	V	V						v PGS
Мікропіпетки			V	V				v PGD
Катетери і голки аспіраційні	V						V	v Carrier Map
Лазер				V				v Serenity NIPT
Мікроманіпулятор				V				
Інкубатори планшетні					V	V		
Робочі станції	V						V	



CooperSurgical Fertility Companies

Уповноважений представник CooperSurgical Fertility Companies в Україні ПП «МедІТА», м. Київ, 03040, вул. Васильківська 14, оф. 420, тел. (044) 587-87-82, (044) 587-96-81, факс (044) 206-24-26, e-mail: mta@treatment.kiev.ua, www.treatment.kiev.ua