

тату на 21,75 % ($P < 0,05$). При цьому концентрація метаболіту глюкози пірувату під впливом корвітину збільшилася на 59 %, а малату — на 42,9 %. Слід зазначити, що застосування ліпіну привело до усунення прояв лактат-ацидозу на рівні дії корвітину — вміст лактату на 4-ту добу експерименту зменшився на 25,8 %. Однак цей препарат виявив незначну активність за показниками рівня АТФ, підвищуючи вміст останньої на 12 % щодо контрольної групи тварин.

Введення піддослідним щурам ліпофлаону приводило до підвищення рівня АТФ на 80 % на фоні зниження АМФ на 40,5 % ($P < 0,05$). Дія ліпофлаону в постішемичному періоді відзначилася вірогідним зниженням вмісту лактату на 40,3 %. При цьому рівень малату та пірувату під впливом ліпофлаону вірогідно збільшився на 62 і 82 % відповідно.

Значне підвищення рівня малату під впливом препаратів кверцетину (особливо ліпофлаону) можна пояснити тим, що сам кверцетин здатен активувати компенсаторну малат-аспартатну човникову систему, яка забезпечує протонами електрон-транспортний ланцюг. Ця компенсаторна активація ма-

латного шунта забезпечує збереження пірувату в піруватдегідрогеназній реакції. Крім того, енерготропний механізм дії препаратів в умовах ішемічних ускладнень мозку можна пояснити їх антиоксидантними властивостями та зменшенням патологічної дії активних форм кисню на мітохондрії.

Висновки

1. Експериментальне ГПМК спричинює низку порушень метаболізму мозкової тканини: дискоординації в циклі трикарбонових кислот, зниження синтезу АТФ, розвиток лактат-ацидозу за рахунок активації анаеробного гліколізу.

2. Застосування препаратів кверцетину у тварин із ГПМК виявляє церебропротекторний ефект, значно нормалізуючи біоенергетичні процеси в мозку (підвищують рівень АТФ на фоні зниження рівня АМФ, також зменшують рівень лактату, збільшують вміст значущих інтермедіатів пірувату та малату).

3. У порядку порівняння та зменшення церебропротекторної дії за показниками усунення порушень біоенергетики препарати кверцетину можна розмістити таким чином: ліпофлаон > корвітин > ліпін.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. — М.: Медицина, 2001. — 328 с.

2. Дубиніна О. Ю. Роль окисного стресу при патологічних станах нервової системи // Мед. хімія. — 2002. — Т. 4, № 4. — С. 5-12.

3. Василенко Е. О., Ярош О. К. Фармакокінетичний профіль ліпосомального кверцетину в мозковій тканині // Ліки. — 2006. — № 3-4. — С. 72-76.

4. Schwedhelm E., Maas R., Troost R., Boger R. // Clin. Pharmacokinet. — 2003. — Vol. 42, N 5. — P. 437-459.

5. Медикаментозна защита головного мозга при моделировании ишемии и реперфузии / В. Н. Клименко, И. Ф. Беленичев, И. Н. Башкин и др. // Клиническая хирургия. — 1993. — № 12. — С. 50-52.

6. Експериментальні моделі ішемії головного мозку у фармакологічних дослідженнях / І. Ф. Беленичев, С. В. Горбачова, Н. В. Бухтіярова та ін. // Ліки. — 2006. — № 3-4. — С. 11-19.

7. Башкін І. М. Фармакологічна корекція обмінних процесів при ішемії головного мозку. Експериментально-клінічне дослідження: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — К., 1994. — 28 с.

8. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 272 с.

УДК 612.613.1:612.646:57.086.13:57.022

Р. В. Соболев, О. Ю. Леонова, О. В. Гавриченко

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЦИКЛІВ ДОПОМІЖНОЇ РЕПРОДУКТИВНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ПРИ ПЕРЕНЕСЕННІ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕМБРІОНІВ ПІСЛЯ ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНОЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ

Одеський державний медичний університет

Вступ

Кріоконсервація вважається припустимим рішенням для зберігання надлишкових ембріонів, що утворюються під час засто-

сування допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). При низьких температурах ембріони зберігають життєздатність, після розморожування їх метаболічна активність не порушується.

Вживання ембріонів людини після кріоконсервування різними методами досить висока — 66–80 % [3; 6]. Однак частота імплантації ембріонів людини, що зазнали заморожуван-



ня — розморожування, становить не більш ніж 30 % [3; 9].

У світі нараховується понад 200 000 дітей, які народилися після перенесення деконсервованих ембріонів, а частота аномалій розвитку у таких дітей не перевищує загальнопопуляційного рівня. Однак у роботах деяких авторів повідомляється про вплив факторів кріоконсервування на виникнення таких хромосомних аномалій, як трисомія за 13, 18 та 21-ю хромосомами, описані випадки поліплоїдії та анеуплоїдії [8; 9].

Із літературних джерел відомо, що кріозберігання надлишкових ембріонів після біопсії являє собою більш складний процес, оскільки при біопсії ушкоджується *zona pellucida*. Перші спроби кріозберігання ембріонів після біопсії призвели до зменшення їх життєздатності порівняно з небіоптованими ембріонами на тій же стадії розвитку. Однак є низка даних про вагітності, що настали після біопсії полярного тіла та кріозберігання біоптованих ембріонів на стадії дроблення [7; 10].

У результаті передімплантаційної генетичної діагностики (ПГД) встановлюється хромосомна повноцінність ембріона до моменту перенесення його у матку, тобто здійснюється профілактика народження дитини з хромосомною чи генною патологією. Під час ПДГ визначаються моногенні та хромосомні дефекти у ембріонів, а також стать ембріона для запобігання спадковим захворюванням, зчепленим зі статтю. Доведено, що морфологічно нормальні ембріони, отримані при ДРТ у жінок із ризиком виникнення генетичних патологій, мають значно більшу частоту анеуплоїдій, які можуть призводити до спонтанних абортів або до відсутності імплантації [1].

Для жінок, що мають високий ризик народження дітей зі спадковою патологією, ПДГ є альтернативним методом пре-

натального тестування. Головна перевага ПДГ — це можливість відмови від інвазивних втручань на плідному яйці та переривання вагітності у разі виявлення патології. Дослідження можна проводити на полярних тілах ооцитів чи ядрах бластомерів ембріона.

Мета дослідження — з'ясувати, як змінюються морфофункціональні особливості ембріонів після кріозберігання та ПГД у зв'язку з широким застосуванням цих процесів у медичній практиці.

Матеріали та методи дослідження

Під час дослідження проводилися спостереження за 3 групами ембріонів людини, отриманих після запліднення ооцитів *in vitro* у 65 циклах ДРТ у жінок старшої вікової групи (після 34 років) і чоловіків із діагнозом олігоастенозооспермія.

Індукцію суперовуляції, аспірацію, культивування ембріонів проводили за стандартним довгим протоколом програми ДРТ із використанням агоністів ГнРГ [3; 4].

До першої групи увійшли ембріони, перенесені у порожнину матки після 72-годинного культивування *in vitro*.

У другу групу були включені ембріони, що зазнали кріозберігання. Процес кріоконсервації здійснювався за допомогою програмового заморозувача «СТЕ 920» фірми Cryo-Technik-Erlangen (Німеччина) за методом контрольованої повільної кріоконсервації (поступова кріоконсервація) [11].

Як кріопротектор використовувалося середовище “Embryo Freezing Pack” (EFP) фірми Medicult (Данія), що містило сольовий розчин фосфатного буфера із сироватковим альбуміном людини.

Інкубацію ембріонів у розчинах кріопротекторів проводили у такий спосіб. Вибрані ембріони були перенесені з середо-

вища культивування Medicult (Cook) у мікрокраплині цього ж середовища до першого кріопротекторного середовища й еквілібровані при кімнатній температурі упродовж 5 хв. Потім при тій же температурі їх помістили на 10 хв у другий розчин — таке ж середовище з додаванням 1,2-пропандіолу. Після експозиції у цьому розчині ембріони перенесли у третій розчин, що складається із середовища для заморожування ембріонів, 1,2-пропандіолу та сахарози на 15 хв також при кімнатній температурі. У цьому середовищі і відбувався процес кріоконсервації.

Ембріони поміщали у соломинки для кріоконсервації (СТЕ) 0,1 мл, наповнені третім кріосередовищем на 0,5 см, потім шаром повітря завтовшки близько 5 мм і приблизно 2,5 см EFP 3, в якому знаходилися ембріони; потім знову йшов шар повітря завтовшки близько 5 мм і решта заповнювалася 0,5 М розчину сахарози. Соломинки закупорювали і негайно переносили до програмового заморозувача.

Заморожування відбувалося згідно з інструкцією кріоконсервування ембріонів.

Зберігання здійснювалось у посудинах Дьюара в рідкому азоті ($t = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для відтавання ембріонів соломинки витримували при кімнатній температурі і на водяній бані ($t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), потім вміст соломинки виливали у розчин 0,25 М сахарози. Після еквілібрування кріопротекторний розчин видаляли шляхом промивання ембріонів у середовищах для культивування Medicult або Cook. Подальше культивування *in vitro* для спостереження чи перенесення ембріонів також виконували у цих середовищах.

Третя група дослідження — це кріоконсервовані ембріони після ПГД. Було виконано біопсію ембріонів людини, що знаходилися на стадії 6–8 бласто-



мерів. За допомогою мікроманіпуляційних методів [1; 12] при 400-кратному збільшенні брали один-два бластомери. Потім їх досліджували за допомогою FISH (флюоресцентна in situ гібридизація) — для виявлення хромосомних патологій і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для визначення моногенних спадкових захворювань. Після цього ембріони культивували до стадії морули або бластоцисти. На основі даних, отриманих під час FISH і ПЛР, відбирали ембріони без будь-яких порушень, піддавали їх кріоконсервації і переносили у порожнину матки. Оцінку морфології здійснювали за допомогою мікроскопування ($\times 600$).

Результати дослідження та їх обговорення

У пацієнок протягом циклів лікування безпліддя методом ДРТ було аспіровано 331 зрілий преовуляторний ооцит. Через 16–20 год після інсемінації у 248 клітинах виявлені цитологічні ознаки запліднення. Через 72 год культивування 233 ембріони знаходилися на стадії 6 бластомерів, а 70 — на стадії 8 бластомерів.

Усього відібрано 84 ембріони — 40 восьмиклітинних і 44 — шестиклітинних для перенесення у порожнину матки 42 пацієнок (рисунок).

Кожній пацієнтці проведено трансплантацію двох ембріонів і призначено підтримувальну терапію (таблиця).

У 14 (33 %) із них через 14 днів рівень хоріонічного гонадотропіну сягав 150–300 од. На 24-й день від перенесення під контролем УЗД діагностовано 13 (32 %) маткових вагітностей.

Залишилося 219 ембріонів, які були кріоконсервовані.

У 29 (69 %) пацієнок спроба ДРТ скінчилася невдало. Їм було запропоновано перенесення розморожених ембріонів в іншому циклі.

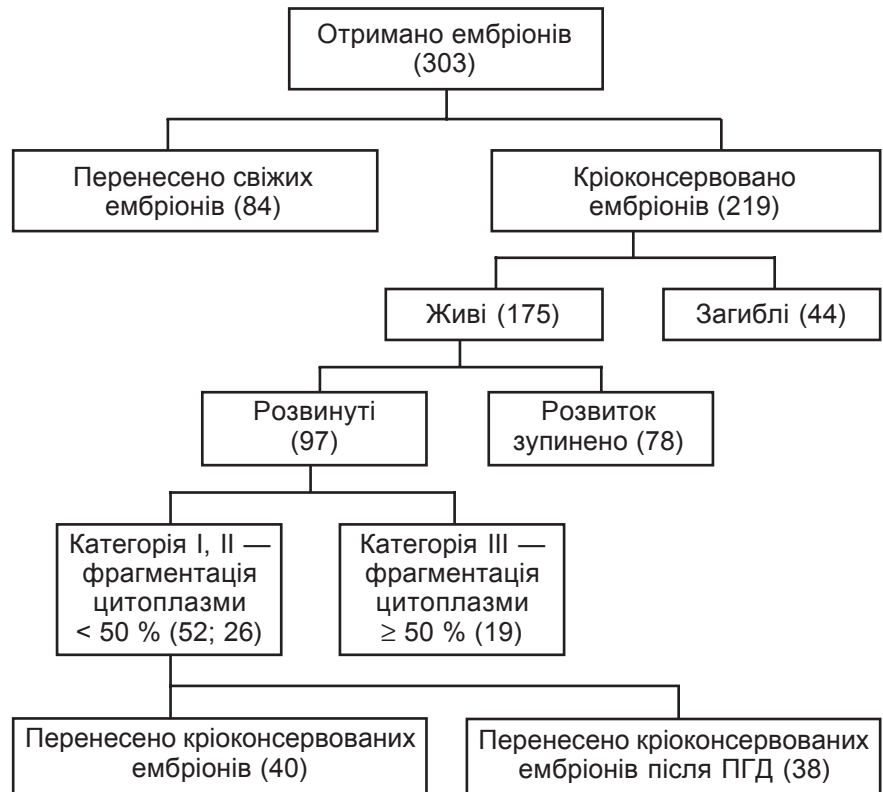


Рисунок. Схема проведення циклів допоміжних репродуктивних технологій

Таблиця

Ефективність циклів допоміжних репродуктивних технологій

Показники	Група ембріонів		
	Група 1	Група 2	Група 3
Кількість пацієнок у циклах ДРТ	42	20	19
Кількість перенесених ембріонів	84	40	38
Вагітність			
ХГ (позитивний)			
абс.	14	6	4
%	33	28	21
УЗД (позитивний)			
абс.	13	5	3
%	32	25	18

Після розморожування, виведення кріопротекторів і культивування протягом 1 год виконана оцінка морфології ембріонів; встановили, що 44 з них загинули, 175 є життєздатними. Через 24 год культивування було виявлено 78 ембріонів, розвиток яких припинився, та 97 ембріонів, що розвивалися. Також з'ясовано, що ембріони характеризувалися 76%-м збереженням бластомерів. Як відомо, при

збереженні хоча б одного бластомера можна вважати, що ембріон переніс кріоконсервування [2; 13], проте за даними багатьох авторів ембріон вважають таким, що пережив кріоконсервування, якщо половина бластомерів залишаються цілими [2; 5].

Ембріони, розвиток яких тривав після розморожування та культивування, мали такі характеристики: категорія I — бластомери сферичні, чіткі, рівні, ци-



топлазма прозора, 10%-на фрагментація (52 ембріони); категорія II — у 26 ембріонів виявлено 25%-ну фрагментацію цитоплазми; категорія III — наявність 50 % і більше фрагментів (19 ембріонів). Ембріони з фрагментацією цитоплазми до 50 % зараховані до другої та третьої групи дослідження: одна з яких була представлена ембріонами, перенесеними у порожнину матки після криоконсервування (40), а інша — розмороженими ембріонами після ПГД (38).

На частоту імплантації після перенесення деконсервованих ембріонів впливає збереження їх морфофункціонального стану [2]. Виявлено, що морфологічні характеристики після криоконсервування чітко корелювали з такими до заморожування.

Враховуючи можливе виникнення генетичних патологій в ембріонів третьої групи, до перенесення їх до матки проведено біопсію бластомерів і ПГД.

Після розморожування ембріони другої та третьої груп культивували протягом 72 год, перенесено їх у порожнину матки 39 пацієток: 20 з них було перенесено 40 криоконсервованих ембріонів, що не зазнали біопсії, 19 жінкам — 38 біоптованих ембріонів після криозберігання (див. рисунок). Пацієткам була назначена підтримувальна терапія.

Через 14 днів після перенесення ембріонів другої та третьої груп у 6 (28 %) і 4 (21 %) пацієток рівень хоріонічного гонадотропіну (ХГ) сягав 150–300 од. На 24-й день від перенесення діагностовано відповідно 5 (25 %) і 3 (18 %) вагітностей, підтверджених УЗД.

Висновки

1. У результаті перенесення свіжих ембріонів у 32 % пацієток діагностовані вагітності, перенесення розморожених криоконсервованих ембріонів у 25 % випадків завершилося вагітностями, що підтвердилися УЗД.

2. Перенесення криоконсервованих ембріонів і біоптованих ембріонів після криозберігання закінчилося 25 і 18 % біохімічних вагітностей відповідно.

3. Незважаючи на те, що частота вагітностей після перенесення криоконсервованих ембріонів, що не піддавалися біопсії, невірогідно нижча, ніж при перенесенні свіжих ембріонів, а після криозберігання та ПГД ембріонів людини репродуктивний наслідок вірогідно знижується, рекомендується використовувати ці методи у репродуктивній медицині, тому що при перенесенні криоконсервованих ембріонів не виникає необхідності у проведенні повторної індукції овуляції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гоголевская И. К. Преимплантационная генетическая диагностика: современное состояние и последние научные открытия // Проблемы репродукции. — 1999. — № 1. — С. 19-26.

2. Петрушко М. П. Использование криоконсервированных эмбрионов человека во вспомогательных репродуктивных технологиях // Проблемы криобиологии. — 2000. — № 1. — С. 71-76.

3. Петрушко М. П. FISH-анализ деконсервированных эмбрионов человека // Эксперим. и клин. медицина. — 2004. — № 3. — С. 339-344.

4. Элдер К. Лабораторные процедуры. — Bourn-Hallam group, 1990. — 23 с.

5. Abbeel E., Camus M., Waesberghe L. Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation // Hum. Reprod. — 1997. — Vol. 12, N 9. — P. 2006-2010.

6. Abbeel E., Camus M., Waesberghe L. Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation // Hum. Reprod. — 2006. — Vol. 12. — P. 2010.

7. Preimplantation genetic diagnosis / P. Braude, S. Pickering, F. Flinter, O. Mackie // Nature publishing group. — 2002. — Vol. 3. — P. 945.

8. Tetraploidy after frozen embryo transfer: cryopreservation may interfere with first mitotic division / K. Ginsburg, M. Johnson, A. Sacco et al. // Abstract

of 39 Annual Meeting of the Pacific Coast Fertility Society, 1991. — P. 196.

9. A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos / E. Iwarsson, M. Lundquist, J. Inzunza et al. // Hum. Genet. — 1999. — Vol. 104. — P. 376-382.

10. Cryopreservation of biopsied embryos at the blastocyst stage / M. C. Magli, L. Gianaroli, N. Grieco et al. // S.I.S.M.E.R., Reproductive Medicine Unit, Bologna and Biology of Reproduction Center, Reproductive Medicine Unit, Palermo, Italy Preliminary data were presented during the 21st Annual Meeting of ESHRE (Copenhagen, June 20–23, 2005).

11. Витрификация человеческого эмбриона в продвинутой стадии развития / A. Stecher, P. Vaderzwalmen, I. Riedler et al. // Проблемы репродукции. — 1998. — № 3. — С. 22-25.

12. Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first- and second-polar body Fish analysis / Y. Verlinsky, J. Cieslak et al. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. — 1998. — Vol. 15, N 5. — P. 285-289.

13. Zeibe S., Bech B., Petersen K. Resumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer // Hum. Reprod. — 1998. — Vol. 13, N 1. — P. 178-181.

