

УДК 618.174-089.888.11:616-092.18+611.013

А. В. Светлаков, М. В. Яманова, А. Б. Салмина, О. А. Серебренникова

ОСОБЕННОСТИ РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТАХ ЖЕНСКОГО БЕСПЛОДИЯ

Красноярская государственная медицинская академия,
Центр репродуктивной медицины, Красноярск

Представлены результаты изучения преимплантационного развития эмбрионов, полученных от женщин с различными клинко-патогенетическими вариантами бесплодия и получавших лечение с использованием вспомогательных репродуктивных технологий. Эмбрионы характеризовались нарушением способности и качества оплодотворения, изменением морфологии, снижением потенциала развития и имплантационной компетентности. Такие нарушения раннего эмбриогенеза носили неспецифический характер, но были более выражены у женщин с гиперандрогенией, эндометриозом и идиопатической формой бесплодия.

Ключевые слова: эмбриогенез, бесплодие, репродуктивная медицина

Широко распространенной группой заболеваний, обуславливающих нарушение репродуктивной функции у женщин, являются эндокринопатии, возникающие в результате нарушения эндокринной регуляции на различных уровнях гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы, а также эндометриоз. Среди причин эндокринного бесплодия лидируют гиперандрогения и гиперпролактинемия. В настоящее время накоплено значительное количество экспериментальных и клинических данных, позволяющих идентифицировать основные звенья патогенеза этих состояний [2]. Вместе с тем при указанных состояниях остаются практически не изученными особенности оогенеза и раннего преимплантационного развития эмбрионов.

Метод экстракорпорального оплодотворения, применяемый для лечения бесплодия, предоставляет возможность прижизненного наблюдения за гаметам и преимплантационным развитием эмбрионов человека и, тем самым, позволяет выявить ранее неизвестные аспекты патогенеза женского бесплодия.

Качество получаемых при экстракорпоральном оплодотворении эмбрионов является интегральным показателем выраженности патологического процесса репродуктивной системы женщины [4]. Для характеристики полученных эмбрио-

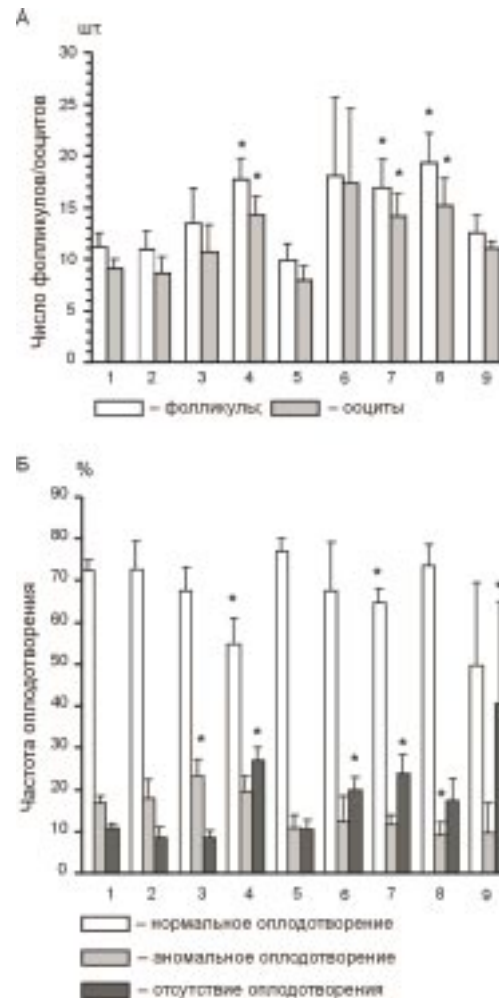


Рис. 1. Число пунктированных фолликулов, количество полученных ооцитов (А) и качество их оплодотворения (Б) у женщин с различными формами бесплодия.

Результаты представлены как $M \pm m$; достоверность различий по сравнению с контролем: * – $p < 0,01$. 1 – контрольная группа. Группы сравнения: 2 – гиперпролактинемия; 3 – недостаточность лютеиновой фазы; 4 – синдром поликистозных яичников; 5 – эндометриоз; 6 – сочетание гиперандрогении и гиперпролактинемии; 7 – смешанная гиперандрогения; 8 – группа женщин со смешанной гиперандрогенией, получавших дексаметазон; 9 – идиопатическая форма бесплодия

нов разработаны морфологические, биохимические, метаболические и генетические параметры [14]. Известно, что индикаторами успешного раннего развития эмбрионов и прогностически значимыми критериями в отношении наступления имплантации, эмбрио- и фетогенеза являются количе-

ство и распределение ядрышек в пронуклеусах [13], время от момента оплодотворения до первого деления, темпы дальнейших митозов и достижение стадии бластоцисты [10]. Нарушения, возникающие на каждом из этапов раннего эмбриогенеза, обусловлены генетическими и эпигенетическими факторами [6] и могут выражаться в фрагментации бластомеров, остановке развития эмбриона, его имплантационной некомпетентности или гибели путем апоптоза [5].

Целью данной работы явилось изучение особенностей раннего преимплантационного развития эмбрионов *in vitro*, полученных от женщин с различными формами бесплодия, которые проходили лечение с использованием вспомогательных репродуктивных технологий.

Методика. Исследованы ооциты и эмбрионы, полученные от женщин, проходящих лечение бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. Возраст женщин варьировал от 20 до 44 лет и в среднем составил $32,7 \pm 1,5$ года. Длительность предшествующего бесплодия – 5–18 лет и в среднем – $7,6 \pm 1,5$ года.

При проведении клинко-лабораторного обследования у 110 пациенток выявлен двухфазный менструальный цикл; из них 106 женщин с изолированной трубно-перитонеальной формой бесплодия составили контрольную группу. У 4 пациенток диагностирована идиопатическая форма

бесплодия. Недостаточность лютеиновой фазы менструального цикла диагностирована у 161 женщины. Из них у 33 женщин других эндокринных нарушений не обнаружено; функциональная гиперпролактинемия выявлена у 57 больных, смешанная гиперандрогения – у 30 пациенток; сочетание гиперандрогении и гиперпролактинемии обнаружено у 5 женщин. Наружный генитальный эндометриоз, в основном I–III степени тяжести, диагностирован у 36 больных. 11 женщин с синдромом поликистозных яичников и хронической ановуляцией составили отдельную группу.

Стимуляцию суперовуляции во всех лечебных циклах осуществляли по стандартной схеме с использованием препаратов-агонистов гонадотропин-рилизинг гормонов в сочетании с человеческим менопаузальным гонадотропином (хумегон). В качестве индуктора овуляции использовали прегнил. Начиная с 21-го дня менструального цикла, предшествующего стимуляции, 15 пациенткам со смешанной гиперандрогенией с целью коррекции гормонального статуса назначали дексаметазон в дозе 0,5 мг один раз в день до дня ультразвуковой диагностики беременности.

Культивирование ооцитов и эмбрионов проводили по стандартной методике с использованием сред и реактивов производства фирмы "Medi-Cult" (Дания). Характер оплодотворения и морфологию полученных зигот с определением количества пронуклеусов оценивали с использованием световой микроскопии, выполняемой через 16 часов от момента инсеминации. Морфологическую оценку эмбрионов с определением количества и размеров бластомеров, характера дробления, наличия фрагментации выполняли через 24, 48 и 72 часа от момента забора яйцеклеток и перед переносом эмбрионов в полость матки. Степень выраженности фрагментации отражали в баллах согласно [7].

Статистический анализ полученных результатов, выраженных в виде $M \pm m$, проводили, используя прикладную компьютерную программу "Biotat". С целью определения достоверности различий сопоставляемых величин применяли критерии Стьюдента и Z, методы корреляционного анализа.

Результаты. Человеческие преимплантационные эмбрионы, культивируемые *in vitro*, характеризуются вариабельной морфологией и различным потенциалом развития. Известно, что при существующих протоколах экстракорпорального оплодотворения около 50% эмбрионов к 5–6 дню культивирования утрачивают способность к развитию, а фрагментацию цитоплазмы различной степени выраженности обнаруживают у 75% эмбрионов [12]. Вместе с тем оценка качества эмбрионов в течение первых трех суток культивирования проводится с целью осуществления выбора эмбрионов для последующего переноса в полость матки и составления прогноза их дальнейшего развития [4].

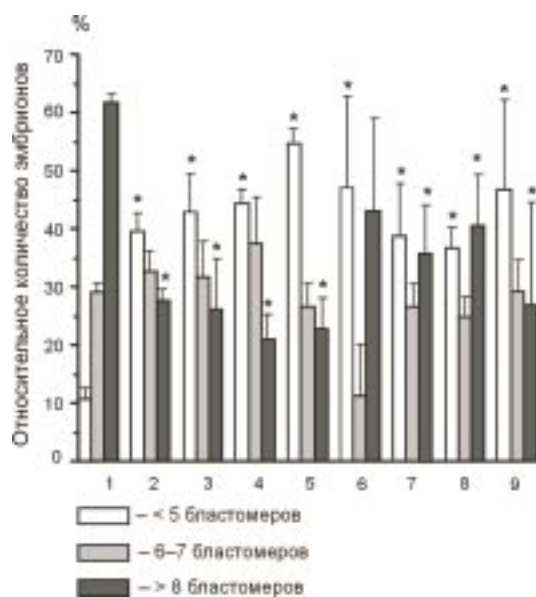


Рис. 2. Эффективность дробления эмбрионов к 72-му часу культивирования *in vitro* при различных формах женского бесплодия.

Результаты представлены как $M \pm m$; достоверность различий по сравнению с контролем: * – $p < 0,01$. 1 – контрольная группа. Группы сравнения: 2 – гиперпролактинемия; 3 – недостаточность лютеиновой фазы; 4 – синдром поликистозных яичников; 5 – эндометриоз; 6 – сочетание гиперандрогении и гиперпролактинемии; 7 – смешанная гиперандрогения; 8 – группа женщин со смешанной гиперандрогенией, получавших дексаметазон; 9 – идиопатическая форма бесплодия

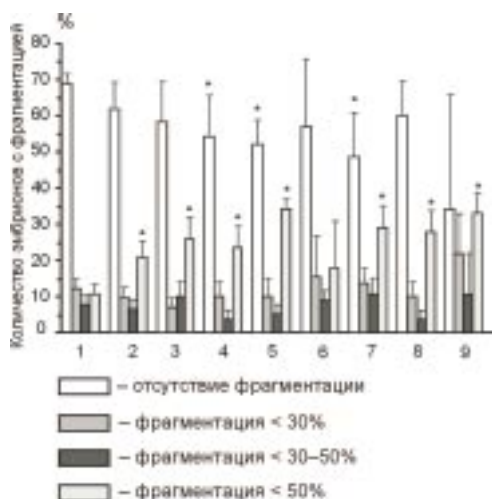


Рис. 3. Фрагментация эмбрионов к 72-му часу культивирования *in vitro* при различных формах женского бесплодия.

Результаты представлены как $M \pm m$; достоверность различий по сравнению с контролем: * – $p < 0,01$. 1 – контрольная группа. Группы сравнения: 2 – гиперпролактинемия; 3 – недостаточность лютеиновой фазы; 4 – синдром поликистозных яичников; 5 – эндометриоз; 6 – сочетание гиперандрогении и гиперпролактинемии; 7 – смешанная гиперандрогения; 8 – группа женщин со смешанной гиперандрогенией, получавших дексаметазон; 9 – идиопатическая форма бесплодия

При стимуляции овуляции число пунктированных фолликулов и количество полученных ооцитов достоверно превышало контрольный уровень в обеих группах женщин с гиперандрогенией (рис.1). Известно, что гормональная стимуляция овуляции, являющаяся одним из этапов лечения при эндокринных формах бесплодия, приводит к сохранению жизнеспособности фолликулов с уже начавшейся атрезией и, следовательно, может стать причиной получения ооцитов плохого качества [1]. Действительно, именно в этих группах частота нормального оплодотворения была достоверно снижена, а частота отсутствия оплодотворения более чем в 2 раза превышала контрольный уровень. Интересно, что патогенетическая терапия дексаметазоном, проводимая в группе женщин со смешанной гиперандрогенией, не влияла на количество ооцитов, полученных в лечебном цикле. Вместе с тем достоверно увеличивалась частота нормального оплодотворения и снижалась частота аномального оплодотворения. Наиболее часто отсутствие оплодотворения наблюдалось в группе женщин с идиопатической формой бесплодия (рис. 1).

Несмотря на существенные различия в эффективности и качестве оплодотворения в исследуемых группах, число эмбрионов, полученных от этих женщин, не отличалось от показателей контрольной группы. Однако анализ темпов и характера развития эмбрионов позволил выявить в этих

группах выраженные нарушения раннего эмбриогенеза.

Темпы деления эмбрионов были снижены во всех исследуемых группах женщин по сравнению с контролем. Так, развитие эмбрионов до стадии 6–7 бластомеров на 3 сутки культивирования было зарегистрировано в одинаковом проценте случаев в контрольной и тестируемых группах. Однако стадии 8 бластомеров через 72 часа культивирования достигли $61,1 \pm 2,1\%$ эмбрионов в контрольной группе и лишь $20,7 \pm 41,6\%$ эмбрионов, полученных от пациенток с эндокринным бесплодием и эндометриозом. Это соответствовало тому, что значительное количество эмбрионов остановилось в своем развитии на стадии менее 5 бластомеров (от 35,0 до 51,9% в различных группах) (рис. 2).

Столь ярко выраженное нарушение темпов деления бластомеров подтверждает существующее представление о том, что значительное количество человеческих эмбрионов приобретает черты аномального развития уже с первого эмбрионального деления [3]. Этому могут способствовать генетические дефекты, в том числе нарушения ядерной и митохондриальной ДНК, аккумулирующиеся в процессе оогенеза, изменение спектра гуморальных регуляторных факторов в среде культивирования [5], а также собственно патологический процесс, лежащий в основе той или иной формы бесплодия.

Так, показано, что нарушение созревания ооцитов и эмбрионов может быть вызвано действием некоторых лимфо- и монокинов, продуцирующихся при эндометриозе [11], нарушением динамического равновесия в активности про- и антиапоптотических факторов в ооцитах и эмбрионах при изменении стероидного фона [12]. Однако нам не удалось зарегистрировать значимых различий в темпах деления эмбрионов между группами женщин, страдающих различными формами эндокринного бесплодия, что позволяет предположить преимущественный вклад общепатологических неспецифических механизмов в развитие нарушений оогенеза и раннего эмбриогенеза.

Одним из ключевых процессов, сопровождающих развитие эмбрионов *in vitro*, является фрагментация бластомеров. Показано, что в целом фрагментация оказывает неблагоприятное действие на формирование бластоцист [3], хотя некоторые из вариантов фрагментации признаются нелетальными для эмбриона [14]. При оценке индекса фрагментации эмбрионов через 72 часа культивирования интенсивность фрагментации, оцениваемая степенью менее 30% и 30–50%, во всех группах достоверно не отличалась от таковых показателей в контроле. Доля эмбрионов с фрагментацией более 50% составила $10,7 \pm 1,9\%$ в контрольной группе. Достоверное превышение этого уровня (в 2–3,5 раза) было обнаружено во всех исследуемых группах и оказалось наиболее выраженным в группе

пациенток с эндометриозом (35,42,1%; $p < 0,05$) и идиопатической формой бесплодия (34,5±5,0%; $p < 0,05$). В целом, это свидетельствует о превалировании необратимых, выраженных процессов клеточной деструкции при исследуемых видах женского бесплодия (рис. 3).

Патогенез фрагментации эмбрионов до сих пор остается невыясненным. Предполагается, что он может быть одним из проявлений запрограммированной клеточной гибели, инициированной экзогенными или эндогенными факторами [9], хотя есть доказательства отсутствия патогенетической связи цитоплазматической фрагментации с апоптозом [15]. Данные о регуляции процесса фрагментации весьма противоречивы, включая наблюдения о зависимости этого процесса от возраста женщины [8] или влияния обоих родительских генотипов [6].

Период раннего преимплантационного эмбриогенеза является уникальным с той точки зрения, что бластомеры имеют очень высокую степень резистентности к действию неблагоприятных факторов, включая апоптогенные стимулы. Именно этот период развития человеческого эмбриона находится преимущественно под контролем генетической программы материнской гаметы с использованием транскриптов, накопленных в течение оогенеза. Эмбрионы характеризуются в этом периоде ограниченным количеством межклеточных коммуникаций, низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, превалированием недифференцированных митохондрий [5].

Обнаруженное нами значительное увеличение количества фрагментированных эмбрионов на фоне замедления темпов развития свидетельствует, таким образом, о неадекватном созревании ооцитов в период фолликулогенеза, приводящем, вероятно, к определенному дефициту транскриптов клеточных биомакромолекул.

Косвенным подтверждением недостижения эмбрионами имплантационной компетентности и способности к развитию является факт увеличения частоты ранних прерываний беременностей, наступивших в результате применения методов экстракорпорального оплодотворения у женщин с эндометриозом, гиперпролактинемией и гиперандрогенией.

Заключение. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что изменения, возникающие в репродуктивной системе женщины при рассмотренных формах бесплодия, влияя на процессы стероидо-, фолликуло- и гаметогенеза, приводят к изменению качества полученных эмбрионов и нарушению раннего эмбриогенеза человека. Нами отмечено, что различные клиничко-патогенетические варианты женского бесплодия сопровождаются неспецифическими изменениями таких ключевых эмбриологических параметров, как способность ооцита к оплодотворению, темпы развития эмбриона и сохранность морфологии бластомеров.

Вместе с тем общей чертой для большинства исследуемых видов патологии репродуктивной системы (за исключением гиперандрогенных состояний) является не столько нарушение процесса оплодотворения, сколько замедление раннего развития эмбриона. Развитие фрагментации эмбрионов не может служить патогномичным признаком и адекватным прогностическим критерием в отношении наступления имплантации и вынашивания беременности при женском бесплодии.

Вероятно, однотипность характерных изменений эмбрионов при наличии патологического процесса в репродуктивной системе женщины вызвана узостью возможного диапазона адаптивных реакций со стороны преимплантационных эмбрионов.

PECULIARITIES OF EARLY EMBRYOGENESIS IN WOMEN WITH DIFFERENT PATHOGENETICAL TYPES OF INFERTILITY

A.V. Svetlakov, M.V. Yamanova, A.B. Salmina, O.A. Serebrennikova

Preimplantation development of embryos obtained from women with different types of infertility and treated with assisted reproductive technologies has been studied. The embryos were characterized by alterations of fertilization ability and morphology, reduced developmental potential and implantation rate. These abnormalities of early embryogenesis were found to be common for every studied type, but they were more prominent in hyperandrogenia, endometriosis, and idiopathic form of infertility.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никитин А.И. // Проблемы репродукции. 1995. № 2. С. 36–42.
2. Овсянникова Т.В., Сперанская Н.В., Глазкова О.И. // Гинекология. 2000. Т. 2. № 2. С. 42–44.
3. Balakier H., Cadesky K. // Hum Reprod. 1997. Vol. 12. № 4. P. 800804.
4. Desai N.N., Goldstein J., Rowland D.Y., Goldfarb J.M. // Hum Reprod. 2000. Vol. 15. № 10. P. 2190–2196.
5. Hardy K., Spanos S., Becker D., Iannelli P. et al. // Proc Natl Acad Sci USA. 2001. Vol. 98. Issue 4. P. 1655–1660.
6. Hawes S.M., Chung Y.G., Latham K.E. // Biol Reprod. 2001. Vol. 65. № 4. P. 1050–1056.
7. Hu Y., Maxson W. S., Hoffman D.I., Ory S. J. et al. // Fertil Steril. 1998. Vol. 6. Issue 4. P. 650–657.
8. Jurisicova A., Rogers I., Fasciani, Casper R.F. et al. // Mol Hum Reprod. 1998. Vol. 4. № 2. P. 139–145.
9. Levy R., Benchaib M., Codonier H., Souchier C. et al. // Mol Hum Reprod. 1998. Vol. 5. № 8. P. 775–783.
10. Lundin K., Bergh C., Hardarson T. // Hum Reprod. 2001. Vol. 16. № 12. P. 2652–2657.
11. Miller K.A., Pittaway D.E., Deaton J.L. // Fertil Steril. 1995. Vol. 64. № 3. P. 623–626.
12. Spanos S., Becker D.L., Winston R.M.L., Hardy K. // Biol Reprod. 2000. Vol. 63. P. 1413–1420.
13. Tesarik J., Greco E. // Hum Reprod. 1999. Vol. 14. № 5. P. 1318–1323.
14. Van Blerkom J., Davis P., Alexander S. // Hum Reprod. 2001. Vol. 16. № 4. P. 719–729.
15. Xu J., Cheung T., Chan S.T. // Fertil Steril. 2000. Vol. 75. Issue 5. P. 986–991.