

УДК 57.086.13:611.013.15/2:576.314

М.П. Петрушко^{1,2*}, Т.А. Юрчук¹, Н.А. Будерацкая^{1,3}, В.И. Пиняев^{1,2}

Инвагинация оолеммы в нативных и криоконсервированных ооцитах человека при их оплодотворении *in vitro* методом ICSI

UDC 57.086.13:611.013.15/2:576.314

M.P. Petrushko^{1,2*}, T.O. Yurchuk¹, N.O. Buderatska^{1,3}, V.I. Piniayev^{1,2} Oolemma invagination of fresh and cryopreserved human oocytes during *in vitro* fertilization by ICSI

Реферат: Разработка новых прогностических критериев оценки оплодотворения *in vitro* нативных и криоконсервированных ооцитов является важной составляющей современных вспомогательных репродуктивных технологий. Проведено сравнение степени инвагинации оолеммы при интрацитоплазматическом введении спермия в нативные и криоконсервированные ооциты. Разработана классификация состояния тургора гамет в зависимости от степени инвагинации оолеммы при интрацитоплазматическом введении спермиев. Такое состояние мембраны ооцита является прогностической характеристикой образования зигот. Ооциты с нормальным тургором характеризовались высокой частотой оплодотворения – более 80%. Моментальный прокол оолеммы при микроманипуляциях был прогностическим фактором структурно-функциональных повреждений мембраны и приводил к дальнейшей дегенерации ооцитов. После криоконсервирования стандартным методом изменялось соотношение разных типов инвагинации оолеммы. Относительное количество клеток с нормальным тургором снижалось до 54% за счет увеличения ооцитов с повышенной упругостью мембраны. Четырехступенчатый метод удаления криозащитной среды после замораживания-отогрева ооцитов более эффективный для сохранения гамет с нормальным тургором, в отличие от стандартного двухступенчатого.

Ключевые слова: криоконсервирование, витрификация, ооцит, оолема.

Реферат: Розробка нових прогностичних критеріїв оцінки запліднення *in vitro* нативних та криоконсервованих ооцитів є важливою складовою сучасних допоміжних репродуктивних технологій. Проведено порівняння ступеня інвагінації оолеми за інтрацитоплазматичного введення спермій у нативні та криоконсервовані ооцити. Розроблено класифікацію стану тургору гамети залежно від ступеня інвагінації оолеми при інтрацитоплазматичному введенні спермій. Такий стан мембрани ооцита є прогностичною характеристикою утворення зигот. Ооцити з нормальним тургором характеризувалися високою частотою запліднення – більше 80%. Моментальний прокол оолеми під час мікроманіпуляції був прогностичним фактором структурно-функціональних пошкоджень мембрани та призводив до дегенерації ооцитів. Після криоконсервування стандартним методом змінювалося співвідношення різних типів інвагінації оолеми. Відносна кількість клітин із нормальним тургором знижувалася до 54% за рахунок збільшення ооцитів із підвищеною пружністю мембрани. Чотиріступеневий метод видалення криозахисного середовища після заморожування-відігріву ооцитів більш ефективний для збереження гамет із нормальним тургором, на відміну від стандартного двоступеневого.

Ключові слова: криоконсервування, вітрифікація, ооцит, оолема.

Abstract: Development of novel prognostic criteria for evaluation of *in vitro* fertilization of fresh and cryopreserved oocytes is an important component of modern assisted reproductive technologies. There was compared a degree of oolemma invagination during intracytoplasmic sperm injection into fresh and cryopreserved oocytes. The classification of the gamete turgor state based on oolemma degree invagination during intracytoplasmic sperm injection was developed. This state of oocyte membrane is a prognostic characteristic of zygotic formation rate. Oocytes with normal turgor were characterized by a high fertilization rate higher than 80%. Rapid oolemma puncture during oocyte micromanipulation showed structural and functional damage of membrane and led to further oocyte degeneration. After cryopreservation by a standard method the ratio of different types of oolemma invagination has been changed. A relative number of cells with normal turgor was decreased down to 54% due to an increase of oocyte number with higher membrane elasticity. The four-stage method of cryoprotective media removing after oocyte freeze-thawing is more effective for preserving gametes with normal turgor contrary to the standard two-stage one.

Key words: cryopreservation, vitrification, oocyte, oolemma.

Низкотемпературное хранение биологических объектов, в частности ооцитов, широко используется во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ) для лечения бесплодия [3, 21].

Low-temperature storage of biological matter, in particular oocytes, is widely used in assisted reproductive technologies (ART) for infertility treatment [18, 20]. However, during cryopreservation,

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Медичний центр «ВРТ-клініка репродуктивної медицини», м. Харків

³Медичний центр «ІГР», м. Київ

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: petrushkomarina@gmail.com

Надійшла 01.06.2018

Прийнята до друку 11.09.2018

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Medical Center «ART-Clinic of Reproductive Medicine», Kharkiv

³Medical Center «IGR», Kyiv

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: petrushkomarina@gmail.com

Received June, 01, 2018

Accepted September, 11, 2018

Однако в процессе криоконсервирования женские половые клетки подвергаются воздействию физических и химических факторов, которые могут оказывать влияние на такие эндо- и экзоцитоплазматические структуры, как веретено деления [1, 11], цитоскелет [6], *Zona pellucida* (ZP) [7] и кортикальные гранулы [15]. Их сохранность сказывается на жизнеспособности гамет, частоте оплодотворения и морфофункциональных особенностях эмбрионов, развившихся из криоконсервированных ооцитов [19]. Успехи в разработке новых способов замораживания ооцитов связаны с прогрессом в области фундаментальных исследований механизмов криоповреждения и криозащиты женских репродуктивных клеток с учетом следующих особенностей их строения: большой размер клеток (диаметр – 120 мкм, объем – $9,05 \times 10^5$ мкм³) и низкое отношение площади поверхности к объему ($p < 0,05$) [4]. Немаловажную роль в исходах замораживания-отогрева ооцитов играют их индивидуальные характеристики: толщина ZP, наличие цитоплазматических включений и вакуолей, состояние эндоплазматического ретикулума, которые необходимо учитывать для оптимизации криобиотехнологических протоколов [2].

Мишенью действия факторов криоконсервирования является плазматическая мембрана, механические характеристики которой определяются наличием холестерина и структурных белков цитоскелета [16]. В комплексе с микротрубочками и микрофиламентами цитоскелета она обеспечивает регуляцию объема клетки под действием осмотического фактора. Углеводные компоненты оолеммы, находящиеся в соединении с белками (гликопротеины) и липидами (гликолипиды), обеспечивают стабильность белковых молекул [8].

На разных этапах криоконсервирования в результате действия высоких концентраций криопротекторов на мембране ооцита происходит изменение концентрационных градиентов, вследствие которого возможны ее структурно-функциональные изменения [9]. Кроме того, высвобождение кортикальных гранул, происходящее после замораживания-отогрева, изменяет внеклеточный матрикс ооцита и приводит к затвердеванию ZP, что снижает частоту оплодотворения криоконсервированных ооцитов *in vitro* [9, 15]. Поэтому методом оплодотворения таких ооцитов является интрацитоплазматическая инъекция спермия в ооплазму (ICSI) [22]. При проведении ICSI происходит воздействие на оолемму, в результате чего нарушается ее целостность. При этом степень воздействия от введения спер-

male sexual cells are exposed to physical and chemical factors that can affect endo- and exocyttoplasmic structures, such as the fission spindle [1, 8], cytoskeleton [3], *Zona pellucida* (ZP) [4] and cortical granules [12]. Their integrity affects the viability of gametes, fertilization frequency and morphofunctional features of embryos developed from cryopreserved oocytes [16]. Advance in development of new methods for oocyte freezing is associated with the progress in basic research on the mechanisms of cryodamage and cryoprotection of female reproductive cells, taking into account their structural features, such as a large cell size (diameter – 120 μm , volume – $9.05 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) and a low ratio of surface area to volume ($p < 0.05$) [19]. Individual characteristics of oocytes play an important role in the outcomes of their freeze-thawing: ZP thickness, cytoplasmic inclusions, vacuoles, the state of endoplasmic reticulum, which must be taken into account for optimizing cryobiotechnological protocols [2].

Plasma membrane, the mechanical characteristics of which are determined by the presence of cholesterol and structural proteins of cytoskeleton is the primary target of the action of cryopreservation factors [13]. In combination with microtubules and microfilaments of cytoskeleton, it provides volume regulation under the effect of osmotic factor. Carbohydrate components of oolemma, being in combination with proteins (glycoproteins) and lipids (glycolipids), ensure the stability of protein molecules [5].

At different cryopreservation stages, action of high concentrations of cryoprotectants results in changes of concentration gradients occurs on the oocyte membrane, possibly leading to structural and functional alterations [6]. In addition, the release of cortical granules occurring after freeze-thawing changes the extracellular matrix of oocyte and results in ZP solidification, reducing the frequency of fertilization of cryopreserved oocytes *in vitro* [6, 12]. Therefore, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) into the ooplasm is the primary fertilization method of these oocytes [21]. During ICSI oolemma is affected, and as a result, its integrity is damaged. Herewith, the exposure during introduction of sperm into the oocyte depends on the cell turgor, which is determined by the structural and functional characteristics of oolemma. As a result, there may be variations of its invagination depth, which can serve as predictors of oocyte fertilization and zygotic formation [15, 24]. Whereas structural and functional characteristics of membrane after cryopreservation can change [22], we assumed that a decrease in osmotic load at the



матозоида в ооцит зависит от тургора клетки, который определяется структурно-функциональными характеристиками оолеммы. В результате возможны вариации степени ее инвагинации, которые могут служить предикторами оплодотворения ооцитов и образования зигот [18, 24]. Поскольку структурно-функциональные характеристики мембраны после криоконсервирования могут изменяться [5], мы предположили, что снижение осмотической нагрузки на этапе выведения криопротектора из клетки позволит сохранить функциональные характеристики оолеммы.

Цель исследования – сравнение степени инвагинации оолеммы в ходе проведения ICSI и частоты образования зигот при оплодотворении нативных и криоконсервированных ооцитов с использованием стандартного и модифицированного протоколов витрификации.

Материалы и методы

Результаты исследования получены на основании ретроспективного анализа данных эмбриологических протоколов пациентов, проходивших курс лечения бесплодия методами ВРТ в медицинском центре ДРТ-клиника репродуктивной медицины, г. Харьков. Все манипуляции с гаметами и эмбрионами проводили согласно положениям «Конвенции Совета Европы о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины» (Овьедо, 1997), доклада Главного комитета по биоэтике «Защита эмбрионов человека *in vitro*» (Страсбург, 2003) по информированному согласию пациентов и решению Комитета по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Всего было проанализировано 106 ооцитов, полученных после индукции суперовуляции у 14 женщин 21–38 лет, средний возраст ($29,9 \pm 4,8$) лет. Ооциты были разделены на три группы: 1 – свежeweделенные ооциты ($n = 40$); 2 – ооциты, криоконсервированные по стандартному протоколу ($n = 30$) и 3 – ооциты, криоконсервированные по модифицированному протоколу ($n = 36$).

Индукцию суперовуляции осуществляли с использованием длинного среднелютеинового протокола с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона и рекомбинантным фолликулостимулирующим гормоном. Контролируемую суперовуляцию проводили при ультразвуковом и гормональном мониторинге. В качестве триггера финального созревания фолликулов использовали рекомбинантный хорионический гонадотропин.

Полученные после аспирации фолликулов ооциты культивировали в среде «Global total for fertilization» («LifeGlobal», США). Через 4 ч культи-

stage of removing the cryoprotectant from the cell allowed to preserve the functional characteristics of oolemma.

The research aim was to compare the degree of oolemma invagination during ICSI and frequency of zygotic formation during fertilization of fresh and cryopreserved oocytes using standard and modified vitrification protocols.

Materials and methods

The findings represent a retrospective analysis of the data of embryological protocols of the patients undergoing an infertility treatment by ART at the ART-Clinic of Reproductive Medicine, Kharkiv. All the manipulations with gametes and embryos were performed according to 'The Convention on human rights and biomedicine of the Council of Europe' and the report of the Steering Committee On Bioethics (Oviedo, 1997) on 'The Protection of the human embryo *in vitro*' (Strasbourg, 2003) with an informed patient consent as well as the decision of the Committee in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

In the study there were analyzed 106 oocytes obtained after induction of superovulation in 14 women aged of 21–38 years, mean age made (29.9 ± 4.8) years. The oocytes were divided into three groups: 1 – freshly isolated oocytes ($n = 40$); 2 – oocytes cryopreserved according to the standard protocol ($n = 30$) and 3 – oocytes cryopreserved according to the modified protocol ($n = 36$).

Superovulation was induced using a long midluteal protocol with agonists of gonadotrophin releasing hormone and recombinant follicle-stimulating one. Controlled superovulation was performed under ultrasound and hormonal monitoring. Recombinant chorionic gonadotrophin was used as a trigger for the final maturation of follicles.

The oocytes obtained after aspiration of follicles were cultured in Global Total for Fertilization medium (LifeGlobal, USA). After 4 hours of *in vitro* culturing, the oocytes were placed into 80 IU/ml of hyaluronidase solution (LifeGlobal, USA) for 30 sec, thereafter they were denuded (cumulus cells were removed by pipetting). Two hours after the described procedure, oocytes evaluated as mature (stage MII) were cryopreserved according to a standard protocol: the oocytes were equilibrated for 12 min in 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 7.5% ethylene glycol (EG) and then transferred to a vitrification solution containing 15% DMSO and 15% EG [10].

Cryoprotection media were prepared based on the mentioned culture medium. The oocytes were imme-



вирования *in vitro* ооциты помещали в 80 МЕ/мл раствора гиалуронидазы («LifeGlobal», США) на 30 с, после чего проводили их денудацию (клетки кумулюса удаляли пипетированием). Через 2 ч после описанной процедуры ооциты, оцененные как зрелые (стадия МII), криоконсервировали по стандартному протоколу: ооциты эквilibрировали 12 мин в растворе 7,5% диметилсульфоксида (ДМСО) и 7,5% этиленгликоля (ЕГ), а затем переносили в витрификационный раствор, содержащий 15% ДМСО и 15% ЕГ [13]. Криозащитные растворы были приготовлены на основе указанной среды культивирования. Ооциты немедленно переносили на поверхность криотопа («Irvine Scientific», США) в 1–2 мкл витрификационного раствора и погружали в жидкий азот. Ооциты отогревали следующим образом: извлеченный из жидкого азота криотоп отогревали в 1,0 М растворе сахарозы (предварительно нагретом до 37°C). Выдерживали в течение минуты и переносили в 1 мл 0,5 М раствора сахарозы на 3 мин. После чего ооциты культивировали *in vitro* на протяжении 3 ч до выполнения ICSI.

Модификация метода состояла в том, что отмывку ооцитов от криозащитного раствора проводили многоступенчато. Для этого ооциты после отогрева переносили в растворы с постепенно снижающейся концентрацией сахарозы (0,75; 0,5; 0,25; 0,125 и 0 М) и выдерживали в каждом из них по 2 мин.

Интрацитоплазматическая инъекция спермия в ооцит была проведена в соответствии с общепринятой методикой [17]. Факт образования зигот констатировали через 16–18 ч после ICSI по наличию двух пронуклеусов в ооплазме ооцита.

При введении спермия в ооплазму отмечали следующие типы инвагинации оолеммы: А – нормальная, с проникновением инъекционной иглы на глубину до 1/2 диаметра ооцита; В – низкая с проникновением инъекционной иглы на глубину менее 1/3 диаметра ооцита; С – отсутствие инвагинации оолеммы, прокол ооцита происходит сразу после введения иглы; D – повышенная прочность мембраны, сложность прокола, игла

diately transferred on cryotop surface (Irvine Scientific, USA) in 1–2 μ l of vitrification solution and immersed into liquid nitrogen. The oocytes were thawed as follows: the cryotop removed from liquid nitrogen was warmed in 1.0 M sucrose solution (preheated up to 37°C). It was kept for a minute and transferred to 1 ml of 0.5 M sucrose solution for 3 minutes. After that, the oocytes were cultured *in vitro* for 3 h before ICSI.

The modification of the method consisted in step-by-step washing of oocytes from cryoprotective solution. Herewith the oocytes after thawing were transferred to solutions with a gradually decreasing concentration of sucrose (0.75, 0.5, 0.25, 0.125 and 0 M) and kept in each of them for 2 min.

Intracytoplasmic injection of sperm into the oocyte was carried out in accordance with the generally accepted procedure [14]. The fact of zygote formation was established in 16–18 hrs after ICSI by the presence of two pronuclei in oocyte ooplasm.

During sperm injection into ooplasm, the following types of invagination of oolemma were observed: A – normal invagination, with penetration of injection needle to a depth of up to 1/2 of oocyte diameter; B – low with penetration of injection needle to a depth of less than 1/3 of oocyte diameter; C – without oolemma invagination – the oocyte puncture occurred immediately after injection; D – increased membrane integrity, complicated puncture, the needle penetrated to a depth of more than 3/4 of oocyte diameter (Fig. 1).

The groups were compared using the χ^2 test. The data were presented as ($M \pm m$) and compared using two-tailed unpaired *t*-test. The value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results and discussion

The ICSI procedure involves the injection of spermatozoon, being in micropipette into ooplasm after *ZP* dissection [7]. At the same time, we observed a different degree of oolemma invagination, according to which the oocyte turgor was judged, such as: normal; low; completely absent and high.

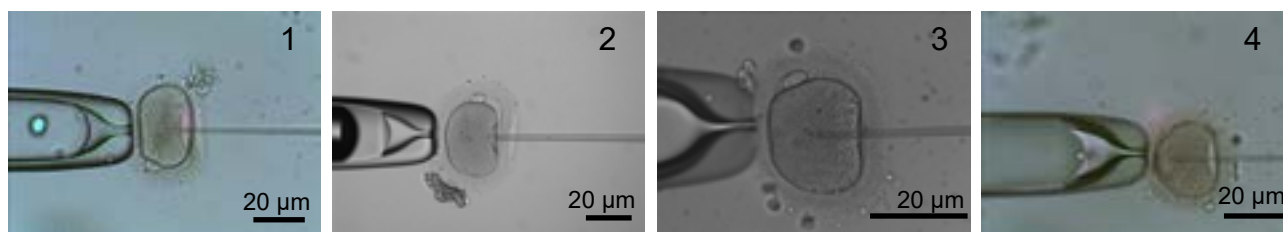


Рис. 1. Классификация типов инвагинации оолеммы при ICSI: 1 – тип А; 2 – тип В; 3 – тип С; 4 – тип D. DIC-контраст.
Fig. 1. Classification of oolemma invagination types during ICSI: 1 – type A; 2 – type B; 3 – type C; 4 – type D. DIC-contrast.



проникает на глубину более чем 3/4 диаметра ооцита (рис. 1).

Сравнения между группами были выполнены с использованием χ^2 -теста. Данные были представлены как ($M \pm m$) и сравнивались с использованием двухстороннего непарного t -теста. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты и обсуждение

Выполнение ICSI требует введения в ооплазму спермия, находящегося в микропипетке, после рассечения ZP [10]. При этом мы наблюдали разную степень инвагинации оолеммы (высокая, нормальная, низкая и полное отсутствие), по которой судили о тургоре ооцита. Анализ этих вариантов при проведении ICSI позволил заключить, что все проанализированные ооциты с инвагинацией типов А характеризовались высокой частотой оплодотворения (таблица). В случае типов В и D этот показатель был значимо ниже. При отсутствии инвагинации оолеммы в процессе инъекции спермия в ооплазму (тип С) частота оплодотворения была минимальной, а в большинстве случаев ооциты дегенерировали в течение нескольких часов после ICSI.

В нативных ооцитах при выполнении ICSI в (83 ± 7,3)% случаев была отмечена нормальная инвагинация оолеммы (рис. 2, группа 1). При этом частота их оплодотворения была достаточно высокой – более 80% (таблица). После криоконсервирования стандартным методом количество ооцитов с нормальной инвагинацией оолеммы уменьшилось, однако использование модифицированного метода позволило увеличить количество ооцитов с указанными характеристиками до (69 ± 4,9)% (рис. 2, группы 2 и 3).

Количество ооцитов с низкой инвагинацией мембраны (тип В) было одинаковым во всех исследуемых группах. При этом частота оплодотворения таких ооцитов была достаточно высокой и составила (73,5 ± 5,9), (68,6 ± 5,6) и (70,2 ± 6,6)% для групп 1–3 соответственно. После криоконсервирования увеличилось количество ооцитов с отсутствием инвагинации оолеммы (при стандартном способе – в 3 раза, с модификацией – в 1,5 раза) (рис. 2, группы 1 и 2). Такие ооциты дегенерировали сразу же после выполнения ICSI и, соответственно, оплодотворения не происходило. Полученные результаты согласуются с данными исследований, в которых отмечено, что дегенерация ооцитов тесно связана с характеристиками оолеммы [23]. Отсутствие тургора ооцита является прогностическим критерием нарушения экструзии второго полярного тела. Разрыв мембраны может влиять на корковый компонент цито-

Частота оплодотворения ооцитов с разным типом инвагинации оолеммы
Frequency of oocyte fertilization with different type of oolemma invagination

Тип инвагинации оолеммы Type of oolemma invagination	Частота оплодотворения в группах, % Fertilization frequency in groups, %		
	1	2	3
A	88,8 ± 4,2	83,4 ± 7,1	87,9 ± 7,3
B	73,5 ± 5,9	68,6 ± 5,6	70,2 ± 6,6
C	32,2 ± 3,8	21,3 ± 4,4*	27,4 ± 2,5
D	67 ± 4,3	55 ± 3,9*	59,9 ± 3,5*

Примечание: * – различия статистически значимы относительно группы 1, $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant with respect to group 1, $p < 0.05$.

The analysis of these variants during ICSI allowed concluding all the analyzed oocytes with type A invagination to be characterized by a high rate of fertilization (Table). In case of type B and D, this index was significantly lower. When no oolemma invagination occurred during spermatozoon injection into ooplasm (type C), the fertilization frequency was minimal, and in most cases the oocytes degenerated within a few hours after ICSI.

During ICSI a normal invagination of oolemma was observed in (83 ± 7.3)% of cases in native oocytes (Fig. 2, group 1). Herewith the frequency of their fertilization was quite a high, namely above 80% (Table). After cryopreservation with the standard technique, the number of oocytes with normal invagination of oolemma decreased, but the use of modified method allowed to augment the oocyte number with the mentioned characteristics up to (69 ± 4.9)% (Fig. 2, groups 2 and 3).

The number of oocytes with low invagination of membrane (type B) was the same in all the studied groups. Herewith the fertilization frequency of these oocytes was quite a high and made (73.5 ± ± 5.9), (68.6 ± 5.6) and (70.2 ± 6.6)% for groups 1–3, respectively. After cryopreservation, the number of oocytes with no oolemma invagination increased (thrice if using the standard technique and in 1.5 time if modified) (Fig. 2, group 1 and 2). These oocytes degenerated immediately after ICSI performance and therefore no fertilization occurred. Our findings correlate with the reported data, where the oocyte degeneration was revealed to be closely related to oolemma characteristics [23]. The absence of oocyte turgor is a prognostic criterion of extrusion disorder in the second polar body. The memb-



золя и, следовательно, на цитоскелет ооцита, что приводит к нарушению строения микротрубочек, ответственных за сегрегацию и вытеснение хроматид (в форме полярного тела) при втором мейотическом делении [20].

После криоконсервирования значительно увеличилось количество ооцитов с повышенной прочностью мембраны (рис. 2, группа 2). Однако это не повлияло на частоту их оплодотворения. При выполнении ICSI в ооцитах с повышенным тургором оолеммы для проникновения иглы в ооплазму необходимо создать более высокое давление для прохождения через интрацитоплазматические структуры, при котором возможно повреждение мейотического аппарата и цитоскелета [14]. Поэтому на такое поведение оолеммы необходимо обращать особое внимание во избежание дальнейшего культивирования и переноса в полость матки пациентки эмбрионов с хромосомными патологиями.

В эмбрионах, полученных из ооцитов со слабым тургором, чаще возникает фрагментация участков цитоплазмы, которая ассоциируется с низким имплантационным потенциалом [12]. Показано, что степень инвагинации оолеммы может зависеть от состояния *ZP*. Так, ооциты с *ZP* имеют модуль упругости оолеммы, который более чем в 85 раз выше, чем без *ZP* [7]. Это может частично объяснить важную роль *ZP* в криозащите оолеммы: сопротивление механическому стрессу из-за возможного образования льда во время криоконсервирования.

Криоконсервирование и дальнейшее инъецирование ооцитов, лишенных *ZP*, является проблематичным. В литературе представлены данные об их успешном выживании, оплодотворении, развитии эмбрионов и наступлении беременности после эмбриотрансфера в полость матки [4].

Выводы

1. Тип инвагинации оолеммы может быть прогностическим фактором оплодотворения свежесыведенных и криоконсервированных ооцитов после проведения ICSI. Ооциты с нормальной инвагинацией оолеммы характеризуются высокой частотой оплодотворения, при отсутствии инвагинации частота оплодотворения снижается, наблюдается дегенерация ооцитов.

2. После криоконсервирования по стандартному протоколу увеличивается количество ооцитов с повышенной прочностью мембраны. Четырехступенчатый метод выведения криопротектора из ооцитов с 2-минутными интервалами более эффективный для сохранения нормального тургора ооцитов, чем двухступенчатый.

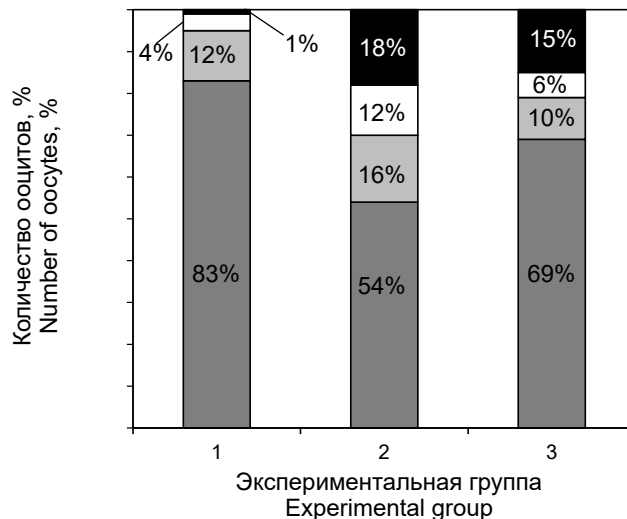


Рис. 2. Тип инвагинации оолеммы в нативных и криоконсервированных ооцитах человека: ■ – А; ■ – В; □ – С; ■ – D.

Fig. 2. Type of oolemma invagination in native and cryopreserved human oocytes: ■ – A; ■ – B; □ – C; ■ – D.

rane rupture may affect the cortical component of cytosol and, consequently, the oocyte cytoskeleton, that entails a disordered structure of microtubules, being responsible for segregation and dislocation of chromatids (in terms of the polar body) in the second meiotic division [17].

After cryopreservation, the oocyte number with an increased membrane strength significantly augmented (Fig. 2, group 2). However, this had no effect on their fertilization frequency. During ICSI, a higher pressure should be applied in the oocytes with an increased turgor of oolemma to penetrate the needle into ooplasm for passing through intracytoplasmic structures, when meiotic apparatus and cytoskeleton may be damaged [11]. Therefore, this behavior of oolemma needs special attention in order to avoid further cultivation and transfer into uterine cavity of the embryos with chromosomal pathologies.

In the embryos, procured from oocytes with a low turgor, the fragmentation of cytoplasmic sites appears more frequently, being associated with a low implantation potential [9]. The degree of oolemma invagination rate was shown to depend on *ZP* state. For example, the oocytes with *ZP* have the Young's modulus of oolemma, more than 85 times higher than *ZP*-free ones [4]. This may partly explain an important role of *ZP* in oolemma cryoprotection, *i. e.* the resistance to mechanical stress due to a possible ice formation during cryopreservation.

Cryopreservation and further injection of *ZP*-deprived oocytes are questionable. There are the reported data on their successful survival, fertilization,



Література

1. Бударецька НО, Гонтар ЮВ, Ільїн ІС, та ін. Порівняльна характеристика морфологічних особливостей та локалізації мейотичного веретена в ооцитах людини до та після криоконсервування. Український журнал медицини, біології та спорту. 2017; 1:151–7.
2. Бударецька НО, Петрушко МП. Варіабельність морфологічних параметрів як критерій прогнозу ефективності криоконсервування ооцитів людини. Морфологія. 2017; 10 (4): 18–22.
3. Петрушко МП. Сучасний стан проблеми криоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів людини. Вісник НАН України. 2017; 7:44–52.
4. Петрушко МП, Пиняев ВИ, Подуфалый ВВ, и др. Беременность после переноса эмбриона, полученного при оплодотворении ооцита, лишённого Zona pellucida, криоконсервированным эпидидимальным спермием. Проблемы репродукции. 2013; 2: 63–5.
5. Смолянинова ЕИ, Шигимага ВА, Стриха ОА, и др. Влияние этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на электрическую проводимость 2-клеточных ооцитов мыши. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013; 3, 228–37.
6. Chasombat J, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T. Pretreatment of in vitro matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. Cryobiology. 2015;71(2): 216–23.
7. Choi JK, Yue T, Huang H, et al. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. Cryobiology. 2015; 71(2):350–5.
8. Danfourab M, Elmahaishi M. Human oocyte oolemma characteristic is positively related to embryo developmental competence after ICSI procedure. Middle East Fertil Soc J. 2010; 15(4): 269–73.
9. Edashige K. Permeability of the plasma membrane to water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos: Its relevance to vitrification. Reprod Med Biol. 2017; 16(1): 36–9.
10. Halliday J. Outcomes for offspring of men having ICSI for male factor infertility. Asian J Androl. 2012; 14(1): 116–20.
11. Jung YJ, Cheon YP. Improvement of the vitrification method suppressing the disturbance of meiotic spindle and chromosome systems in mature oocytes. Dev Reprod. 2014; 18(2):117–25.
12. Khalilian M, Valojerdi MR, Navidbakhsh M, et al. Estimating zona pellucida hardness under microinjection to assess oocyte/embryo quality: Analytical and experimental studies. Advances in Bioscience and Biotechnology. 2013; 4(5): 679–88.
13. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online [Internet]. 2005 Jul 15; [Cited 2018 Aug 24]; 11(3):300–8. Available from: www.rbmonline.com/Article/1827.
14. Liu L, Cai J, Li P, Jiang X, Ren J. Clinical outcome of cycles with oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection. Syst Biol Reprod Med. 2017; 63(2):113–19.
15. Manna C, Rienzi L, Greco E, et al. Zona pellucida solubility and cortical granule complements in human oocytes following assisted reproductive techniques. Zygote. 2001; 9(3): 201–10.
16. Mullen SF, Li M, Li Y, et al. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. Fertil Steril. 2008; 89(6):1812–25.
17. Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A, editors. Practical manual of in vitro fertilization. NY: Springer-Verlag. 703 p.
18. Ola B, Afnan M, Sharif K, et al. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? Considerations of fertilization and embryo development, cost effectiveness and safety. Hum Reprod. 2001;16(12):2485–90.
19. Palermo GD, Alikani M, Bertoli M, et al. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes embryo development and pregnancy onset after embryo transfer into uterine cavity [19].

Conclusions

1. The type of oolemma invagination may be a prognostic index in fertilization of fresh and cryopreserved oocytes after ICSI. The oocytes with normal oolemma invaginations are characterized by a high fertilization frequency, and if it is absent the fertilization frequency decreases, and the oocyte degeneration is observed.

2. After cryopreservation according to the standard protocol, the number of oocytes with increased membrane strength augments. A four-step method for cryoprotectant removal out of oocytes with 2-minute intervals is more efficient for preserving a normal oocyte turgor than a two-step one.

References

1. Buderatska NO, Gontar YV, Il'in II, et al. [Comparative characteristics of morphological feature and localization of meiotic spindle in human oocytes before and after cryoconservation]. Ukr z med biol sportu. 2017; 1: 151–7. Ukrainian.
2. Buderatska NO, Petrushko MP. [Variability of morphological parameters as a prognostic criterion of human oocyte cryopreservation]. Morphologia. 2017; 10 (4): 18–22. Ukrainian.
3. Chasombat J, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T. Pretreatment of in vitro matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. Cryobiology. 2015;71(2):216–23.
4. Choi JK, Yue T, Huang H, et al. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. Cryobiology. 2015; 71(2):350–5.
5. Danfourab M, Elmahaishi M. Human oocyte oolemma characteristic is positively related to embryo developmental competence after ICSI procedure. Middle East Fertil Soc J. 2010; 15(4): 269–73.
6. Edashige K. Permeability of the plasma membrane to water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos: Its relevance to vitrification. Reprod Med Biol. 2017; 16(1): 36–9.
7. Halliday J. Outcomes for offspring of men having ICSI for male factor infertility. Asian J Androl. 2012; 14(1): 116–20.
8. Jung YJ, Cheon YP. Improvement of the vitrification method suppressing the disturbance of meiotic spindle and chromosome systems in mature oocytes. Dev Reprod. 2014; 18(2): 117–25.
9. Khalilian M, Valojerdi MR, Navidbakhsh M, et al. Estimating zona pellucida hardness under microinjection to assess oocyte/embryo quality: Analytical and experimental studies. Adv Biosci Biotechnol. 2013; 4(5): 679–688.
10. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online. 2005;11(3):300–8.
11. Liu L, Cai J, Li P, Jiang X, Ren J. Clinical outcome of cycles with oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection. Syst Biol Reprod Med. 2017; 63(2):113–19.
12. Manna C, Rienzi L, Greco E, et al. Zona pellucida solubility and cortical granule complements in human oocytes following assisted reproductive techniques. Zygote. 2001; 9(3): 201–10.
13. Mullen SF, Li M, Li Y, et al. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene



- treated by intraplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996; 11:172–6.
20. Palmerini MG, Antinori M, Maione M, et al. Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification. *J Reprod Dev.* 2014; 60(6):411–20.
 21. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, et al. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 169(1–2):33–7.
 22. Rubino P, Vigano P, Luddi A, et al. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Hum Reprod Update.* 2016; 22(2):194–227.
 23. Yanagida K, Katayose H, Suzuki K, et al. Flexibility of oolemma is an important factor for oocyte survival after ICSI. *J Mamm Ova Res.* 2001; 18:93–98.
 24. Yavas Y, Roberge S, Khamsi F, et al. Performing ICSI using and injection pipette with the smallest possible inner diameter and a long taper increases normal fertilization rate, decreases incidence of degeneration and tripronuclear zygotes, and enhances embryo development. *J Assist Reprod Genet.* 2001; 18(8): 426–35.
 - glycol and the appliance toward vitrification. *Fertil Steril.* 2008; 89(6):1812–25.
 14. Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A, editors. *Practical manual of in vitro fertilization.* NY: Springer-Verlag. 703 p.
 15. Ola B, Afnan M, Sharif K, et al. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? Considerations of fertilization and embryo development, cost effectiveness and safety. *Hum Reprod.* 2001; 16(12):2485–90.
 16. Palermo GD, Alikani M, Bertoli M, et al. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intraplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996; 11:172–6.
 17. Palmerini MG, Antinori M, Maione M, et al. Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification. *J Reprod Dev.* 2014; 60(6):411–20.
 18. Petrushko MP. [Current state of the problem of cryopreservation of reproductive cells and human embryos]. *Visnyk Nac Acad Nauk Ukr.* 2017; 7: 44–52. Ukrainian.
 19. Petrushko MP, Pinaev VI, Podufaly VV, et al. [Pregnancy after transfer of the embryo obtained by fertilization of oocyte devoid of Zona pellucida and cryopreserved epididymal sperm]. *Problemy Reproduktsii.* 2013; 2: 63–5. Russian.
 20. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, et al. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 169(1–2):33–7.
 21. Rubino P, Vigano P, Luddi A, et al. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Hum Reprod Update.* 2016; 22(2):194–227.
 22. Smolyaninova EI, Shigimaga VA, Strykha OA, et al. Influence of cryopreservation stages by vitrification in ethylene glycol-saccharose medium on electrical conductivity of mouse 2-cell oocytes. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2013; 23(3), 228–37.
 23. Yanagida K, Katayose H, Suzuki K, et al. Flexibility of oolemma is an important factor for oocyte survival after ICSI. *J Mamm Ova Res.* 2001; 18:93–98.
 24. Yavas Y, Roberge S, Khamsi F, et al. Performing ICSI using and injection pipette with the smallest possible inner diameter and a long taper increases normal fertilization rate, decreases incidence of degeneration and tripronuclear zygotes, and enhances embryo development. *J Assist Reprod Genet.* 2001; 18(8): 426–35.

