

УДК: 618.177–089.888.11

DOI: 10.37800/RM.3.2022.87-92

## НАСТУПЛЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ И РОДЫ У ПАЦИЕНТОК ПОСЛЕ КОРРЕКЦИИ РАСПОЛОЖЕНИЯ ПРОНУКЛЕУСОВ В ООЦИТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИОНОФОРА КАЛЬЦИЯ

М. П. Яхьярова<sup>1</sup>, И.А. Заставский<sup>1</sup>, А.В. Ким<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ТОО «Институт Репродуктивной Медицины», Алматы, Республика Казахстан

### Аннотация

**Актуальность:** Непрерывное совершенствование методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) помогает преодолеть практически все виды бесплодия. В настоящее время в репродуктивной медицине широко используется интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов (ИКСИ), которая позволяет получить оплодотворенные ооциты в случаях тяжелого мужского или идиопатического бесплодия. Но даже зиготы с двумя пронуклеусами не всегда могут правильно развиваться и дойти до стадии бластоцисты. Важным критерием для образования нормальной бластоцисты является центральное расположение пронуклеусов в зиготе. Поиск методов, повышающих эффективность программ ВРТ, является одним из наиболее актуальных вопросов репродуктивной медицины.

**Цель исследования** – изучить влияние ионофора кальция на расположение пронуклеусов в зиготах, развившихся из недостаточно активированных ооцитов, и частоту наступления беременности после переноса эмбрионов на стадии бластоцисты.

**Методы:** В статье описаны 5 клинических случаев применения ионофора кальция после неудачных программ ИКСИ. Во всех случаях отмечалось нецентральное расположение пронуклеусов в предыдущих программах. Для коррекции расположения пронуклеусов в оплодотворенных ооцитах использовался ионофор кальция после метода ИКСИ.

**Результаты:** Наступление клинической беременности отмечалось в 80% случаев. После использования ионофора кальция 83% ооцитов были нормально оплодотворены и имели центральное расположение пронуклеусов. Также было получено 40% бластоцист хорошего и отличного качества. У 4-х пациенток наблюдалась одноплодная беременность и на данный момент все беременности окончились родами. Исход программы у 5-й пациентки остался неизвестен.

**Заключение:** Активация ооцитов ионофором кальция после ИКСИ может быть использована для коррекции локализации пронуклеусов, что может влиять на эффективность имплантации бластоцисты и, соответственно, на благополучный исход программы ВРТ.

**Ключевые слова:** Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит, ионофор кальция, пронуклеусы, искусственная активация ооцитов (ИАО), беременность.

**Введение:** При оплодотворении у млекопитающих сперматозоид инициирует серию физиологических реакций, которые активируют развитие зрелого ооцита, задержанного в метафазе II, в зиготу и ранний эмбрион. В метафазе II у ооцитов млекопитающих наблюдается отчетливая серия колебаний концентрации свободного цитозольного Ca<sup>2+</sup>, которые продолжаются в течение нескольких часов после взаимодействия гамет [1]. Иницирование колебаний концентрации кальция в цитоплазме ооцита происходит при взаимодействии с белками сперматозоида – фосфолипазой C дзета (англ. Phospholipase C  $\zeta$ , PLC $\zeta$ ) и факторами активации сперматозоидов (англ. Sperm-born Oocyte Activating Factors, SOAF), среди которых наибольшее внимание уделено постакрыосомальному WW-домен-связывающему белку (англ. Post Acrosomal WW-Domain-binding Protein, PAWP) [2]. Перечисленные протеины играют решающую роль в инициации колебаний Ca<sup>2+</sup> и, следовательно, в успехе нормального развития зиготы. Мутации и аномалии PAWP, а также дефицит свободного Ca<sup>2+</sup> могут негативно сказываться на эффективности оплодотворения и дробления вследствие недостаточной активации ооцитов (ИАО). Это остается основной причиной полного отсутствия или низкого уровня оплодотворения в программах ВРТ. В настоящее время для преодоления этой проблемы рассматриваются различные подходы к искусственной активации ооцитов (ИАО), включающие механические, электрические или химические стимулы [3].

ИАО применяется в области репродуктивной медицины уже более 10 лет и показывает высокую эффективность у пар с полным отсутствием оплодотворения и тяжелыми случаями мужского бесплодия [4-8], но остается экспериментальной методикой. ИАО исследуется на животных моделях с 1970х годов. Первые исследования показали, что химический стимул ионофором A23187 высвобождает Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных запасов, а прямая инъекция Ca<sup>2+</sup> в яйцеклетки мыши индуцирует развитие партеногенетических эмбрионов, которые доходили до стадии бластоцисты [9]. ИАО не имитирует процесс оплодотворения в точности, но вызывает один большой

скачок  $Ca^{2+}$ . Поэтому наиболее распространенный протокол активации яйцеклеток человека включает готовый к использованию ионофор A23187 после интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) [10].

Помимо прочего, свободный цитозольный кальций оказывает влияние на локализацию и слияние пронуклеусов в зиготе. Он участвует в ингибировании работы циклин-зависимых протеинкиназ и инициирует продолжение клеточного цикла яйцеклетки [3].

В настоящее время происходит поиск диагностических подходов в прогнозировании НАО в программах ВРТ. Так, использование иммунофлуоресцентного анализа гена фосфолипазы С дзета в сперматозоидах позволяет с высокой точностью определять вероятность НАО и возможность применения таргетной терапии у пациентов с аномалиями этого протеина [11].

Мы предполагаем, что при дефиците свободного кальция может наблюдаться оплодотворение с нецентральным расположением пронуклеусов. Часто при подсадке эмбрионов, развившихся из таких зигот, беременность не наступает. Ионофор кальция может быть рекомендован для ИАО у пар, имеющих в анамнезе неудачные попытки ИКСИ, периферическую локализацию пронуклеусов в ооцитах или отсутствие беременности после переноса бластоцист, сформировавшихся из зигот с нецентральным расположением ядер.

**Цель исследования** – изучить влияние ионофора кальция на расположение пронуклеусов в зиготах, развившихся из недостаточно активированных ооцитов, и частоту наступления беременности после переноса эмбрионов на стадии бластоцисты.

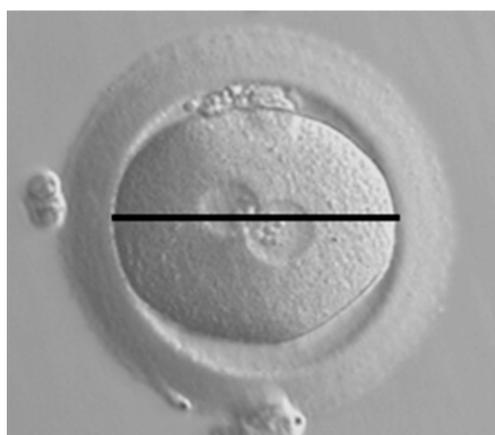
**Материалы и методы:** В нашем исследовании участвовали 5 пар с первичным бесплодием, из них у двух наблюдалось бесплодие неясного генеза. В трёх парах у

мужчин отмечалось снижение концентрации и морфологии сперматозоидов, а при оплодотворении в зиготах пронуклеусы имели нецентральное положение, что свидетельствовало о НАО. В предыдущих циклах (1-2 попытки) у этих пар не применялся ионофор кальция. В нашей статье мы провели сравнение пациентов одной и той же группы, у которых в предыдущей попытке мы не применяли ионофор кальция, а во второй попытке использовали ионофор. В предыдущих попытках (без ионофора) нами были получены в среднем 5 ооцитов, из них были успешно оплодотворены 79%. При этом, все зиготы имели нецентральное расположение пронуклеусов. После переноса бластоцист случаев беременности отмечено не было.

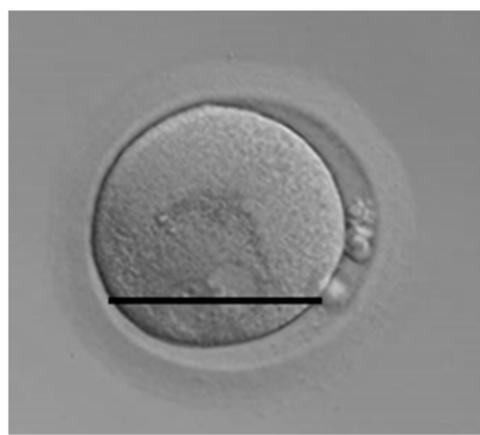
Процедура ИКСИ проводилась стандартным методом [12] на инвертированном микроскопе Olympus IX73. ИАО проводили при помощи ионофора кальция (94260, Kitazato Corp., Япония) в течение 10 минут после инъекции сперматозоида. После осуществлялась промывка клеток культуральной средой (SAGE, Дания) и дальнейшее культивирование до 5-х суток при 37°C и 6.3%  $CO_2$  в инкубаторе ESCO MIRI TL. Оценка оплодотворения осуществлялась спустя 16–18 часов. Перенос эмбрионов в полость матки осуществлялся на 5 сутки.

Так как данная методика является экспериментальной, то активация ионофором кальция была проведена с письменного разрешения пациентов.

**Результаты:** В цикле, где для ИАО был использован ионофор кальция, было получено 83% корректно оплодотворенных ооцитов. Из них, 88% имели центральное расположение пронуклеусов (рисунок 1 А), а оставшиеся 12% – нецентральное (рисунок 1 Б). Бластоцисты, развившиеся из зигот с центральным положением пронуклеусов, были отобраны для переноса в полость матки (таблица 1).



А



Б

Рисунок 1 – Центральное (А) и нецентральное (Б) расположение пронуклеусов

Таблица 1 – Результаты программ ВРТ с применением ионофора кальция у 5 пар с первичным бесплодием

Показатели	Группы			
	Ионофор кальция (-)		Ионофор кальция (+)	
	Средний показатель на пациента (общий показатель в группе)	%	Средний показатель на пациента (общий показатель в группе)	%
Число ооцитов	7±3 (42)		8±2 (41)	
Частота оплодотворения	5±2 (31)	79%	6±3 (34)	83%
Наступление дробления	4±2 (29)	93,5%	6±3 (32)	94%
Частота бластуляции	3±1(14)	48%	4±1(18)	56%
Частота имплантации	0 (5)	0%	4 (5)	80%
Частота наступления клинической беременности	0 (5)	0%	4 (5)	80%
Частота живорождения	0 (5)	0%	4 (5)	80%
Полное отсутствие оплодотворения	11 (42)	26%	9 (41)	22%

Наступление беременности было отмечено у 4 из 5 (80%) пациенток, все эти беременности окончились родами. Статус одной из пациенток остался неизвестен.

**Обсуждение:** На сегодняшний день все большее число исследований показывают эффективность и безопасность применения для ИАО химических индукторов, таких как ионофоры. Это положительно влияет на частоту оплодотворения, образования бластоцист, имплантации, наступления беременности и повышает коэффициент живорождения, причем не сказывается на частоте выкидышей, врожденных аномалий и соотношении полов у рожденных детей [13, 14]. E. Isachenko et al. также рассмотрели применение ионофора кальция у пациентов с нецентральной локализацией пронуклеусов и отметили успешное наступление беременности при коррекции ионофором [15]. Исследователями из Турции показана эффективность применения ионофора кальция у 946 пациенток со сниженным овариальным резервом при нормальных параметрах спермы их партнеров: частота оплодотворения, имплантации, беременности и живорождения для группы с ионофором кальция и контрольной группы составили 60,7% и 55,4%, 12,8% и 10,7%, 21% и 12,8% и 10,9% и 6,1%, соответственно [16].

**Заключение:** Наше исследование показало, что применение ионофора кальция у пациенток, прошедших ряд неудачных программ ИКСИ (1-2 неудачных попыток на пару), позволяет скорректировать последствия НАО. Искусственная активация ооцитов ионофором кальция положительно сказалась на результатах имплантации эмбриона и наступления беременности. Из 4 известных случаев все завершились рождением здоровых детей. Необходимо собрать больше статистических данных для исследования, чтобы подтвердить реальность улучшения процедуры коррекции пронуклеусов с использованием ионофора кальция.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Swann K. The role of Ca<sup>2+</sup> in oocyte activation during In Vitro fertilization: Insights into potential therapies for rescuing failed fertilization // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* – 2018. – Vol. 1865, №11, Part B. – P. 1830-1837. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.05.003>.
2. Zafar M.I., Lu Sh., Li H. Sperm–oocyte interplay: an overview of spermatozoon’s role in oocyte activation and current perspectives in diagnosis and fertility treatment // *Cell Biosci.* – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 4. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00520-1>.
3. Kashir J., Ganesh D., Jones C, Coward K. Oocyte activation deficiency and assisted oocyte activation: mechanisms, obstacles and prospects for clinical application // *Hum. Reprod. Open.* – 2022. – Vol. 2022, № 2. – P. hoac003. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoac003>.
4. Chansel–Debordeaux L., Dandieu S., Bechoua S., Jimenez C. Reproductive outcome in globozoospermic men: update and prospects // *Andrology.* – 2015. – Vol. 3, № 6. – P. 1022-1034. <https://doi.org/10.1111/andr.12081>.
5. Eftekhar M., Janati S, Rahsepar M., Aflatoonian A. Effect of oocyte activation with calcium ionophore on ICSI outcomes in teratospermia: A randomized clinical trial // *Iran. J. Reprod. Med.* – 2013. – Vol. 11, № 11. – P. 875-882. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3941389/>.
6. Sanusi R., Yu Y., Nomikos M., Lai F.A., Swann K. Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase C $\zeta$  // *Mol. Hum. Reprod.* – 2015. – Vol. 21, № 10. – P. 783-791. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav042>.
7. Tavalae M., Nasr–Esfahani M.H. Expression profile of PLC $\zeta$ , PAWP, and TR-KIT in association with fertilization potential, embryo development, and pregnancy outcomes in globozoospermic candidates for intra–cytoplasmic sperm injection and artificial oocyte activation // *Andrology.* – 2016. – Vol. 4 (5). – P. 850-856. <https://doi.org/10.1111/andr.12179>.
8. Janghorban–Laricheh E., Ghazavi–Khorasgani N., Tavalae M., Zohrabi D., Abbasi H., Nasr-Esfahani M. An association between sperm PLC $\zeta$  levels and varicocele? // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2016. – Vol. 33, № 12. – P. 1649-1655. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5171900/>.
9. Anifandis G., Michopoulos A., Daponte A., Chatzimeletiou K., Simopoulou M., Messini K., Polyzos N., Vassiou K., Dafopoulos K., Goulis D. Artificial oocyte activation: physiological, pathophysiological and ethical aspects // *Syst. Biol. Reprod. Med.* – 2019. – Vol. 65 (1). – P. 3-11. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1516000>.
10. Miller N, Biron–Shental T., Sukenik–Halevy R., Klement A.H., Sharony R., Berkovitz A. Oocyte activation by calcium ionophore and congenital birth defects: a retrospective cohort study // *Fertil. Steril.* – 2016. – Vol. 106, № 3. – P. 590-596.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.04.025>.
11. Jones C., Meng X., Coward K. Sperm factors and egg activation: Phospholipase C zeta (PLCZ1) and the clinical diagnosis of oocyte activation deficiency // *Reprod. Camb. Engl.* – 2022. – Vol. 164 (1). – P. F53-F66. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0458>.
12. Jose De Los Santos M., Apter S., Coticchio G., Debrock S., Lundin K., Plancha C.E., Prados F., Rienzi L., Verheyen G., Woodward B., Vermeulen N. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015) // *Hum. Reprod.* – 2016. – Vol. 31 (4). – P. 685-686. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew016>.
13. Shan Y., Zhao H., Zhao D., Wang J., Cui Y., Bao H. Assisted Oocyte Activation with Calcium Ionophore Improves Pregnancy Outcomes and Offspring Safety in Infertile Patients: A Systematic Review and Meta–Analysis // *Front. Physiol.* – 2022. Vol. 12. – P. 751905. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.751905>.
14. Darwish E., Magdi Y. A preliminary report of successful cleavage after calcium ionophore activation at ICSI in cases with previous arrest at the pronuclear stage // *Reprod. Biomed. Online.* – 2015. – Vol. 31 (6). – P. 799-804. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.08.012>.
15. Isachenko E., Isachenko V/, Todorov P., Ostashko V., Kreienberg R., Kaufmann M., Sterzik K., Wiegratz I. Pregnancy after the calcium ionophore correction of pronuclei position in oocytes after intracytoplasmic sperm injection // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 94 (7). – P. 2770.e3-5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.034>.
16. Caglar Aytac P., Bulgan Kilicdag E., Haydardedeoglu B., Simsek E., Cok T., Ayse Parlakgumus H. Can calcium ionophore “use” in patients with diminished ovarian reserve increase fertilization and pregnancy rates? A randomized, controlled study // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol. 104 (5). – P. 1168-1174. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.1163>.

## КАЛЬЦИЙ ИОНОФОРЫН ҚОЛДАНУ АРҚЫЛЫ ООЦИТТЕРДЕГІ ПРОНУКЛЕУСТЕРДІҢ ОРНАЛАСУЫ ТҮЗЕТІЛГЕН ПАЦИЕНТТЕРДЕГІ ЖҮКТІЛІК ЖӘНЕ БОСАНУ

*М. П. Яхьярова<sup>1</sup>, И. А. Заставский<sup>1</sup>, А. В. Ким<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Репродуктивтік Медицина Институты, Алматы, Қазақстан Республикасы.*

### Андатпа

**Өзектілігі:** Қосалқы репродуктивті технологиялар (ҚРТ) әдістерін үздіксіз жетілдіру бедеуліктің көптеген түрлерін емдеуге көмектеседі. Қазіргі уақытта интрацитоплазмалық сперматозоидтың инъекциясы (ИКСИ) ұрықтандырылған ооциттерді алуға мүмкіндік беретін ауыр ерлер бедеулігі немесе идиопатиялық бедеулік жағдайында репродуктивті медицинада кеңінен қолданылады. Бірақ екі пронуклеусті зиготалардың өзі әрқашан дұрыс дамып, бластоциста сатысына жете алмайды. Қалыпты бластоцистаның түзілуінің маңызды критерийі – пронуклеустердің зиготадағы орталық орналасуы. ҚРТ бағдарламаларының тиімділігін арттыратын әдістерді іздеу – репродуктивті медицинадағы ең өзекті мәселелердің бірі болып табылады.

**Мақсаты** – ИКСИ бағдарламаларында кальций ионофорын қолдану арқылы пронуклеустердің орналасуын түзету нәтижесінде ооциттерден алынған бластоцисталарды жатыр қуысына тасымалдаудан кейінгі жүктілік және босану туралы хабарлау.

**Әдістер:** Біздің зерттеуіміз сәтсіз ИКСИ бағдарламаларынан кейін кальций ионофорын қолданудың 5 клиникалық жағдайын сипаттайды. Барлық жағдайларда алдыңғы бағдарламаларда пронуклеустердің орталық емес орналасуы байқалған. Ұрықтанған ооциттерде пронуклеустердің орналасуын түзету үшін интрацитоплазмалық инъекциядан кейін кальций ионофоры қолданылды.

**Нәтижелер:** Эмбриондар 5-ші күні жатыр қуысына тасымалданды. Клиникалық жүктіліктің басталуы 80% жағдайда байқалды. Кальций ионофорын қолданғаннан кейін интрацитоплазмалық сперматозоидтың инъекциясы жасалған ооциттердің 83% қалыпты түрде ұрықтандырылды және пронуклеустердің орталық орналасуына ие болды. Сондай-ақ жақсы және өте жақсы сапалы бластоцисттердің 40%-ы алынды. 4 науқаста бір ұрықты жүктілік байқалды және қазіргі уақытта барлық жүктілік босанумен аяқталды. 5-ші науқас бағдарламасының нәтижесі белгісіз болып қалды.

**Қорытынды:** ИКСИ-ден кейін кальций ионофорымен ооциттерді белсендіру пронуклеустердің орналасуын түзету үшін пайдаланылуы мүмкін, бұл бластоциста имплантациясының тиімділігіне және сәйкесінше ҚРТ бағдарламасының сәтті нәтижесіне әсер етуі мүмкін.

*Түйінді сөздер:* ICSI, кальций ионофоры, пронуклеустер, ооциттердің қосалқы активтенуі, жүктілік

## PREGNANCY AND CHILDBIRTH IN PATIENTS AFTER CORRECTION OF THE POSITION OF PRONUCLEI IN OOCYTES USING A CALCIUM IONOPHORE

*M. P. Yakhyarova<sup>1</sup>, I. A. Zastavskiy<sup>1</sup>, A. V. Kim<sup>1</sup>.*

*<sup>1</sup>Institute of Reproductive Medicine, Almaty, the Republic of Kazakhstan.*

### Abstract

**Relevance:** Continuous improvement of assisted reproductive technologies (ART) helps treat most types of infertility. Currently, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is widely used in reproductive medicine in cases of severe male or idiopathic infertility, which allows for obtaining fertilized oocytes. But even zygotes with two pronuclei cannot always develop correctly and reach the blastocyst stage. An important criterion for forming a normal blastocyst is the central location of the pronuclei in the zygote. The search for methods that increase the effectiveness of ART programs is one of the most current issues in reproductive medicine.

**The study aimed to** report pregnancy and childbirth after the transfer of oocyte-derived blastocysts due to pronuclear position correction using calcium ionophores in ICSI programs.

**Methods:** Our study describes five clinical cases of calcium ionophore use after unsuccessful ICSI programs. In all cases, the non-central position of the pronuclei was noted in previous programs. After intracytoplasmic injection, a calcium ionophore was used to correct the pronuclei position in fertilized oocytes.

**Results:** Embryos were transferred into the uterine cavity on Day 5. The onset of clinical pregnancy was noted in 80% of cases. After using calcium ionophore, 83% of oocytes that received intracytoplasmic sperm injection were normally fertilized and had a central position of pronuclei. Also, 40% of good to excellent-quality blastocysts were obtained. In 4 patients, a singleton pregnancy was observed, and at the moment, all pregnancies ended in childbirth. The outcome of the fifth patient's program remained unknown.

**Conclusion:** Activation of oocytes with a calcium ionophore after ICSI can be used to correct the position of pronuclei, which can affect the efficiency of blastocyst implantation and, accordingly, the successful outcome of the ART program.

*Keywords:* ICSI, calcium ionophore, pronuclei, assisted oocyte activation, pregnancy

**Данные авторов**

**Яхьярова Мухаббат Пархатовна** – магистр биотехнологии, рук. лаборатории ВРТ, ТОО «Центр ЭКО», Алматы, Казахстан, [yahyagova.m@irm.kz](mailto:yahyagova.m@irm.kz), <https://orcid.org/0000-0002-2885-5719>

**Заставский Иван Александрович** - эмбриолог лаборатории ВРТ, ТОО «Центр ЭКО», Алматы, Казахстан, [zastavskii.i@irm.kz](mailto:zastavskii.i@irm.kz), <https://orcid.org/0000-0001-8937-1200>

**Ким Алена Владиславовна** - магистр естеств. наук, эмбриолог, ТОО «Центр ЭКО», Алматы, Казахстан, [alyena982401@gmail.com](mailto:alyena982401@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-4504-8599>

**Адрес для корреспонденции:** Заставский И.А., ТОО «Центр ЭКО», ул. Кабанбай батыра 226, Алматы 050008, Республика Казахстан.

**Вклады авторов:**

Создание и редакция научной статьи, вклад в концепцию и интерпретация данных – **Яхьярова М.П.**

Сбор и анализ данных, создание научной статьи – **Заставский И.А.**

Сбор и анализ данных, создание научной статьи – **Ким А.В.**

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование исследования:** Авторы заявляют об отсутствии финансирования исследования.