

## Роль фаз клеточного цикла и морфологии пронуклеусов в жизнеспособности нативных и криоконсервированных зигот человека

М.П. ПЕТРУШКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Role of Cell Cycles Phases and Pronuclei Morphology in Viability of Native and Cryopreserved Zygotes

M.P. PETRUSHKO

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

Представлены результаты криоконсервирования эмбрионов человека, находящихся на стадии зиготы. Изучено влияние морфологии пронуклеусов на выживаемость зигот после замораживания-оттаивания. Определена роль фаз клеточного цикла в эффективности криоконсервирования зигот.

**Ключевые слова:** зигота, морфология пронуклеусов, криоконсервирование.

Представлено результати криоконсервування ембріонів людини, які знаходяться на стадії зиготи. Вивчено вплив морфології пронуклеусів на виживання зигот після заморожування-відігрівання. Визначена роль фаз клітинного циклу в ефективності криоконсервування.

**Ключові слова:** зигота, морфологія пронуклеусів, криоконсервування.

The cryopreservation results of human embryos being at zygote stage are presented. There was studied the effect of pronuclei morphology on zygote survival after freeze-thawing. The role of cell cycle phases in the zygote cryopreservation efficiency was found.

**Key-words:** zygote, morphology of pronuclei, cryopreservation

Понимание тонких механизмов раннего эмбриогенеза человека стало возможным с внедрением методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), в частности, оплодотворение ооцитов *in vitro*, культивирование эмбрионов, интрацитоплазматическая инъекция спермия в ооцит, доимплантационная генетическая диагностика.

В настоящее время для лечения бесплодия разработаны методы, позволяющие сохранить семейный генофонд. Однако эти технологии, в частности, криоконсервирование эмбрионов человека, требуют постоянного совершенствования, что обеспечит не только высокую выживаемость эмбрионов после замораживания-оттаивания, но и их генетическую полноценность, так как проявления повреждающего действия процесса криоконсервирования многообразны и влияют на различные уровни биологической структуры клетки.

Применяемые в настоящее время морфологические критерии для деконсервированных эмбрионов учитывают только количество бластомеров и степень фрагментации цитоплазмы [8]. Открытым остается вопрос оптимальной стадии развития доимплантационных эмбрионов человека

**Адрес для корреспонденции:** Петрушко М.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Understanding of intimate mechanisms of early human embryo genesis has become possible with introducing the methods of assisting reproductive technologies (ARTs), in particular, fertilization of oocytes *in vitro*, culturing of embryos, intracytoplasmatic injection of spermatozoa in oocyte, pre-implantation genetic diagnosis.

Today for infertility treatment there have been developed the methods enable preserving the family gene fund. However these technologies demand a constant improvement and, in particular, cryopreservation of human embryos providing not only high survival of embryos after freeze-thawing but also their genetic integrity, because the manifestations of cryopreservation damaging effect are versatile and affect different levels of cell biological structure.

Applied now morphological criteria for frozen-thawed embryos take into account only the number of blastomeres and degree of cytoplasm fragmentation [8]. The question of optimal development stage of human embryos for cryopreservation has remained open, since cleavage at later stages for human embryos is of asynchronous character and some blastomeres being either at S interphase stage or at the metaphase stage will occur to be sensitive to cryodamage factors.

**Address for correspondence:** Petrushko M.P., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

для криоконсервирования, поскольку дробление более поздних стадий эмбрионов человека носит асинхронный характер и некоторые бластомеры, находящиеся на стадии S интерфазы, либо на стадии метафазы, окажутся более чувствительны к факторам криоповреждения. Со стадии 2-х бластомеров эмбрионы человека характеризуются процессом фрагментации, который неблагоприятно влияет на их криорезистентность [1].

Цель исследований – изучение влияния морфологии зигот, находящихся в разных фазах клеточного цикла, на их выживаемость после замораживания-оттаивания.

### Материалы и методы

Эмбрионы человека, находящиеся на стадии зиготы, были получены у пациенток, проходивших курс лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). По стандартной технологии [2] зиготы были разделены на 4 группы. Изучали морфологические характеристики пронуклеусов контрольной группы и эмбрионов через 24 ч культивирования. Первая группа (контроль) – клетки без криоконсервирования. Зиготы второй группы криоконсервировали через 18, третьей – через 22 и четвертой – через 26 ч после инсеминации.

Морфологические особенности пронуклеусов (рис. 1) классифицировали по Scott [7]: I – зигота с равным количеством нуклеолей (3-7), которые выстроены для слияния в зоне контакта пронуклеусов; II – зигота с равным количеством нуклеолей, которые рассеяны по площади нуклеусов; III – зигота с пронуклеусами, отличающимися по количеству и размеру нуклеусов; IV – зигота с неравным количеством пронуклеусов, которые располагаются по периферии.

### Результаты и обсуждение

В данном исследовании контрольную группу составили 149, вторую и третью – по 113, четвертую – 80 зигот. В соответствии с морфологией пронуклеусов зиготы были распределены следующим образом (рис. 2): I тип морфологии зигот был сравним во всех группах и составил 27,5; 26,6; 21,2 и 17,4%; II – 32,9; 38,9; 24,8 и 28,8%; III – 22,8; 20,3; 30,1 и 28,8%; IV – 16,8; 14,2; 23,9 и 25% в первой, второй, третьей и четвертой группах соответственно.

Через 24 ч в контрольной группе нормально развивались более 87% клеток с I типом морфологии пронуклеусов. Аналогичные данные были характерны для III группы, в то время как зиготы II группы развились в нормальные эмбрионы только в 25%, остальные были либо заблокированы на стадии зиготы, либо характеризовались высокой

Starting from the stage of two blastomeres, human embryos are characterized with the fragmentation which unfavorably affects their cryoresistance [1].

The research aim was to study the effect of morphology of zygotes being at various phases of cell cycle on their survival after freeze-thawing.

### Materials and methods

Human embryos being at stage of zygote have been obtained from patients being treated of infertility by IVF using standard technique [2]. Zygotes were divided into 4 groups, there were studied morphological characteristics of pronuclei of the control group and those for embryos in 24 hrs of culturing. The first group (control) comprised the cells with no cryopreservation. Zygotes of the second group were cryopreserved in 18hrs, ones of the third group in 22hrs and the fourth in 26hrs after insemination.

Morphological peculiarities of pronuclei (Fig. 1) was classified by Scott [7]: I – zygote with equal number of nucleoli (3-7) which are ordered for fusion in pronuclei contact zone; II – zygote with equal number of nucleoli which are disseminated along nuclei area;

III – zygote with pronuclei differing on the number and size of nuclei; IV – zygote with unequal number of pronuclei which are located along periphery.

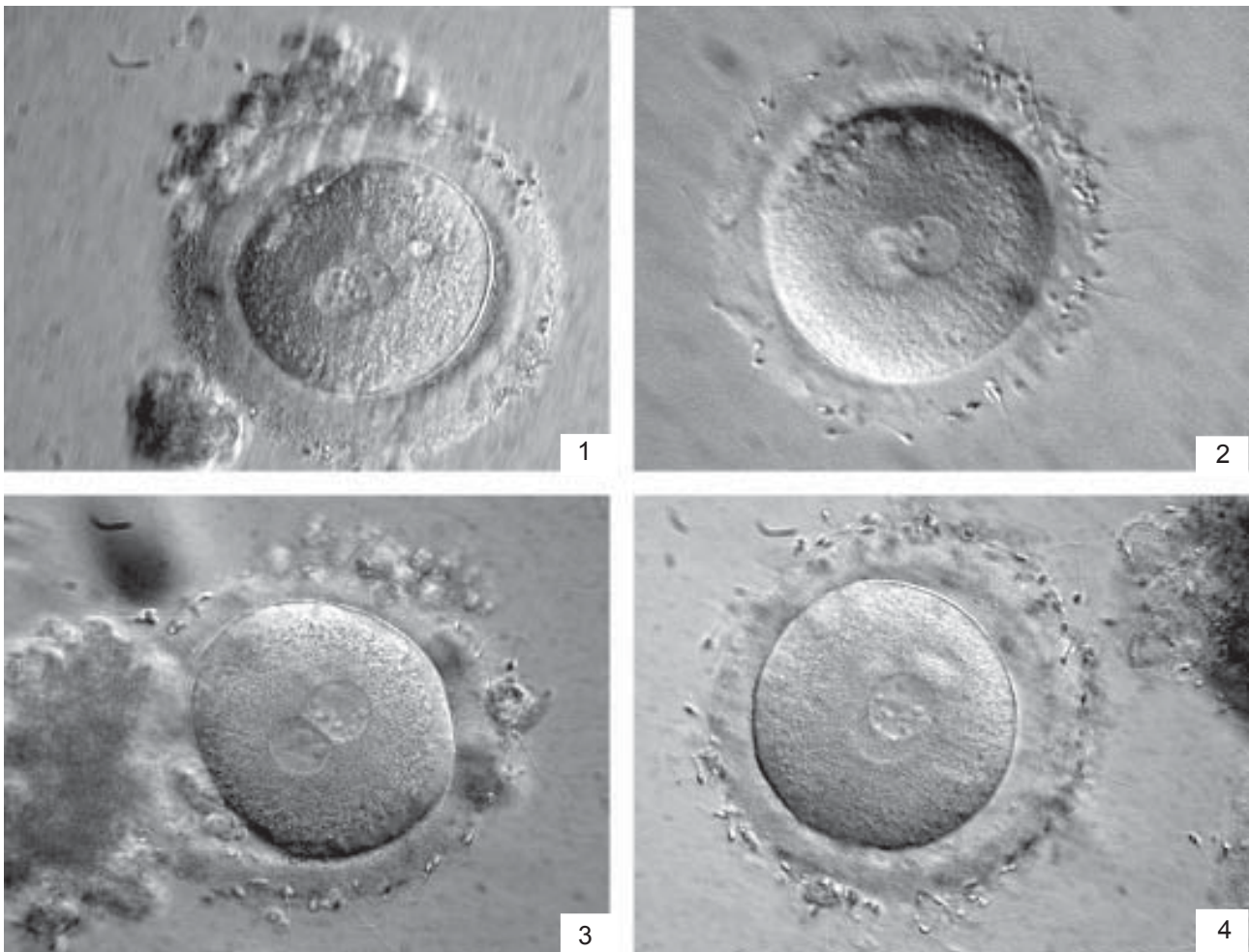
### Results and discussion

In given study the control group comprised 149 zygotes, 113 for the second and third one each, 80 for the fourth group. On pronuclei morphology these zygotes were distributed (Fig. 2) by the following way: zygote morphology type I was comparable in all groups and made 27.5, 26.6, 21.2 and 17.4%; type II made 32.9, 38.9, 24.8, 28.8%; type III did 22.8, 20.3, 30.1 and 28.8% and type IV made 16.8, 14.2, 23.9 and 25% in 1st, 2nd, 3rd and 4th groups, correspondingly.

In 24 hrs in the control group normal development was found in more than 87% cells with pronuclei morphology type I. Similar data were characteristic for the third group meanwhile zygotes of the second group developed into normal embryos only in 25% of cases, the rest were either blocked at zygote stage, or were characterized with a high degree of cytoplasm fragmentation. The same picture was observed at following development of zygotes of the fourth group.

Similar results were demonstrated for type II pronuclei. As for pronuclei morphology type III and IV in the control group only a half of all zygotes developed into morphologically integral embryos, whilst in the second group 99.7 and 100% of all zygotes of types III and IV did not renew mitosis.

The capability to endure the effect of cryopreservation factors depends on morphological, physiological, metabolic and genetic peculiarities of preimplantation embryos [6]. Consideration of nucleolus



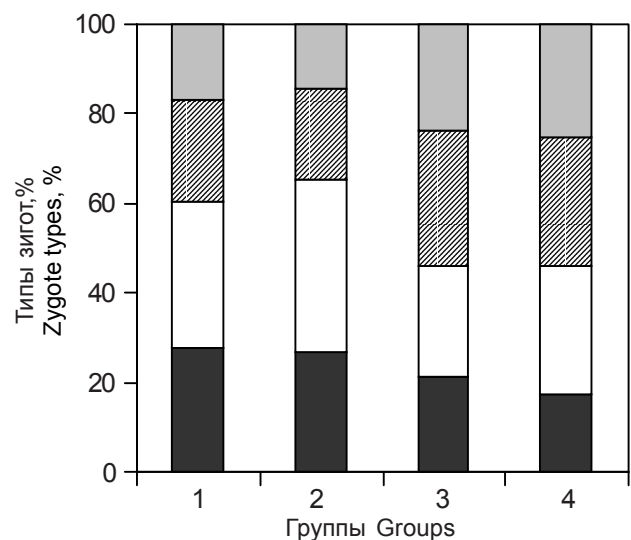
**Рис 1.** Морфологические особенности пронуклеусов зигот: 1 – I типа; 2 – II типа; 3 – III типа; 4 – IV типа. Нативный препарат.  $\times 600$ .

**Fig. 1.** Morphological peculiarities of pronuclei: 1 – zygote of type I; 2 – zygote of type II; 3 – zygote of type III; 3 – zygote of type IV. Native preparation.  $\times 600$ .

степенью фрагментации цитоплазмы. Сходная картина наблюдалась при дальнейшем развитии зигот IV группы.

Аналогичные результаты были продемонстрированы для II типа пронуклеусов. Что касается III и IV типов морфологии пронуклеусов, то в контрольной группе только половина всех зигот развилась в морфологически полноценные эмбрионы, тогда как во второй группе 99,7 и 100% всех зигот III и IV типов не возобновили митоз (таблица).

Способность переносить влияние факторов криоконсервирования зависит от морфологических, физиологических, метаболических и генетических особенностей доимплантационных эмбрионов [6]. Учет морфологии ядрышек имеет существенное значение в морфофункциональной оценке состояния клетки, так как с ядрышками связаны процессы транскрипции и трансформации рибосомальной РНК [4]. Размеры и структура большинства ядрышек коррелируют с объемом клеточного белкового синтеза, выявляемого биохимическими



**Рис 2.** Наличие встречаемости различных типов зигот в исследуемых группах: □ – I тип; ▨ – II тип; □ – III тип; ■ – IV тип.

**Fig. 2.** Presence of various zygote types in the groups under study: □ – I type; ▨ – II type; □ – III type; ■ – IV type.

методами. Размеры ядрышек зависят также от функции и типа клеток. Эмбриональный геном, играющий важнейшую роль самых первых этапов развития, является ведущим звеном в регуляции эмбриогенеза. Ядро служит единственным носителем информации уже на доимплантационной стадии и через его взаимодействие с цитоплазмой реализуется программа эмбриогенеза.

### Выводы

В проведенном нами исследовании выявилось, что морфология ядрышек коррелирует с выживаемостью зиготы после криоконсервирования. Очевидно, индивидуальные характеристики в качественных и количественных характеристиках синтеза РНК и белков влияют на криорезистентность зигот человека.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости криоконсервирования зигот через 22 ч после инсеминации, когда четко визуализируются 2 пронуклеуса. В это время зигота находится в G2 фазе клеточного цикла. Ранние зиготы более чувствительны к процессу замораживания-оттаивания, чем зиготы, находящиеся в фазе G2. Зиготы, находящиеся в стадии, предшествующей митозу (26 ч после инсеминации), наиболее восприимчивы к повреждающему действию факторов криоконсервирования, что выражается в дальнейшем блокировании их развития. Наши данные позволяют объяснить противоре-

morphology is of great importance in morphofunctional evaluation of cell state, as the processes of ribosomal RNA transcription and transformation are associated with nucleoli [4]. Sizes and structure in most nucleoli correlate with volume of a cell protein synthesis, detected with biochemical methods. Nucleoli sizes depend on cell function and type as well. Embryonic genome, playing an important role at first stages of development, is a guide link in regulating embryogenesis. Nucleus is a unique carrier of information even at preimplantation stage and via its interaction with cytoplasm the program of embryogenesis is realized.

### Conclusions

In our research the morphology of nucleoli was revealed to correlate with zygote survival after cryopreservation. Evidently, individual features in qualitative and quantitative characteristics of RNA and proteins synthesis affect cryoresistance of human zygotes.

The results obtained testify to the fact that zygotes need to be cryopreserved 22 hrs after insemination, when 2 pronuclei are distinctly visualized. In that time zygote is in G2 cell cycle phase. Early zygotes are more sensitive to freeze-thawing, than those in G2 phase. Zygotes, being in stage, preceded mitosis (26 hrs after insemination), are the most susceptible to a damaging effect of cryopreservation factors, that is manifested in following blocking of their development. Our data enables to explain the contradictory results

Частота образования морфологически нормальных и аномальных эмбрионов в нативных и криоконсервированных зиготах человека в зависимости от исходного типа морфологии пронуклеусов  
Frequency of formation of morphologically normal and abnormal embryos in native and cryopreserved human zygotes depending on an initial type of pronuclei morphology

Тип зигот Zygote type	Нативные эмбрионы (контроль) Native embryos (control)		Криоконсервированные эмбрионы Cryopreserved embryos					
	Нормальное развитие Normal development	Аномальное развитие Abnormal development	18 ч (1-я группа) 18 hrs (1st group)		22 ч (2-я группа) 22 hrs (2nd group)		26 ч (3-я группа) 26 hrs (3rd group)	
			Нормальное развитие Normal development	Аномальное развитие/ блок Abnormal development/ block	Нормальное развитие Normal development	Аномальное развитие/ блок Abnormal development/ block	Нормальное развитие Normal development	Аномальное развитие/ блок Abnormal development/ block
I	36 (87,8)	5 (12,2)	6 (25)*	18 (75)	24 (80)	6 (20)	2 (14,3)*	12 (85,7)
II	40 (81,6)	9 (18,4)	4 (14,3)*	2 (85,7)	30 (68,2)	14 (31,8)	4 (117,4)*	19 (82,6)
III	20 (58,8)	14 (41,2)	1 (0,3)*	33 (99,7)	10 (43,5)	13 (56,5)	1 (4,3)*	22 (95,6)
IV	13 (52,0)	12 (48,0)	0 (0)**	27 (100)	2 (12,5)**	14 (87,5)	0**	20 (100)

**Примечания:** \* – отличия достоверны по сравнению с контролем и второй группой; \*\* – отличия достоверны по сравнению с контролем.

**Notes:** \* – differences are statistically significant in comparison with the control and the 2<sup>nd</sup> group; \*\* – differences are statistically significant in comparison with the control.

чивые результаты многих исследователей о преимуществах [3] либо бесперспективности [5] криоконсервирования эмбрионов человека на стадии зиготы.

of many researchers on the advantages [3] or perspectiveless [5] of human embryo cryopreservation at zygote stage.

### Литература

1. Петрушко М.П. Морфологические характеристики нативных и криоконсервированных эмбрионов человека // Экспериментальная и клиническая медицина.– 2005.– №2.– С.45-50.
2. Элдер К., Эйвери С., Миллз К. IVF. Лабораторные процедуры // Bourn-hallam group, 1990.– 23 с.
3. Balakier H., MacLusky N., Casper R. Characterization of the first cell cycle in human zygotes: implication for cryopreservation // Fertil. Steril.– 1993.– Vol. 59.– P. 359-365.
4. Braude P., Bolton V., Moore S. Human gene expression first occurs between the four and eight-cell stage of pre-implantation development // Nature.– 1988.– Vol. 332.– P.459-461.
5. Brezinova J., Oborna I., Fingerova H. et al. Efficiency of cryoembryotransfer using embryos frozen in the pronuclear stage // Česka Gynekol.– 2004.– Vol. 69.– P. 167-172.
6. Mohr L., Trounson A. Cryopreservation of human embryos // Annals of the NY Acad.Sc.– 1985.– Vol. 442.– P. 536-543.
7. Scott L., Alvero R., Leondires M. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation // Hum. Reprod.– 2002.– Vol. 15.– P. 2394–2403.
8. Viiska S., Tiitinen A., Hyden-Granskog C. et al. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth // Hum. Reprod.– 1999.– Vol. 14.– P. 2392–2395.

### References

1. Petrushko M.P. Morphological characteristics of native and cryopreserved human embryos// Eksperimental'naya i klinicheskaya meditsina.– 2005.– N 2.– P.45-50
2. Elder K., Avery S., K Mills. IVF. Laboratory procedures// Bourn-hallam group.– 1990.– 23 p.
3. Balakier H., MacLusky N., Casper R. Characterization of the first cell cycle in human zygotes: implication for cryopreservation // Fertil. Steril.– 1993.– Vol. 59.– P. 359-365.
4. Braude P., Bolton V., Moore S. Human gene expression first occurs between the four and eight-cell stage of pre-implantation development // Nature.– 1988.– Vol. 332.– P.459-461.
5. Brezinova J., Oborna I., Fingerova H. et al. Efficiency of cryoembryotransfer using embryos frozen in the pronuclear stage // Česka Gynekol.– 2004.– Vol. 69.– P. 167-172.
6. Mohr L., Trounson A. Cryopreservation of human embryos // Annals of the NY Acad.Sc.– 1985.– Vol. 442.– P. 536-543.
7. Scott L., Alvero R., Leondires M. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation // Hum. Reprod.– 2002.– Vol. 15.– P. 2394–2403.
8. Viiska S., Tiitinen A., Hyden-Granskog C. et al. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth // Hum. Reprod.– 1999.– Vol. 14.– P. 2392–2395.

Accepted in 18.01.2005

Поступила 18.01.2005