

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет «Києво-Могилянська академія»  
Факультет природничих наук  
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

**Кваліфікаційна робота**  
освітньо-кваліфікаційний рівень магістр

на тему **«ОЦІНКА ВПЛИВУ МАРКЕРУ ОВАРІАЛЬНОГО РЕЗЕРВУ,  
ІНДЕКСУ МАСИ ТІЛА, ВІКУ ТА ПОВТОРНИХ СТИМУЛЯЦІЙ  
ЯЄЧНИКІВ НА РОЗВИТОК ГАМЕТ У ДОНОРОК ООЦИТІВ»**

Виконала: студентка 2-го року  
навчання  
Спеціальності 091 Біологія  
**Вовк Юлія Сергіївна**

Керівники:  
Білько Н. М., доктор медичних наук,  
професор, зав. кафедри лабораторної  
діагностики біологічних систем  
НаУКМА, заслужений працівник  
освіти України

Мельник Н. В., лікар лаборант-  
генетик, клініка генетики репродукції  
«Вікторія»

Рецензент:  
Бадюк В. М., доцент, кандидат  
медичних наук

Кваліфікаційну роботу захищено з  
оцінкою \_\_\_\_\_

Секретар ЕК Пахаренко М. В.  
«\_\_\_» червня 20\_\_ року

## ЗМІСТ

Стор.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ДІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Репродуктивні характеристики жінок.....	7
1.1.1. Репродуктивне старіння.....	7
1.1.2. Оцінка оваріального резерву жінки.....	9
1.2. Морфологія жіночих гамет.....	11
1.2.1. Ядерна та цитоплазматична компетентність яйцеклітини.....	11
1.2.3. Зовнішній вигляд ооцитів.....	14
1.2.4. Вплив зовнішніх та внутрішніх факторів на морфологію ооцитів.....	16
1.3. Донорство гамет як один із методів допоміжних репродуктивних технологій.....	17
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	20
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	20
2.1. Об'єкт та схема дослідження.....	20
2.2. Витратні матеріали, обладнання та реактиви.....	21
2.3. Підготовка середовищ та лабораторного посуду.....	22
2.4. Методи дослідження.....	23
2.4.1. Забір клітин ооцит-кумулясного комплексу.....	23
2.4.2. Денудація клітин ооцит-кумулясного комплексу.....	24
2.4.3. Статистична обробка результатів.....	26
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	28
3.1. Вплив віку донорок на характеристики ооцитів.....	28
3.2. Вплив показників індексу маси тіла на характеристики гамет.....	31
3.3. Вплив показників антимюллерового гормону на кількісні та якісні характеристики статевих клітин.....	35

3.3.1. Основні порушення морфології ооцитів .....	39
3.4. Вплив повторних контрольованих стимуляцій яєчників на кількісні та якісні характеристики ооцитів.....	44
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	48
ВИСНОВКИ .....	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	52

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

АМГ	– антимюллерів гормон
ГнРГ	– гонадотропін-рилізінг-гормон
ДРТ	– допоміжні репродуктивні технології
КАФ	– кількість антральних фолікулів
КСЯ	– контрольована стимуляція яєчників
ЛГ	– лютеїнізуючий гормон
ОКК	– ооцит-кумулюсний комплекс
ФСГ	– фолікулостимулюючий гормон
цАМФ	– циклічний аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклічний гуанозинмонофосфат
NSN	– неоточений нуклеус (англ. non-surrounded nucleolus)
PB	– полярне тільце (англ. polar body)
PVS	– перивітеліновий простір (англ. perivitelline space)
SERa	– кластери гладкого ендоплазматичного ретикулуму (англ. smooth endoplasmic reticulum aggregates)
SN	– оточений нуклеус (англ. surrounded nucleolus)
ZR	– блискуча оболонка (англ. zona pellucida)

## ВСТУП

Попри значний розвиток допоміжних репродуктивних технологій, питання безпліддя все ще залишається проблемою, при цьому в Україні випадки жіночого безпліддя реєструються у 3,5 рази частіше, ніж чоловічого. Під безпліддям слід розуміти ненастання вагітності протягом 1 року у подружньої пари репродуктивного віку з урахуванням активного сексуального життя без використання контрацепції. За даними статистики 2020 року в Україні серед розпочатих лікувальних циклів за методами допоміжних репродуктивних технологій близько 8,6% припадає на донацію ооцитів [66], що є альтернативою для жінок, які не мають змоги отримати потомство за допомогою власних статевих клітин.

Для пар, переважно із жіночим чинником неплідності та жінок старшого репродуктивного віку, використання донорських яйцеклітин є єдиним ефективним рішенням для досягнення вагітності. Як показує практика, дана процедура має досить високу результативність, однак залежить від певних факторів, у тому числі і від віку реципієнта, методу запліднення та якості отриманих ооцитів від донора. З урахуванням вищесказаного, перевага для участі у програмах донації надається молодим здоровим жінкам, адже у такому разі вища імовірність отримати зрілі ооцити задовільної якості, що є визначальним фактором якості ембріонів та їх раннього розвитку, а отже і подальшого успіху імплантації та настання клінічної вагітності.

Таким чином, оцінка якості морфології ооцитів метафази II та урахування факторів впливу, є важливим критерієм для покращення результатів лікування пацієнтів, що потребують залучення донорських гамет у циклах допоміжних репродуктивних технологій.

**Мета роботи** – визначення основних факторів, що впливають на кількісні та якісні характеристики донорських статевих клітин у контексті допоміжних репродуктивних технологій.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. визначити вплив віку донорок на характеристики отриманих ооцитів;
2. дослідити зв'язок між показниками індексу маси тіла та кількістю ооцитів;
3. оцінити вплив показників антимюллерового гормону на загальний вихід отриманих ооцитів та порушення їх морфології;
4. проаналізувати різні типи порушень морфології в отриманих ооцитів;
5. визначити взаємозв'язок між частотою процедур донації та характеристиками отриманих ооцитів.

**Об'єкт** – репродуктивна функція жінок, що беруть участь у донорських програмах.

**Предмет** – компетентність гамет в учасниць донорських програм.

Роботу виконано на базі клініки генетики репродукції "Вікторія", відділу ембріології у складі клінічного відділення.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Репродуктивні характеристики жінок

**1.1.1. Репродуктивне старіння.** У сучасному суспільстві все частіше спостерігається тенденція до відкладеного материнства, при цьому жінки мають дещо завищені очікування від можливостей процедур допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), оскільки не враховують фактор природного старіння власної репродуктивної системи. Репродуктивне старіння жінок характеризується виснаженням пулу фолікулів у яєчниках та зниженою якістю ооцитів з віком, що зрештою призводить до настання менопаузи [24].

Такі обмеження репродуктивного потенціалу з віком пов'язуються із закладенням визначеного невідновлюваного пулу фолікулів у яєчниках ще на етапі ембріогенезу. У середньому кількість ооцитів у новонароджених становить близько 2 млн, у період статевого дозрівання – 300-500 тис., тоді як з віком їх число стрімко падає сягаючи близько 1000 у період менопаузи. Частина статевих клітин втрачається ще на стадії оогоній шляхом апоптозу, інша частина гине за рахунок атрезії фолікулів, що не досягли овуляції, при цьому в середньому за життя овулює не більше 400-500 клітин [24, 65]. Досягнення певного порогу виснаження пулу фолікулів призводить до оваріальної недостатності та зниження фертильності. Таким чином, настання менопаузи фізіологічно припадає на вік від 45 до 55 років. Як бачимо, порівняно з іншими системами органів, старіння репродуктивної системи жінок відбувається на порядок раніше, що певним чином нівелює дану проблему та занепокоєння стосовно настання вагітності після 35-40 років. У даному аспекті жіноча репродуктивна система дещо поступається чоловічій, оскільки сперматозоїди виробляються безперервно протягом життя у статевозрілих чоловіків, при цьому цикл сперматогенезу триває 72 дні, однак

поступове зниження репродуктивної функції для чоловіків теж характерне [37].

З іншого боку, старіння жінки включає і зниження компетентності ооцитів, що обумовлюється низкою причин, включно з дефектами епігенетичної регуляції, метаболічної активності чи сегрегації хромосом [22, 65], що може призводити до підвищеного ризику анеуплоїдії.

Мікросередовище яєчників з віком також зазнає негативних змін, як от поява запалення чи фіброзних осередків, що опосередковано впливає на дозрівання фолікулів та в свою чергу компетентність ооцитів. Беззаперечно, старіння яєчників обумовлює зменшення кількості оваріальних фолікулів, однак залишається невизначеним сам механізм їх втрати, попри те, що рушійною силою даного процесу визнано апоптоз [18, 53].

Затримка примордіальних фолікулів на стадії профазі мейозу I призводить до накопичення ооцитами пошкоджень ДНК, що робить їх більш уразливими до впливів інших токсичних речовин. Дослідження Titus et al. показали, що система репарації ДНК порушується у жінок після 36 років, однак механізми даного процесу залишаються маловивченими [54]. Що цікаво, клітини гранульози у фолікулах також можуть накопичувати пошкодження з віком, зокрема це стосується плоских клітин у первинних фолікулах, що не здатні до проліферації, доки не будуть активовані [22]. Таким чином, у клітинах гранульози відзначаються процеси, що негативно впливають на дозрівання ооцитів високої якості, включно із підвищеним окислювальним пошкодженням ліпідів, білків чи ДНК, порушенням виведення активних форм кисню і т.д.

Гостро стоїть питання впливу мтДНК на якість ооцитів, у дослідженнях Yang et al. за допомогою кількісного визначення в ооцитах мутацій мтДНК було доведено їх накопичення зі старінням [62]. Тоді як, ці дані нівелюють попередні дослідження Voucret et al. стосовно зв'язку накопичення гетероплазматичних мутацій зі старінням яєчників [11]. При цьому етіологія мітохондріальної дисфункції досі залишається невідомою.

Одним із головних наслідків репродуктивного старіння жінок є зниження фертильності, що характеризується проблемами із зачаттям чи виношуванням плоду, окрім того збільшується ризик викидню та ускладнень під час вагітності [22, 38, 64]. Спроби завагітніти у жінок старшого репродуктивного віку навіть після контрольованих стимуляцій яєчників (КСЯ) у циклах ДРТ часто закінчуються невдачею, що значною мірою обумовлено дефектами яйцеклітин, використання донорських клітин дозволяє уникнути цього впливу та підвищує шанси для настання вагітності.

**1.1.2. Оцінка оваріального резерву жінки.** Тривалість нормальної репродуктивної функції жінки визначається кількістю закладених фолікулів із яйцеклітинами потенційно здатними до запліднення, що представляють оваріальний резерв та дають уявлення про фертильний потенціал яєчників. Зокрема, оцінка оваріального резерву надає інформацію про фолікули, які можуть бути стимульовані, та ооцити, які можуть бути вилучені з яєчника, що дозволяє спрогнозувати відповідь яєчників на контрольовану стимуляцію [2, 57].

Основними маркерами оваріального резерву є біохімічне визначення фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) у поєднанні з естрадіолом на 3 день менструального циклу, антимюллерового гормону (АМГ) та підрахунок кількості антральних фолікулів (КАФ) за допомогою трансвагінального ультразвукового дослідження.

ФСГ секретується передньою часткою гіпофіза та головним чином контролює дозрівання доміантних фолікулів із антральних, при цьому значне підвищення його рівнів асоціюється зі зниженням резерву, коли для стимулювання фолікулогенезу необхідні вищі дози гормону. Однак варто зауважити, що показники ФСГ досить варіабельні залежно від часу доби та коливань циклу чи між циклами, тому вимірювання у лютеїновій фазі призводять до хибних результатів, при цьому функціонування гіпоталамо-гіпофізарної вісі має бути в нормі. Паралельне вимірювання естрадіолу

дозволяє відзначити його підвищені рівні при неповному пригніченні ФСГ у жінок зі зниженням оваріального резерву [44, 57].

Секреція АМГ відбувається клітинами гранульози первинних, преантральних та малих антральних фолікулів у яєчниках. Його рівні чітко корелюють з числом антральних фолікулів, величиною пулу примордіальних фолікулів та знижуються з віком, у допоміжних репродуктивних технологіях визначення рівня АМГ також використовується для прогнозування відповіді яєчників на стимуляцію [10]. Показники АМГ досить стабільні та не демонструють варіабельності між циклами, що дозволяє вимірювати їх у будь-який день циклу. Відповідно, з віком резерв яєчників виснажується, що призводить до поступового зниження рівня АМГ, а після 35-40 років цей процес значно пришвидшується. Передбачається, що значення у діапазоні 0,5-1 нг/мл пов'язуються зі зниженою відповіддю яєчників, нормальна відповідь – 1-3,5 нг/мл, тоді як значення понад 3,5 нг/мл характеризують надмірну відповідь. Однак, попри те, що цикли із надмірною відповіддю дають можливість вилучити більшу кількість ооцитів, це не обов'язково гарантує хорошу якість ембріонів, а подекуди навіть може пов'язуватись із нижчими показниками запліднення.

Таким чином, передбачається, що жінки з нижчим рівнем АМГ матимуть менший оваріальний запас та швидше його вичерпання й настання менопаузи, на відміну від жінок із високим АМГ. Хоча у літературі наявні дані про те, що з віком різниця між початковими зниженими та підвищеними рівнями АМГ у різних жінок стає менш помітною, що в принципі може обумовлюватись й індивідуальними темпами зниження оваріального резерву [20]. Попри широке застосування АМГ як біомаркера та прогностичного показника, розуміння механізмів його впливу на регуляцію фертильності та морфологічні показники ооцитів обмежені. Сучасні дослідження на мишах показують, що використання екзогенного АМГ може позитивно впливати на якість ооцитів та ранній ембріональний розвиток,

питання дослідження людини в даному аспекті залишаються відкритими [35, 52].

Підрахунок кількості антральних фолікулів, що спостерігаються під час ранньої фолікулярної фази, є корисним прогностичним показником для оцінки відповіді яєчників на стимуляцію та надійним маркером оваріального резерву, однак для прогнозування вагітності чутливості та специфічності даного методу замало [2]. Передбачається, що чим більша кількість візуалізованих фолікулів у яєчнику, тим більший оваріальний запас, при цьому існує лише незначна варіабельність показників між циклами. Предиктором нормальної відповіді вважається кількість фолікулів в одному яєчнику близько 8-10, тоді як понад 14 свідчать про гіперактивність яєчників [34].

Серед іншого, можливе також визначення рівня інгібіну В, що синтезується переважно преантральними фолікулами і знижується з віком, та вимірювання об'єму яєчників, що також поступово зменшується. З-поміж описаних методів найбільш репрезентативними є показники АМГ та підрахунок КАФ, оскільки зміни рівнів ФСГ чи інгібіну В є більш пізнім проявом зниження оваріального резерву, зокрема ближче до менопаузи.

## **1.2. Морфологія жіночих гамет**

### **1.2.1. Ядерна та цитоплазматична компетентність яйцеклітини.**

Яйцеклітина – найбільша клітина людського організму, розміри якої сягають близько 130-140 мкм, унікально обладнана для однієї із головних функцій – розмноження. Відомий вислів ученого Вільяма Гарвея "*ex ovo omnia*", або усе походить з яйця, влучно передає ідею того, що фундаментальною основою розвитку ембріона є яйцеклітина, тобто її потенціал більшою мірою визначає компетентність майбутнього ембріона. Цитоплазма, завдяки певному запасу поживних речовин та клітинних матеріалів, забезпечує енергетичні потреби та ранній розвиток ембріона, при цьому основний об'єм ембріона походить саме від яйцеклітини, а не сперматозоїда.

Завершальною стадією оогенезу є дозрівання яйцеклітини, у результаті чого з диплоїдної клітини утворюється гаплоїдна. Існує поняття ядерного та цитоплазматичного дозрівання ооцитів [50], а успішне завершення обох процесів дозволяє отримати на виході здорову яйцеклітину високої якості.

Важливими аспектами цитоплазматичної компетентності є процеси біогенезу рибосом та синтезу білків під час росту ооцитів. Саме у ядрі відбуваються процеси транскрипції, причому деякі з м-РНК рекрутуються і трансформуються у білки та використовуються для метаболічних потреб клітини, а деякі деградують чи зберігаються для реалізації у зиготі/ембріоні [50, 55]. Оскільки ооцити в яєчнику затримуються на стадії профазі мейозу I, характерною особливістю є наявність зародкового пухирця, що і представляє собою ядро ооцита із хроматином. Таким чином, значні метаболічні потреби ооцита обумовлюють великі розміри ядра, що дозволяє легко візуалізувати зародковий пухирець за допомогою світлової мікроскопії.

За рахунок відновлення мейозу з профазі I, спричиненого гормональним сплеском гіпоталамо-гіпофізарної вісі, а саме лютеїнізуючого гормону (ЛГ), розпочинається процес мейотичного дозрівання, зокрема розпад зародкового пухирця та збірка мейотичного веретена. На молекулярному рівні відбувається зв'язування ЛГ з рецепторами клітин гранульози антрального фолікула, що запускає сигнальні шляхи для зниження рівнів циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ), який дифундує в ооцит та відповідно провокує зниження циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ), і як наслідок відновлення клітинного циклу. Оскільки мейотична зупинка підтримується високим рівнем цАМФ за рахунок антагоністичної активності аденілатциклази, відповідальної за вироблення цАМФ та ооцитспецифічної фосфодіестерази, що забезпечує його розпад, то за умов достатнього надходження цГМФ відбувається інгібування ооцитспецифічної фосфодіестерази [25, 28, 43].

Оскільки важливою ланкою запуску мейозу є пригнічення транскрипції, значним успіхом стали сучасні дослідження конфігураційних особливостей

хроматину в ооцитах мишей та людини, що є важливим для пошуку молекулярних аспектів оцінки якості ооцитів. На стадії профазі I організація хроматину може бути представлена у вигляді оточеного нуклеуса (SN) або неоточеного нуклеуса (NSN), а також набувати проміжних станів. Ооцити із конфігурацією SN транскрипційно неактивні та характеризуються конденсованим хроматином, а отже і мають вищу здатність до відновлення мейозу під час овуляції. Тоді як NSN зустрічається переважно в молодих ооцитах, що знаходяться у процесі активного росту та транскрипції власної ДНК [8, 9].

Подальші події, що відбувається після розпаду зародкового пухирця супроводжуються вирівнюванням хромосом у центрі мейотичного веретена та першим поділом мейозу, при цьому надлишок ДНК упаковується та відкидається у вигляді першого полярного тільця. Візуалізація першого полярного тільця сигналізує про вступання клітини на шлях другого поділу, однак на стадії метафази II знову настає арешт клітинного поділу, що відновиться вже після запліднення [14]. Таким чином, мейотична компетентність характеризується здатністю ооцита відновити клітинний цикл у відповідь на гормональні сигнали та завершити мейоз, утворивши в результаті гаплоїдну гамету готову до злиття зі сперматозоїдом.

Окрім того, з розпадом зародкового пухирця відбувається і реорганізація цитоплазми за рахунок рівномірного розподілу органел по всій площині, оскільки першопочатково вони концентруються навколо ядра. Ще одним важливим компонентом є формування кортикальних гранул із овастацином, що у подальшому дозволяє запобігти потраплянню декількох сперматозоїдів у клітину, шляхом модифікації глікопротеїнового матриксу [13, 25]. При тому, що цитоплазматичне дозрівання є не менш значущим фактором у набутті компетентності ооцитами, дослідженню структурних основ цитоплазми приділяється менше уваги у науковій спільності, фокус зміщений на клінічно значущі моменти, як от вплив протоколів вітрифікації чи культивування на якість гамет.

Вплив на ядерне та цитоплазматичне дозрівання забезпечує і здорове мікрооточення, яке створюється внеском фолікулярної рідини та шаром кумулюсних клітин. Останні знаходяться у тісному зв'язку із гаметою та опосередковують метаболічну підтримку та зупинку/відновлення мейозу. Регуляція відбувається за рахунок щілинних контактів утворених коннексином-37, що забезпечують перенесення малих молекул до ооцита (цАМФ, цГМФ і т.д.), а також паракринних сигналів, які відіграють роль у дозріванні фолікулів за рахунок впливу ФСГ, факторів росту. Такий взаємозв'язок підтверджується тим, що культивування оголених клітин *in vitro* призводить до появи аномалій дозрівання, тоді як у протилежному випадку подібні зміни не спостерігаються [40, 56]. Ще одним цікавим фактором є взаємний вплив цих двох типів міжклітинних взаємодій, оскільки розташування коннексинів може обумовлювати відповідь на паракринні сигнали, а ті в свою чергу можуть визначати організацію коннексинів.

Не менш важливу роль у диференціації ооцитів відіграє і фолікулярна рідина, що виробляється клітинами гранульози на більш пізніх стадіях розвитку антральних фолікулів. Її склад представлений переважно плазмою й секреторними продуктами клітин гранульози та теки, зокрема відзначається наявність стероїдних гормонів (естрогену, прогестерону, тестостерону), метаболітів, активних форм кисню, антиоксидантів і т.д. Зміни компонентів фолікулярної рідини опосередковано впливатимуть на якість ооцитів чи ранній розвиток ембріона, при цьому такі зміни можуть обумовлюватись не лише гормональним впливом, а й старшим віком жінки, що пов'язано із окислювальним стресом [17, 63].

**1.2.3. Зовнішній вигляд ооцитів.** Згідно Стамбульського консенсусу вчених ALPNA та Європейської Асоціації Репродукції та Ембріології Людини (European Society of Human Reproduction and Embryology – ESHRE), оптимальним за морфологічними критеріями вважається ооцит сферичної форми, що має однорідну цитоплазму без включень, одне полярне тільце (polar body) правильного розміру, відповідних товщин блискучу оболонку (zona

pellucida) та перивітеліновий простір (perivitelline space) (рис. 1.1). Такий ооцит знаходиться на стадії другого поділу мейозу і є зрілим, тобто здатним до запліднення [5].

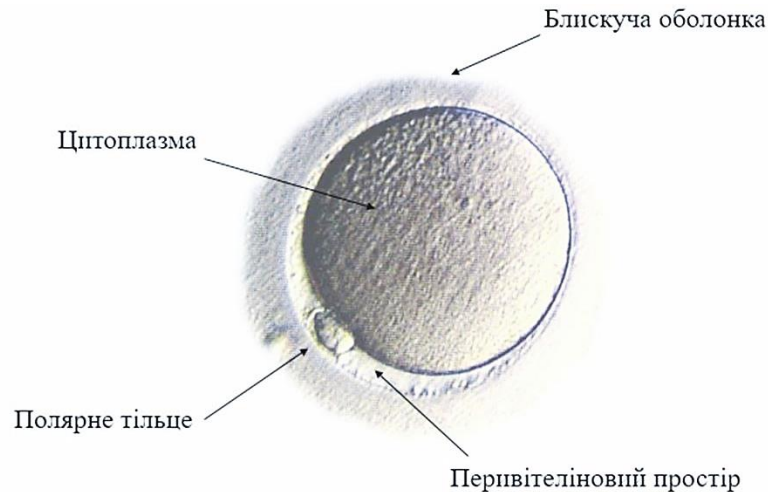


Рис. 1.1. Морфологічно нормальний ооцит стадії МІІІ.

Якість ооцитів визначається скоординованим ядерним та цитоплазматичним дозріванням, що безпосередньо впливає на результати запліднення та детермінує розвиток ембріонів. Ооцит оточений шаром кумулюсних клітин, що походять від недиференційованих гранульозних клітин та знаходяться у тісному зв'язку із ним, утворюючи ооцит-кумулюсний комплекс (ОКК). Клітини променистої корони є першим шаром кумулюсних клітин, що розташовуються безпосередньо біля ооцита, уся маса клітин кумулюсу складає близько 40-50 шарів, що оточують ооцит та з'єднується із ним за рахунок розширення мембрани навколо клітин корони та виділення гіалуронової кислоти після сплеску ЛГ [56, 61].

Ступінь ядерної зрілості та морфологію ооцитів можна оцінити за допомогою світлової мікроскопії лише після попередньої їх денудації від оточуючих клітин кумулюсного комплексу, шляхом руйнування гіалуронових зв'язків між ними із використанням рекомбінантної гіалуронідази людини. Додаткову інформацію про ядерний статус клітин можна отримати за

допомогою мікроскопії у поляризованому світлі, що дозволяє візуалізувати чутливу структуру, відповідальну за сегрегацію хромосом, а саме веретено поділу [39]. Наприклад, при спостереженні у поляризованому світлі ооцити можуть бути незрілими, тобто перебувати не у відповідній стадії мейозу, навіть попри наявність першого полярного тільця.

**1.2.4. Вплив зовнішніх та внутрішніх факторів на морфологію ооцитів.** Як вже вказувалось вище, одним із найбільш вагомих та неминучих факторів впливу на кількість та морфологію статевих клітин є вік жінки, однак серед іншого виділяють низку зовнішніх та внутрішніх впливів на ооцити, розглянемо найпоширеніші з них, представлені в літературі.

Клінічними станами, що можуть впливати на компетентність ооцитів, є синдром полікістозних яєчників, ендометріоз та інші запальні захворювання малого тазу. Такі порушення пов'язані із запальним процесом, що викликає вивільнення цитокінів, простагландинів та активних форм кисню, а це в свою чергу впливає на фолікулярні клітини та може призводити до порушення мембрани ооцита чи його ДНК [16, 18]. Іншою групою захворювань є ракові стани, що передбачають хіміотерапевтичне лікування чи опромінення, яке може пошкодити ДНК клітин [59] та прискорити репродуктивне старіння.

Ще однією поширеною причиною погіршення якості ооцитів є ожиріння, що вражає значну частку жінок репродуктивного віку. Ожиріння впливає на процеси набуття компетентності ооцитами за рахунок змін гормонів, що відповідальні за запуск дозрівання ооцитів з профазі мейозу 1. Зокрема, одним із наслідків є підвищення концентрації інсуліну у сироватці крові, це в свою чергу може впливати на глобулін, що зв'язує стероїдні гормони, та підвищувати рівні андрогенів. За рахунок посиленого стероїдогенезу у клітинах теки та гранульозних клітинах посилюється експресія рецепторів ЛГ, що порушує співвідношення ЛГ:ФСГ й негативно позначається на запуску овуляції та клітинного циклу. При цьому, ожиріння та інсулінорезистентність асоційовані із появою діабету II типу, тоді як гіперглікемія призводить до порушень дозрівання ооцитів та підвищеного

апоптозу клітин гранульози. Що стосується циклів ДРТ, то у жінок із надмірною вагою та ожирінням спостерігається нижча відповідь на гонадотропіни, що передбачає використання більших доз чи подовження їх прийому для отримання більшої кількості фолікулів у яєчниках та досягнення їх оптимального розміру [47, 49]. Однак питання впливу недостатньої ваги досить суперечливі, з наявних звітів можна припустити, що незначне зменшення показників ІМТ не матиме суттєвого впливу на фертильність жінок [15, 29], тоді як критично низькі показники асоціюються із підвищеним рівнем ановуляторного безпліддя [12].

Перспективним залишається питання стосовно того, чи впливає повторне донорство ооцитів на їх якість. Поодинокі дослідження вказують на те, що багаторазові цикли стимуляцій не мають впливу на дисморфізми ооцитів, а після залучення ооцитів від повторних донорок у жінок-реципієнтів підвищувались показники вагітності [42]. Загалом, фізіологічним механізмом рекрутингу більшої кількості ооцитів після стимуляції є залучення тих фолікулів, які так чи інакше піддавались би атрезії [45], при цьому оваріальний резерв донорок залишається неушкодженим, що підтверджується сталими показниками рівнів АМГ. Тоді як, дослідження на тваринних моделях також показують, що повторна стимуляція яєчників гонадотропінами не призводить до підвищеної атрезії фолікулів чи старіння яєчників [58].

### **1.3. Донорство гамет як один із методів допоміжних репродуктивних технологій**

Процедура донації яйцеклітин передбачає використання гамет, вилучених у жінок репродуктивного віку за добровільною згодою, для подружніх пар, де жінки з тих чи інших причин не можуть скористатися власними статевими клітинами. Технічним імпульсом для можливості використання донорських ооцитів у пар із віковим безпліддям стала поява на світ Луїзи Браун, першої дитини народженої після запліднення *in vitro*, що

власне і відкрила еру екстракорпорального запліднення та допоміжних репродуктивних технологій. Тоді як, про успішне настання вагітності із використанням донорських ооцитів було повідомлено у 1983 році, а вже у наступному році була народжена перша дитина із донорських клітин після перенесення ембріона матері [51].

Важливим аспектом є правове регулювання процедури донації та етичні аспекти даного питання. Нерідко донорки погоджуються на участь у програмах задля матеріальної компенсації, що в свою чергу породжує розквіт медичного туризму за рахунок відмінностей регулювання питання на державному рівні у різних країнах. Попри це, введення відповідних вимог та правил націлені на безпеку як дітей та батьків, так і донорок ооцитів. В Україні питання донації гамет регулюються згідно із Наказом №787 «Про затвердження Порядку застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні» [67], за яким передбачається виконання ряду вимог, що стосуються донора ооцитів, зокрема: вік жінки від 18 до 36 років; наявність принаймні однієї здорової дитини; відсутність соматичних чи психічних порушень; відсутність генетичних захворювань. При цьому протягом життя донором яйцеклітин можна стати не більше 8 разів із рекомендованим інтервалом між процедурами контрольованої стимуляції яєчників не менше 2 місяців, задля уникнення ускладнень та збереження репродуктивної функції.

Показаннями до проведення процедури донації можуть виступати [46]:

- знижений оваріальний резерв жінки або старший репродуктивний вік;
- генетичні аномалії або сімейний анамнез захворювань із неможливістю встановлення причини;
- неодноразові невдалі спроби запліднення *in vitro* чи отримання ооцитів/ембріонів поганої якості;
- порушення пов'язані із репродуктивною функцією, наприклад гіпергонадотропний гіпогонадизм;
- трансгендерні пари і т.д.

Донорство ооцитів важливий та відповідальний крок, що потребує насамперед ретельного відбору кандидатів та їх підготовки. Первинний відбір включає відповідність донорки законодавчим вимогам, такі як вік та наявність здорової дитини, тоді як наступні етапи передбачають широке медичне обстеження жінок, включно із визначенням оваріального резерву та генетичним дослідженням. На підставі медичного обстеження робиться висновок про можливість участі жінки у програмі донації, серед необхідних документів для проведення процедури є інформована добровільна згода на донорство ооцитів.

З метою отримання більшої кількості статевих клітин проводиться контрольована стимуляція яєчників, що передбачає використання низки ін'єкцій з високими дозами ФСГ та дає змогу стати домінуючим не одному антральному фолікулу, як це відбувається у природньому циклі, а багатьом закладеним у даному циклі [41]. Важливим є одномоментний збір усіх зрілих фолікулів, для цього довгі протоколи стимуляції, зазвичай, використовують агоністи гонадотропін-рилізінг-гормону (ГнРГ), що активують рецептори гіпофіза та виробляють ФСГ та ЛГ, у певний момент гіпофіз перестає працювати понаднормово і вироблення гормонів припиняється. У коротких протоколах застосовують антагоністи ГнРГ, що імітують його молекулу та блокують рецептори для ГнРГ в гіпофізі. Запуск ядерного дозрівання відбувається за рахунок тригерного уколу, що представлений дозою агоніста ГнРГ у вигляді синтетичного аналогу ГнРГ, або хоріонічного гонадотропіну, відповідального за активацію гіпофізу та викид ЛГ останнім, що власне і дасть початок овуляції. Від часу введення тригеру залежать усі наступні етапи, зокрема, через 35-36 годин планується забір яйцеклітин, а час запліднення має варіюватись від 36-38 до 42 годин. Приблизно через 12 годин після тригеру відбуватиметься пік ЛГ та відповідно старт мейозу, тобто відновлення клітинного циклу після профазі I та завершення кросинговеру [34, 31]. Сама процедура вилучення ооцитів здійснюється за допомогою трансвагінальної аспірації яєчників під контролем ультразвуку та внутрішньовенної седації.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Об'єкт та схема дослідження

Об'єктом дослідження виступала репродуктивна функція жінок, що беруть участь у донорських програмах. У якості матеріалу для дослідження використовували статеві клітини жінок-донорок, отримані шляхом трансвагінальної аспірації фолікулів після контрольованої стимуляції яєчників. Забір матеріалу здійснювався лікарем, після чого пробірки із фолікулярним аспіратом передавали ембріологу для здійснення пошуку ооцит-кумулюсних комплексів. Дані про кількість пропунктованих фолікулів та кількість отриманих ОКК відповідно вносили у картки донорів за допомогою програми «Doctor Eleks».

Загальну схему дослідження представлено на рис.2.1.



Рис.2.1. Схема дослідження.

Для дослідження було проведено аналіз клініко-лабораторних даних 105 жінок-донорів віком від 19 до 32 років на базі клініки генетики репродукції «Вікторія». Із урахуванням мети та завдань роботи для подальшого дослідження донорок розділили на 2 групи: первинні – 51 жінка та повторні – 54 жінки.

Визначення рівня антимюллерового гормону здійснювалось методом електрохемілюмінесцентного імунотесту «ECLIA» на аналізаторі Cobas (Roshe Diagnostics GmbH). Кров забирали на 3-й день менструального циклу.

Для розрахунку ІМТ за формулою:  $\frac{\text{маса тіла (кг)}}{\text{зріст (м)}^2}$ , вимірювали зріст та масу тіла. Отримані результати інтерпретували згідно із рекомендаціями Всесвітньої організації охорони здоров'я [1]: до 18.5 – недостатня вага, 18.5-25 – нормальна вага, 25-30 – надмірна вага, більше 30 – ожиріння.

Контрольована стимуляція овуляції проводилась лікарем-репродуктологом за коротким протоколом з використанням антагоністів ГнРГ. З 23 дня менструального циклу донорки отримували гонадотропні препарати щодня. Після досягнення діаметра лідируючого фолікула 13-14 мм (6-7 день стимуляції) вводилися антагоністи ГнРГ, за наявності лідируючого фолікула діаметром 18 мм і більше вводився тригер овуляції, а саме агоністи ГнРГ.

Через 35-36 годин після введення тригера проводилася пункція фолікулів під внутрішньовенним знеболенням та ультразвуковим контролем.

Оцінка якості ооцитів проводилась після процедури денудації за зовнішнім виглядом цитоплазми, станом вітелінового шару та полярного тільця.

## **2.2. Витратні матеріали, обладнання та реактиви**

Для проведення роботи використовували наступні витратні матеріали:

- нестерильні нітрилові рукавички;

- марлеві серветки;
- дезінфікуючий засіб «Oosafe»;
- нестерильні пастерівські піпетки;
- наконечники для піпет-дозатора;
- мікропіпетки 170 та 140 мкм для стріпера;
- маркер.

**Обладнання:**

- ламінарна шафа;
- столик з підігрівом;
- мультигазовий CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> інкубатор ESCO Miri;
- термостат;
- піпет-дозатор;
- стріпер;
- штатив металевий для пробірок;
- стереомікроскоп Leica M80;
- інвертований мікроскоп Olympus IX73.

**Реактиви:**

- середовище для культивування Global total (LifeGlobal, США);
- буферний розчин HEPES;
- олія мінеральна;
- рекомбінантна гіалуронідаза людини.

**Лабораторний посуд:**

- чашки Петрі діаметром 35 та 90 мм;
- чашки 4-х лункові;
- пробірки з кришкою.

**2.3. Підготовка середовищ та лабораторного посуду**

Попередня підготовка чашок для культивування здійснювалась згідно із внутрішніми протоколами лабораторії ембріології клініки генетики репродукції «Вікторія».

4-х лункові чашки для культивування ооцитів після їх отримання та денудованих ооцитів готували за день до проведення пункції яєчників, наступним чином.

У лунки 1 та 2 поміщали по 0,5 мл культурального середовища, вкривали 11 краплями мінеральної олії, для запобігання випаровування рідини та можливих змін рН, осмолярності і т.д. У лунки 3 та 4 поміщали по краплині середовища та повністю вкривали мінеральною олією. Між лунками 1 та 3 вносили близько 0,5 мл того ж середовища для промивання ОКК від залишків буферного розчину HEPES. Чашки поміщали в інкубатор ( $\text{CO}_2 - 5.8$ ;  $\text{O}_2 - 5.0$ ) при температурі  $37^\circ\text{C}$ .

Пробірки із кришками наповнювали розчином HEPES із розрахунку: 2,5 мл для процедури пошуку ОКК під час пункції та 2 мл для денудації ОКК на одного донора. Готували за день до процедури та зберігали у термостаті при температурі  $37^\circ\text{C}$ .

Чашку Петрі 90 мм для денудації ОКК готували безпосередньо перед процедурою. Попередньо нагріті до  $37^\circ\text{C}$  розчини гіалуронідази – крапля 100 мкл та окремі краплі по 0,5 мл буферу HEPES послідовно розміщували у чашці.

## **2.4. Методи дослідження**

**2.4.1. Забір клітин ооцит-кумулясного комплексу.** Перед проведенням пункції яєчників та введенням жінки у седацію, обов'язково проводили процедуру підтвердження особистості, донор називав своє прізвище, ім'я, по-батькові та рік народження, дані звіряли із відповідними документами.

Лабораторний посуд на кожного донора, зокрема чашки Петрі для відбору ОКК та 4-х лункові чашки для культивації, маркували відповідним ідентифікаційним номером, у документації вказували час початку пункції. Робота проводилась лише на теплих поверхнях ламінарної шафи в умовах подачі стерильного повітря, у зоні доступу розміщували чашки Петрі 95 мм для перегляду фолікулярної рідини.

Для відбору ОКК використовували чашки Петрі діаметром 35 мм наповнені 2,5 мл розчину із NEPES, вибір якого обумовлений роботою із клітинами поза інкубатором, що дозволяє підтримувати оптимальне середовище. В операційній медична сестра наповнювала фолікулярною рідиною пробірки та передавала для перегляду в ембріологічну лабораторію, поміщуючи їх у металевий штатив для пробірок, розміщений на теплій поверхні. Після цього вміст пробірок обережно виливали у чашки Петрі 95 мм, спочатку візуально оцінювали усю поверхню чашки, під малим збільшенням мікроскопу здійснювали пошук ооцит-кумулясних комплексів, представлених шаром в'язких кумулюсних клітин, що оточують ооцит, та здатних «підсвічуватись», за рахунок проходження променів світла. За допомогою піпет-дозатора відбирали ідентифіковані ОКК та поміщали у чашку Петрі 35 мм, за необхідності використовували інсулінові голки для видалення кров'яних згустків. Чашку із фолікулярною рідиною відставляли для повторного перегляду, після чого повідомляли в операційну кількість отриманих в ході пункції клітин. Отримані ОКК відбирали із мінімальною кількістю середовища та промивали від залишків NEPES у проміжках 4-х лункової чашки, піпетуючи декілька разів. Далі поміщали їх у 1 лунку під шар мінеральної олії, вказували на чашці загальну кількість ОКК та поміщали її в комірку інкубатора із поміткою місця локалізації чашки.

**2.4.2. Денудація клітин ооцит-кумулясного комплексу.** Перед денудацією ОКК в обов'язковому порядку проводили процедуру подвійного свідчення, що полягає у перевірці як мінімум двома особами даних, вказаних на чашках для культивування із відповідними документами.

Денудация передбачає очищення ооцита від клітин кумулюсного комплексу, для цього клітини спочатку піддавали дії комерційного середовища, що містило 80 МО рекомбінантної гіалуронідази людини, для руйнування зв'язків гіалуронової кислоти між шарами фолікулярних клітин. Поміщали ОКК у краплю із 90-100 мкл гіалуронідази та обережно піпетували протягом 30-60 секунд, доки ооцити не будуть вкриті лише кількома шарами клітин корони, після чого переносили їх у чисту краплю із розчином HEPES.

Наступним етапом було механічне очищення ооцитів за допомогою мікропіпеток діаметром 170 мкм у перших двох краплях середовища та 140 мкм у двох інших краплях відповідно. Піпетування у кожній краплі проводили обережно, щоб уникнути пошкоджень цілісності клітини чи утворенню бульбашок повітря у краплі, що може призвести до прилипання ооцита.

Під стереомікроскопом попередньо відбирали зрілі клітини стадії метафази II, та переносили їх у 4-х лункову чашку для культивування у лунки 3 та 4 для подальшої оцінки за допомогою інвертованого мікроскопа.

За допомогою світлової мікроскопії ооцити можливо візуалізувати у трьох стадіях (рис. 2.2), зокрема: зародковий пухирець, стадія MІ та MІІ.

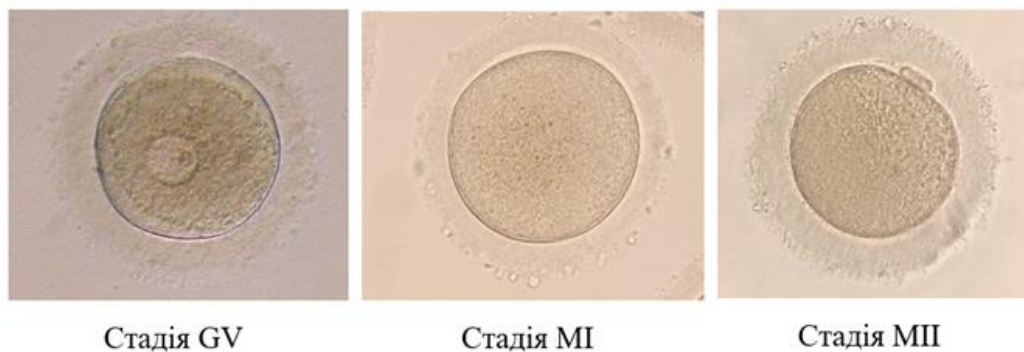


Рис.2.2. Візуалізація стадії зрілості ооцитів за допомогою світлової мікроскопії.

Зародковий пухирець, або гермінальна везикула (GV) представляє собою внутрішньоцитоплазматичне ядро ооцита, що перебуває у профазі першого мейотичного поділу.

Ооцитом МІІ вважається клітина у другому мейотичному поділі на стадії метафази, із наявним першим полярним тільцем у перивітеліновому просторі. Перше полярне тільце містить зайві 23 хромосоми відповідно з першого поділу мейозу, після його викидання формується нове веретено поділу, що має на меті розтягнути сестринські хроматиди та завершити поділ яйцеклітини. Відтак хромосоми вишиковуються по центру й на цьому етапі відбувається другий арешт ооцита, лише після потрапляння сперматозоїда клітинний цикл відновиться, а зайві хроматиди, упаковані у друге полярне тільце відкинуться [25, 50].

Тоді як, стадія МІ відзначається від моменту зникнення ядра до появи першого полярного тільця. Однак за допомогою світлової мікроскопії неможливо оцінити на якій саме стадії мейозу знаходиться клітина, тому візуально МІ може перебувати на стадії розпаду ядра, де ядерна оболонка вже зруйнувалась, але клітина ще не прогресувала до стадії метафази першого поділу мейозу [25], де гомологічні хромосоми розташовані по екватору веретена поділу та готові до розходження.

**2.4.3. Статистична обробка результатів.** Аналіз даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Graphpad Prism версії 10.2.3 для Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA).

Для кількісних показників визначали їх розподіл на нормальність за методом Шапіро-Уїлка. Для даних із нормальним розподілом результати у таблиці подавали у вигляді середнього значення ( $\bar{X}$ ) та стандартного відхилення ( $\pm SD$ ), тоді як у випадку розподілу, відмінного від нормального, розраховували медіанне значення ( $Me$ ) та міжквартильний інтервал ( $Q1-Q3$ ).

У випадку нормального розподілу для порівняння двох вибірок застосовували t-критерій, або критерій Стьюдента. Для даних відмінних від нормального розподілу використовували критерій Манна-Уїтні.

Для визначення сили зв'язку між двома змінними для нормального розподілу даних використовували кореляцію Пірсона.

Для порівняння якісних показників було застосовано  $\chi^2$ -квадрат, значення у таблицях подавали у вигляді відсотків (%).

Для порівняння динаміки кількісних показників між циклами контрольованої стимуляції застосовували критерій Фрідмана, або дисперсійний аналіз з повторними вимірюваннями для непараметричних даних, тобто розподіл яких відмінний від нормального. Значення  $p < 0,05$  вважали статистично значущим.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1. Вплив віку донорок на характеристики ооцитів

У ході роботи було проаналізовано дані та кількісні параметри отриманих статевих клітин після контрольованої стимуляції яєчників у 51 донорки віком від 19 до 32 років (середній вік становив  $26.0 \pm 3.3$  роки). Відбирали жінок, які вперше приймали участь у програмі донації яйцеклітин, з метою мінімізації можливого впливу такого фактору, як попередня стимуляція яєчників, що може спотворювати результати.

Для досліджуваної вибірки було встановлено негативний кореляційний зв'язок ( $r = -0,4534$ ,  $p < 0,001$ ) між загальною кількістю зібраних ооцитів та віком жінок (рис.3.1).

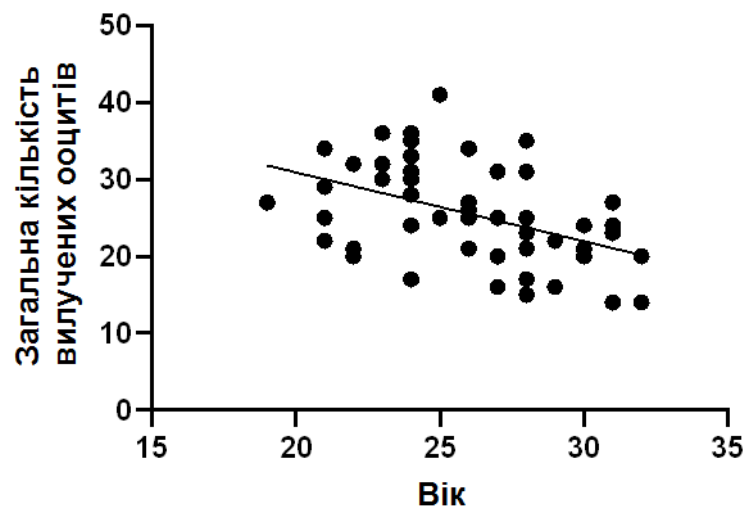


Рис. 3.1. Кореляційний зв'язок між віком донорок та загальною кількістю вилучених ооцитів у одному циклі.

Дані свідчать про помірне зменшення кількості вилучених ооцитів з віком у жінок, що підтверджує фактор значного вікового впливу, обумовленого природними процесами репродуктивного старіння, навіть на

вибірці відносно молодих здорових жінок, допущених до участі у програмі. Оскільки загальна кількість вилучених ооцитів відповідала кількості відібраних ооцит-кумулясних комплексів до процедури їх денудації і в їх число було включено клітини різного ступеню зрілості, з ознаками дегенерації та з іншими типами порушень, нами було проаналізовано окремо саме показники зрілих клітин, що підлягають подальшому заплідненню. Аналогічно, спостерігали негативну кореляцію ( $r = -0,3759$ ,  $p < 0,001$ ) з дещо слабшим зв'язком між кількістю зрілих ооцитів стадії метафази II з морфологічними характеристиками без видимих відхилень та віком донорок (рис. 3.2.), що передбачає зниження з віком кількості гамет, які можуть успішно завершити процеси як ядерного, так і цитоплазматичного дозрівання.

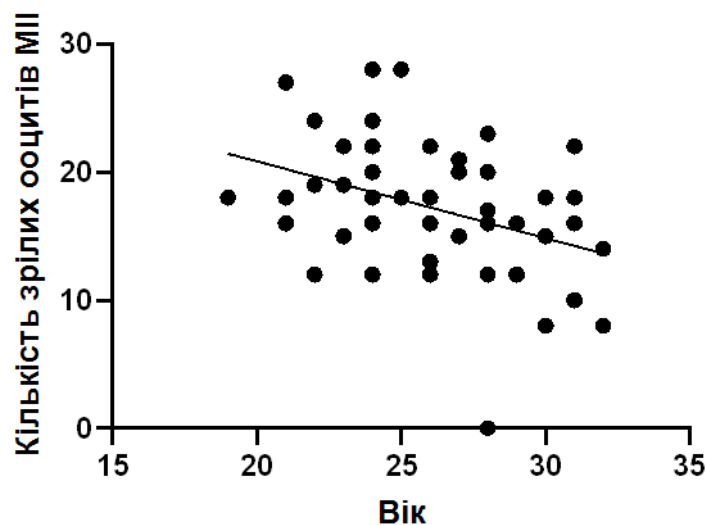


Рис. 3.2. Кореляційний зв'язок між віком донорок та кількістю зрілих ооцитів у одному циклі.

З метою оцінки впливу віку на кількість морфологічних порушень ооцитів ми розділили донорок на дві вікові категорії: 19-27 та 28-32 роки. У результаті розрахунку середнього значення та стандартного відхилення кількості нормальних зрілих ооцитів й клітин із дисморфізмами по різних

віковим групам (рис. 3.3), було виявлено більшу кількість нормальних ооцитів стадії МІІ у жінок віком 19-27 років, ніж у донорок більш старшого віку (28-32 роки). Тоді як, суттєвих відмінностей у кількості отриманих ооцитів із дисморфізмами між двома групами не спостерігається, що може бути пов'язано із незначною віковою варіабельністю досліджуваних груп донорок. Оскільки, перші ознаки старіння яєчників проявляються вже близько 35 років, за рахунок комбінованого впливу окислювального стресу, мітохондріальної дисфункції та накопичення пошкоджень ДНК чи загального порушення роботи гіпоталамо-гіпофізарної вісі.

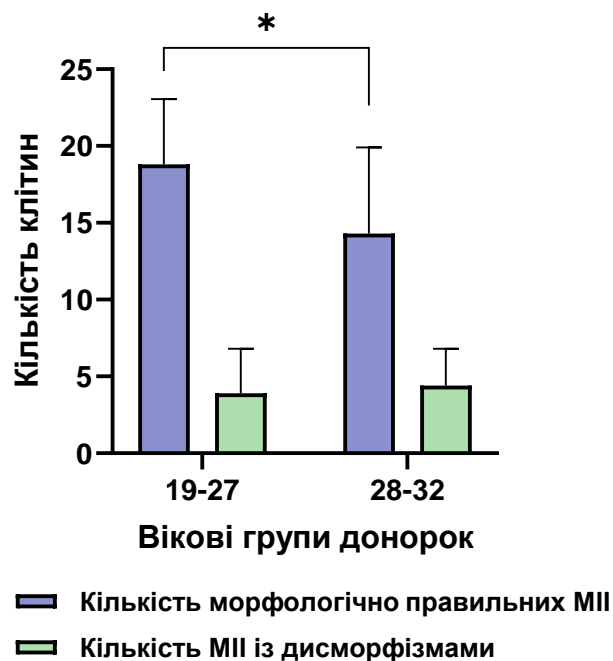


Рис. 3.3. Розподіл кількості нормальних та аномальних ооцитів у одному циклі у вікових групах донорок. \* позначено статистично значущі відмінності між порівнюваними групами ( $p < 0.05$ ).

Безперечно, безплідні пари, що потребують залучення донорських ооцитів переймаються питанням здоров'я майбутніх нащадків, яке більшою мірою залежить від функціонального стану репродуктивного здоров'я донорок. Саме тому, обґрунтованим є рішення залучати до участі у донорських

програмах жінок молодого віку, що підтверджується у роботі Hogan et al. вищими показниками кумулятивного рівня живонароджуваності з донорами менше 35 років, незалежно від віку реципієнтів [30]. Це пояснюється і тим, що процеси старіння ооцитів мають вагоміший вплив на вікове зниження фертильності, аніж функціональний стан матки.

Отримані нами результати підтверджують загальну тенденцію до зниження репродуктивного потенціалу у жінок з віком, однак більшість літературних даних зосереджують свою увагу саме на когорті досліджуваних, що вже мають певні репродуктивні скарги, як от безпліддя [3, 60], на відміну від нашого дослідження, що репрезентує показники відносно молодих та здорових жінок.

### **3.2. Вплив показників індексу маси тіла на характеристики гамет**

Оцінку впливу індексу маси тіла на характеристики гамет у жінок проводили на тій же вибірці первинних донорок, розділивши їх на три групи, відповідно до показників ІМТ: недостатня вага із ІМТ < 18.5 (n = 9), нормальна вага – ІМТ 18.5-25 (n = 28) та надлишкова вага – ІМТ 25-30 (n = 14). У нашому дослідженні не було залучено жінок із ожирінням, значення ІМТ яких перевищує 30 одиниць, оскільки дана категорія не рекомендована до участі у програмах донації яйцеклітин, натомість ми мали змогу виявити вплив недостатньої ваги на розвиток статевих гамет.

Було встановлено негативну кореляцію ( $r = -0,4169$ ,  $p < 0,001$ ) між індексом маси тіла жінок та загальною кількістю вилучених клітин, що вказує на тенденцію до зменшення кількості статевих клітин із загальним збільшенням маси тіла (рис. 3.4).

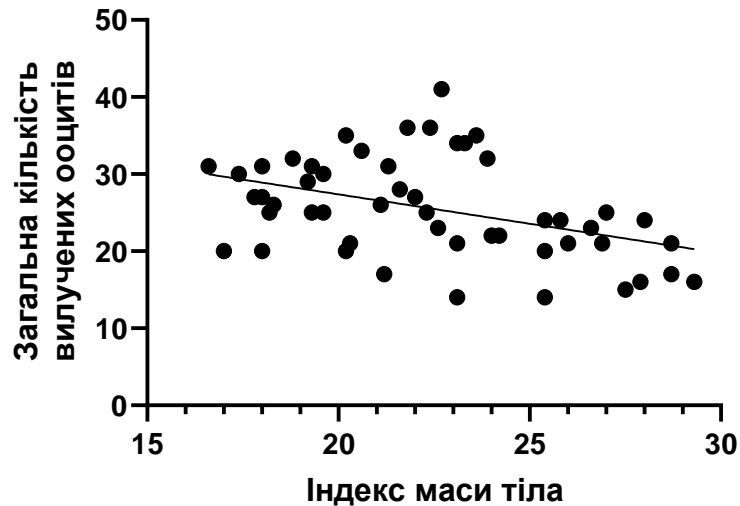


Рис. 3.4. Кореляційний зв'язок ІМТ та загальної кількості ооцитів

Для оцінки впливу ІМТ по групам донорок було розраховано середні значення та стандартні відхилення показників загальної кількості вилучених клітин та зрілих морфологічно нормальних клітин (рис.3.5). Як показують результати, суттєвих відмінностей у загальній кількості зібраних ооцитів між групами із недостатньою та нормальною вагою не спостерігалось, тоді як для групи з надлишковою вагою дані показники значно знижені. Що стосується кількості зрілих ооцитів, у групі із недостатньою вагою відзначаються дещо нижчі показники досягнення зрілості ооцитами, порівняно із групою з нормальною вагою. Відповідно, у донорок із надлишковою вагою кількість зрілих клітин була меншою, ніж у групах із недостатньою та нормальною вагою ( $p < 0.05$ ).

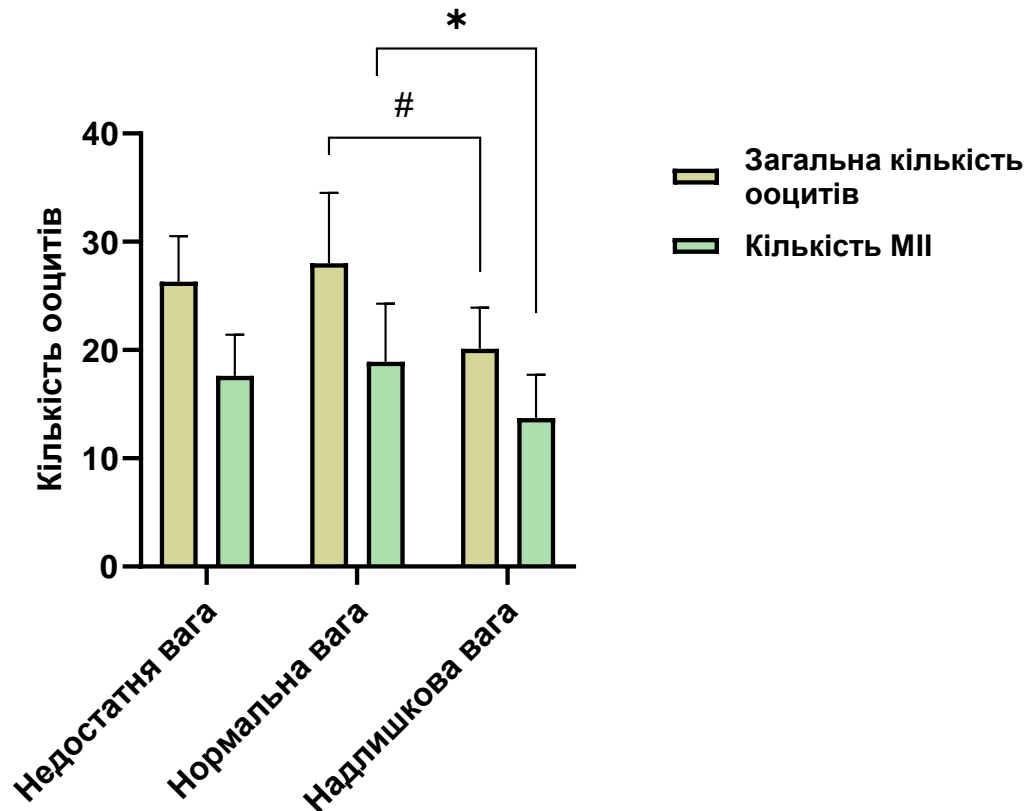


Рис. 3.5. Розподіл загальної кількості отриманих ооцитів та зрілих клітин стадії МІІ серед різних груп донорок, залежно від показників ІМТ. \* та # позначено статистично значущі відмінності між порівнюваними групами ( $p < 0.05$ ).

Таким чином, ми відзначили відсутність видимого ефекту недостатньої ваги на загальну кількість ооцитів та зрілі клітини, порівняно із надлишковою та нормальною вагою. У літературі існують суперечливі дані саме стосовно впливу недостатньої ваги, деякі роботи вказують на спостережувані негативні ефекти, що асоціюються із недостатньою вагою та безпліддям у жінок [12], тоді як інші звіти не виявляють різниці у кількості отриманих клітин від жінок відносно їх індексу маси тіла, а для групи із недостатньою вагою відзначаються навіть вищі показники, порівняно з іншими [29, 36]. Такі результати можуть обумовлюватись і проблемами із розміром вибірок для адекватної оцінки впливу ваги на фертильність. Останні дослідження, які привернули нашу увагу показують, що недостатня вага може змінювати

внутрішньоклітинну структуру кумулюсних клітин та метаболічних процесів за рахунок аномальної морфології мітохондрій, а також надмірної експресії маркерів апоптозу та аутофагії, що і призводить до зниження фертильності [33].

Щодо впливу надмірної ваги на показники загальної кількості та досягнення зрілості клітинами, наше дослідження додатково підтверджує тісний зворотній зв'язок між даними показниками, аналогічно до подібних висновків в літературі [21, 60]. Однак критичним моментом у ході нашої роботи стало визначення позитивної кореляції ( $r = 0,3970$ ,  $p < 0,001$ ) між віком досліджуваних жінок та їх показниками ІМТ (рис. 3.6.), що змінює уявлення про те, чи дійсно лише збільшення ІМТ у такому випадку є фактором впливу на кількісні показники ооцитів. Оскільки у жінок відзначається збільшення маси тіла за рахунок сповільнення метаболічних процесів після досягнення певної вікової межі, можемо припустити, що обидва фактори підсилюють один одного та взаємно впливають на загальний вихід клітин та їх зрілість, адже кореляційний аналіз дає більш загальне уявлення про характер зв'язків між досліджуваними параметрами, при цьому не враховуючи можливість впливу сторонніх факторів.

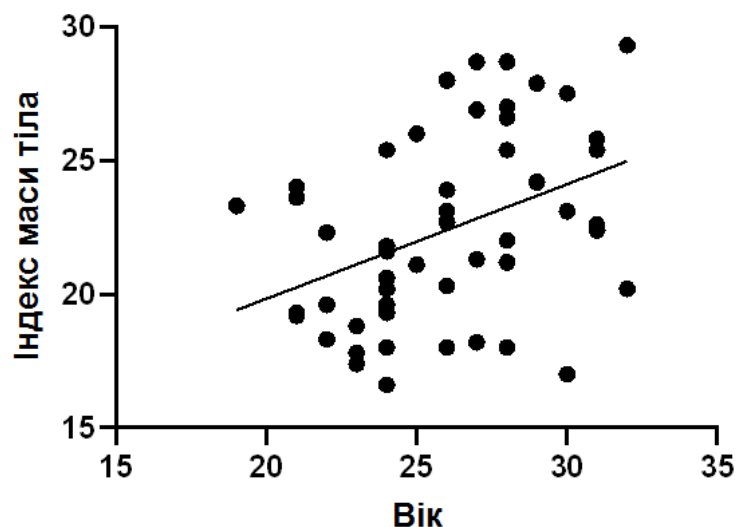


Рис. 3.6. Кореляційний зв'язок між індексом маси тіла та віком донорок.

Припущення стосовно того, що фертильність може змінюватись в залежності від ІМТ по відношенню до віку жінок висловлюється і в деяких з останніх досліджень даної проблематики [3], а отже вік та ІМТ у комбінації є потужними інструментами впливу на розвиток статевих гамет.

### 3.3. Вплив показників антимюллерового гормону на кількісні та якісні характеристики статевих клітин

При оцінці груп первинних донорок ( $n = 51$ ) за показниками антимюллерового гормону ми виявили помірну позитивну кореляцію за обома досліджуваними параметрами, зокрема між загальною кількістю вилучених ооцитів ( $r = 0,7078$ ,  $p < 0,001$ ) (рис.3.7. А) та кількістю зрілих клітин без наявних порушень зовнішнього вигляду ( $r = 0,5837$ ,  $p < 0,001$ ) (рис.3.7. Б). Дані результати підтверджують, що зі збільшенням рівнів АМГ збільшується кількість вилучених клітин. Це також дає уявлення про прогнозовану відповідь яєчників на контрольовану стимуляцію, що у випадку вищих показників АМГ передбачає кращий вихід як загальної кількості статевих клітин, так і зрілих, та безпосередньо відображає функціональний стан яєчників у жінок.

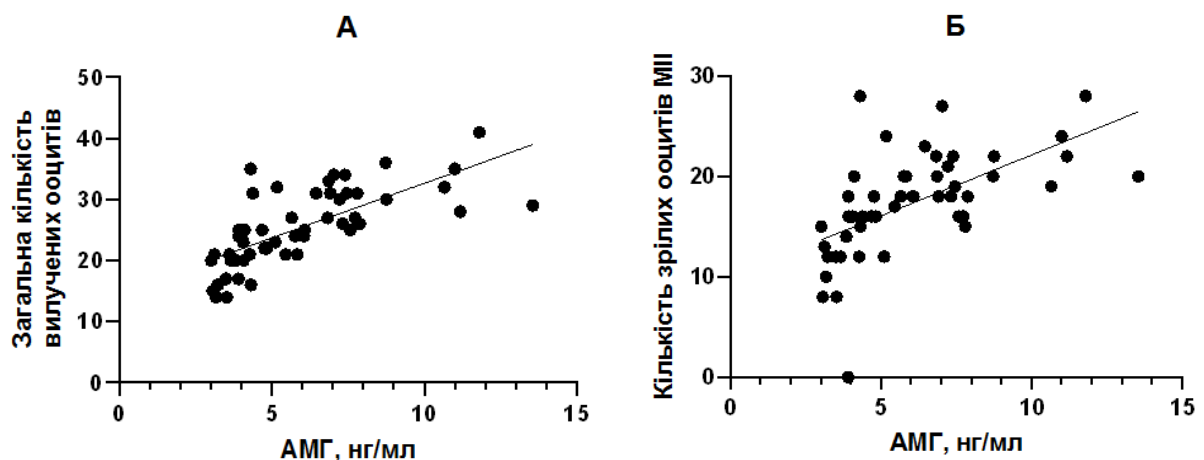


Рис.3.7. Кореляційний зв'язок між рівнями АМГ та загальною кількістю вилучених ооцитів (А) й кількістю зрілих ооцитів (Б).

Попри існуючу закономірність, що рівень АМГ з віком зменшується за рахунок поступового зниження кількості фолікулів із оваріального запасу, у нашому дослідженні серед двох вікових груп донорок не було виявлено суттєвих відмінностей у показниках рівнів АМГ (табл. 3.1), шляхом їх порівняння з використанням критерію Манна-Уїтні. Такі результати можуть бути пов'язані із молодим віком жінок та їх задовільним репродуктивним здоров'ям, оскільки характерні зміни для рівню АМГ все ж характерні для вікової категорії після 35 років.

Таблиця 3.1

Розподіл рівнів АМГ у різних вікових групах донорок

<i>Значення АМГ, нг/мл (Me (Q1-Q3))</i>		<i>ρ-значення</i>
19-27 років	28-32 роки	
7.04 (4.32 – 7.85)	5.56 (4.46 – 7.20)	0.3551

Для подальшого визначення впливу показників АМГ на порушення морфології ооцитів, донорок було згруповано наступним чином: значення АМГ < 7 нг/мл – 1 група та АМГ ≥ 7 нг/мл – 2 група. Така класифікація обумовлена у більшості асоціацією вищих рівнів АМГ із синдромом полікістозних яєчників (СПКЯ) у жінок, що у свою чергу може впливати на дозрівання ооцитів у зміненому фолікулярному середовищі.

У ході дослідження було проаналізовано 566 клітин від 25 жінок із 1 групи та 746 клітин від 26 жінок із 2 групи (табл. 3.2), при цьому різниця у загальній кількості відібраних клітин та зрілих ооцитів між двома групами не була статистично значущою. Тоді як, загальна кількість аномалій морфології у групі 2 перевищувала у 1.8 рази показники, порівняно із групою 1.

Таблиця 3.2.

Порівняння морфології ооцитів у жінок із різними значеннями АМГ

<i>Змінні</i>	<i>1 група</i>	<i>2 група</i>	<i>ρ-значення</i>
	<i>АМГ &lt;7,0 нг/мл n=566 (%)</i>	<i>АМГ ≥7.0 нг/мл n=746 (%)</i>	
Зрілі ооцити	465 (82.2)	595 (79.8)	0.72
Нормальні ооцити	380 (81.7)	446 (74.9)	0.19
Загальна кількість аномалій	85 (18.3)	149 (25.0)	<0.05*
Збільшений перивітеліновий простір	24 (28.2)	35 (23.5)	0.71
Включення у перивітеліновому просторі	4 (4.7)	9 (6.0)	0.37
Включення у цитоплазмі	3 (3.5)	8 (5.4)	0.29
Грануляція цитоплазми	7 (8.2)	22 (14.8)	<0.05*
Наявність вакуолей	14 (16.5)	19 (12.6)	0.93
Наявність sERC	2 (2.4)	1 (0.7)	0.41
Фрагментація полярного тільця	7 (8.2)	8 (5.4)	0.78
Аномально велике полярне тільце	1 (1.2)	2 (1.3)	0.73
Аномально великі розміри клітини	4 (4.7)	1 (0.7)	0.09
Аномалії форми	14 (16.5)	43 (28.9)	<0.05*
Потовщена блискуча оболонка	2 (2.4)	0	0.10
Порушення форми блискучої оболонки	3 (3.5)	1 (0.7)	0.20

Примітка: \* позначено змінні, що мають статистичну значущість

У обох досліджуваних групах більша частка аномалій припадала саме на екстрацитоплазматичні порушення, зокрема дещо вищі показники спостерігались у групі 1 – 69.4 %, тоді як у групі 2 вони становили 66.5 %. Серед даного типу порушень найбільш часто зустрічались збільшення

перивітелінового простору та аномалії форми ооцитів. Натомість частка інтрацитоплазматичних порушень становила 30.6 % у групі 1 та 33.5 % у групі 2, серед яких переважали грануляція цитоплазми, наявність вакуолей та включення у цитоплазмі. Не відзначалося підвищеного впливу рівнів АМГ на появу критичних для майбутніх ембріонів порушень морфології ооцитів, зокрема кластерів гладкого ендоплазматичного ретикулуму у цитоплазмі чи формування аномально великих клітин.

Істотних відмінностей при порівнянні морфологічних характеристик зрілих ооцитів між двома групами не було, за винятком грануляції цитоплазми та клітин аномальної форми, що відображали статистично значущі результати ( $p < 0.05$ ) та значно переважали у досліджуваній групі 2, для якої характерними були більш високі показники рівнів АМГ.

У літературі висуваються припущення щодо імовірного впливу як низьких, так і високих рівнів АМГ на якість ооцитів та появу низки екстра- та інтрацитоплазматичних порушень, що узгоджується із нашими результатами відносно високих показників АМГ, оскільки дослідити вплив низьких рівнів (нижче 1.5 нг/мл) не мали технічної змоги [6]. Щодо дослідження здорових жінок та жінок із СПКЯ, спостерігається вищий ризик появи інтрацитоплазматичних порушень ооцитів в останніх, а саме грануляції цитоплазми та вакуолізації [4]. Наші результати аналогічно підтверджують асоціацію вищих рівнів АМГ із появою зернистості цитоплазми, тоді як наявність вакуолей не мала статистичної значущості та реєструвалась майже на однаковому рівні у обох досліджуваних групах.

На противагу цьому, низка досліджень вказує про відсутність зв'язку між рівнем даного маркера оваріального резерву та якістю ооцитів чи впливом на частоту настання вагітності у жінок [6, 19], або ж спостерігається вплив АМГ на швидкість запліднення та якість ооцитів, однак не на розвиток ембріонів [10]. Такі суперечливі результати не дають однозначної відповіді стосовно того, чи дійсно АМГ впливає на якість ооцитів та з якими

порушеннями асоціюється, однак він залишається корисним критерієм для прогнозування відповіді яєчників на стимуляцію.

**3.3.1. Основні порушення морфології ооцитів.** Для аналізу основних типів порушення морфології використовували вибірку первинних донорок ( $n = 51$ ), загальна кількість проаналізованих клітин – 1312, з них 234 з аномаліями. Зареєстровані дисморфізми проаналізованих ооцитів класифікували наступним чином: інтрацитоплазматичні – пов’язані безпосередньо із особливостями цитоплазми; та екстрацитоплазматичні, що включали порушення блискучої оболонки, перивітелінового простору та полярного тільця.

Серед порушень цитоплазми найбільше занепокоєння викликають саме кластери гладкого ендоплазматичного ретикулулу у цитоплазмі, або SERa, що позначається безпосередньо на результатах запліднення за даними низки досліджень [5, 23], тому з метою уникнення небажаних ризиків, такі клітини не рекомендують використовувати для запліднення *in vitro*.

Кластери SERa представлені напівпрозорими структурами, подібними до вакуоль, однак останні мають більш чітку структуру у вигляді пухирців, що заповнені рідиною (рис.3.8). Невеликі за діаметром вакуолі не несуть загрози, тоді як вакуолі діаметром понад 14 мкм можуть негативно позначатися на процесі бластоцистоутворення. Частка аномалій представлених кластерами SERa складає 1.3 % (3 випадки), тоді як вакуолізація цитоплазми зустрічалась значно частіше – 33 випадки (14.1 %).

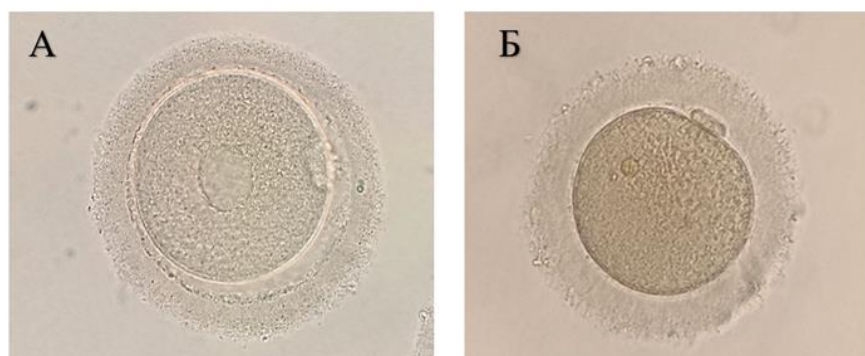


Рис.3.8. Інтрацитоплазматичні порушення: А) кластер SERa; Б) вакуоля.

При цьому, гетерогенність цитоплазми, зокрема грануляція (рис. 3.9.А), не має визначеного біологічного впливу [5, 48] та вказує на нормальну фенотипову варіативність серед вилучених ооцитів, що була виявлена у 29 випадках (12.4 %). Наявність включень у цитоплазмі у вигляді рефрактильних тілець (рис.3.9.Б) мала незначну кількість випадків – 11 (4.7 %), передбачається, що даний тип порушень може асоціюватись із розвитком ембріонів нижчої якості.

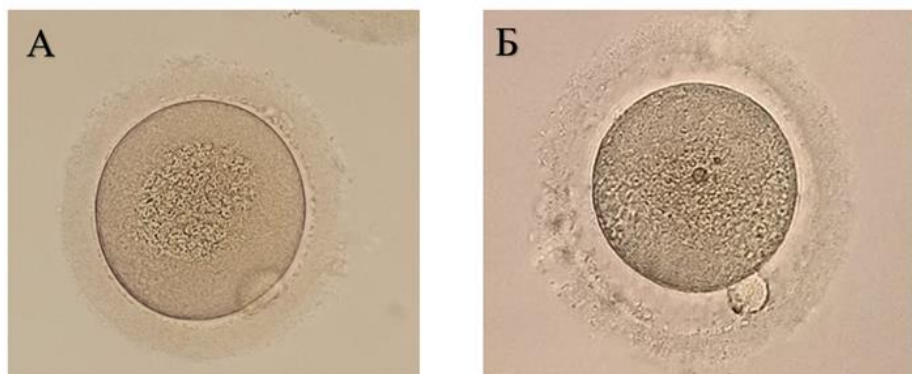


Рис.3.9. Інтрацитоплазматичні порушення: А) центральна грануляція; Б) рефрактильні тільця.

Аномально великі розміри клітин, понад 140 мкм, зустрічались у 5 випадках (2.1 %), такий зовнішній вигляд ооцитів може відображати генетичні аномалії (рис.3.10.А), що асоціюються із додатковим хромосомним набором на тлі відсутності цитокінезу після мітотичного поділу оогоній чи злиття сусідніх оогоній чи під час оогенезу [25, 48]. Використання таких клітин для запліднення з високою імовірністю призведе до дигінічної триплоїдії, тобто порушення плоїдності ембріона. Іншим поширеним порушенням, що зустрічалось у 57 випадках (24.4 %), були ооцити витягнутої форми (рис.3.10.Б), однак у низці досліджень вказують на відсутність зв'язку між зміненою формою та швидкістю запліднення чи якістю ембріонів [48].

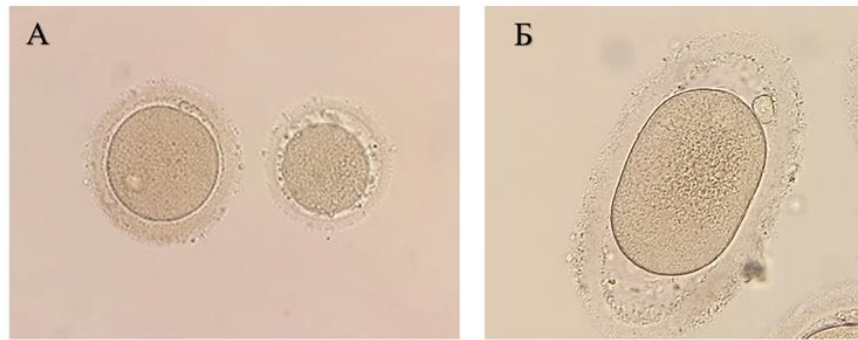


Рис.3.10. Екстрацитоплазматичні порушення: А) аномальні розміри клітини; Б) ооцит витягнутої форми.

Яйцеклітина оточена вітеліною, або блискучою оболонкою (*zona pellucida*), однак видимі під світловим мікроскопом порушення, такі як її відсутність чи значні зміни товщини, виникають досить рідко, зокрема товста та щільна ZP зустрічалась лише у 2 випадках (0.9 %) з усіх оцінених клітин (рис.3.11. А). Тоді як, досить явним порушенням є аномальна форма блискучої оболонки (рис.3.11.Б), обумовлена її розривами чи дублікацією [48], що призводить до появи інтразонального простору, зустрічалась у 4 випадках (1.7 %).

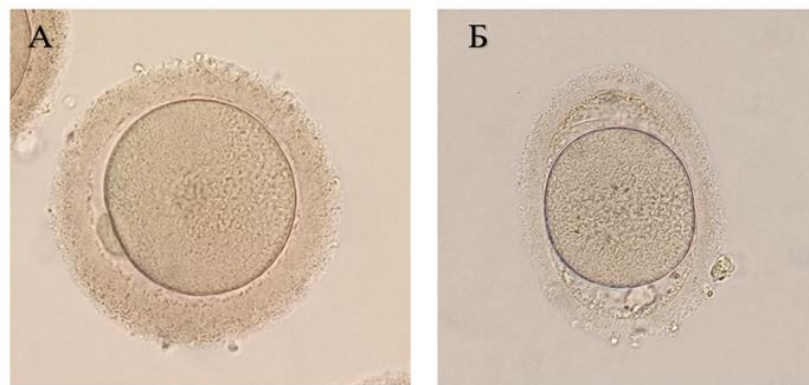


Рис.3.11. Екстрацитоплазматичні порушення: А) потовщена блискуча оболонка; Б) порушення форми – наявність інтразонального простору.

Порушення морфології перивітелінового простору, а саме його збільшення (рис.3.12.А), виникають переважно у старіючих ооцитах, де

внутрішня маса клітини зменшується в об'ємі відносно блискучої оболонки. При цьому регуляція клітинного об'єму відбувається після ініціації овуляції в процесі ядерного дозрівання за рахунок активації гліцину, вимірювання об'єму ооцитів показують його зменшення приблизно на 20 % через 4 години після запуску овуляції [7]. Іншою причиною може бути екструдування значної частини цитоплазми у перше полярне тільце при поділі, за рахунок цього виникає аномально велике полярне тільце та збільшений навколишній простір. Збільшення перивітелінового простору досить часто порушення, що реєстрували у 59 випадках (25.2 %). Подібні дисморфізми пов'язані зі зниженою швидкістю запліднення та розвитком ембріонів, а за деякими даними можуть асоціювати і з підвищеною дегенерацією ооцитів [27, 48].

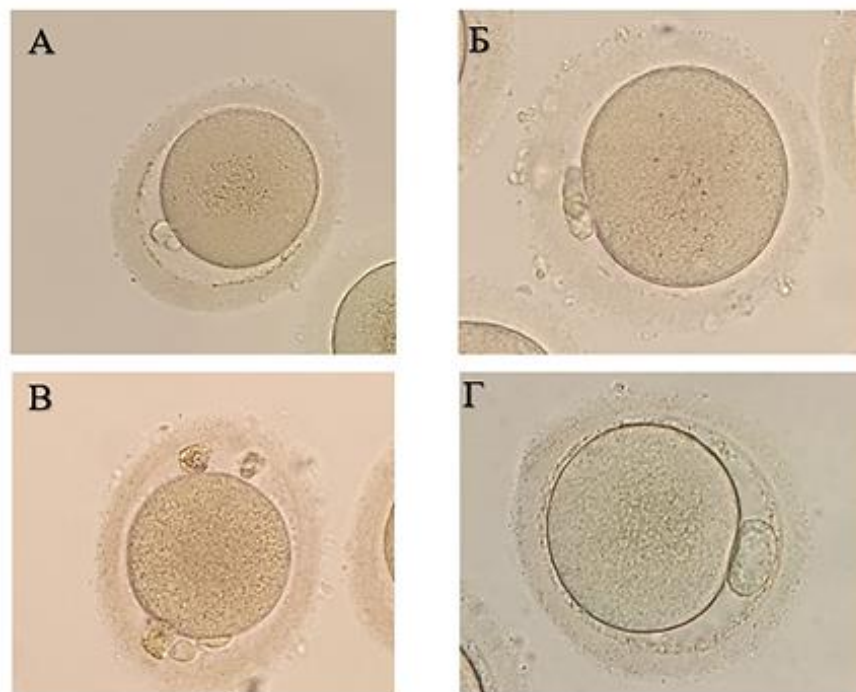


Рис.3.12. Екстрацитоплазматичні порушення: А) збільшений перивітеліновий простір; Б) фрагментація полярного тільця; В) дебрис у перивітеліновому просторі; Г) велике полярне тільце.

Що стосується включень у перивітеліновому просторі, розрізняють варіанти як фрагментації полярного тільця, так і наявності дебрису чи

зернистості (рис.3.12). Фрагментоване полярне тільце відмічали у 15 випадках (6.4 %), тоді як на інші варіанти включень припадало 5.6 % (13 випадків).

Інформативність оцінки полярного тільця залишається предметом дискусій, оскільки взаємозв'язок між його морфологією та результатами запліднення суперечливий. Однак визначеним є той факт, що екструзія аномально великого полярного тільця за рахунок зміщення веретена поділу значно частіше асоціюється із появою багатоядерних бластомерів у ембріонів, порівняно з іншими морфологічними відхиленнями [27, 48]. Аномально великі розміри полярного тільця відзначали у 3 випадках – 1.3 % (рис.3.13).

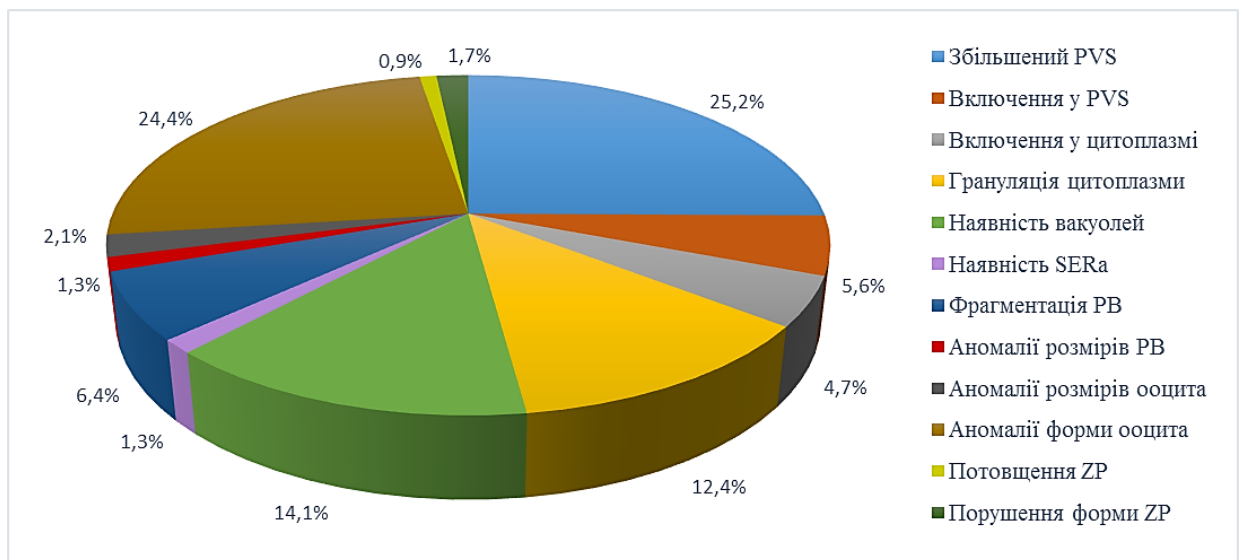


Рис.3.13. Діаграма частот типів порушень морфології (%) серед проаналізованих клітин у первинних донорок.

Таким чином, серед проаналізованих морфологічних відхилень найчастіше реєстрували збільшення перивітелінового простору, що може пов'язуватись із старінням ооцитів у фолікулах після стимуляції чи культури *in vitro*, та витягнута форма ооцитів, що, згідно нашого дослідження, частіше реєструвалась у жінок з більшими рівнями АМГ.

### 3.4. Вплив повторних контрольованих стимуляцій яєчників на кількісні та якісні характеристики ооцитів

Для ретроспективної оцінки впливу повторних стимуляцій яєчників на стан репродуктивних можливостей жінок було відібрано 54 донорки із 6 повторними циклами стимуляцій. Ми мали на меті порівняти зміни протягом 6 послідовних циклів у кожної з донорок, а також порівняти результати між циклами, при цьому контролем слугували результати їх первинної донації. Враховуючи попереднє вивчення впливу низки факторів на вихід клітин серед первинних донорок, було прийнято рішення включати у дане дослідження донорів не старше 28 років, із рівнем АМГ у межах до 7 нг/мл та показниками ІМТ у межах норми (табл. 3.3), окрім того, різниця між кожним наступним циклом становила мала становити не менше 2 місяців, згідно рекомендацій.

Таблиця 3.3.

Вихідні параметри повторних донорок яйцеклітин

<i>Параметри</i>	<i>Значення (n=54)</i>
Вік	24.7±1.3
Значення ІМТ	21.6±1.6
Показники АМГ	4.97±1.2

Результати нашого дослідження показали, що статистично значущої різниці у кількості отриманих зрілих клітин між першим та наступними 4 послідовними циклами стимуляцій не спостерігається (табл. 3.4), при цьому помітно незначне поступове зниження показників. Однак, після 5 циклу контрольованої оваріальної стимуляції відбувається суттєве зниження у кількості отриманих зрілих клітин, порівняно із контрольним 1 циклом, тоді як після 4 циклу різниця у зрілості клітин менш помітна. Навпаки, у дослідженнях Paul et al. повідомляли не лише про більшу кількість зрілих ооцитів від донорів із трьома та більше циклами, а й вищі показники якості ембріонів 3-го дня [42].

Таблиця 3.4.

Порівняння повторних стимуляцій яєчників із контрольним циклом

<i>Кількість циклів КСЯ</i>	<i>Кількість ооцитів МП (Me (Q1-Q3))</i>	<i>р-значення</i>
Цикл 1 (контроль)	22.5 (17.75 – 29.25)	-
Цикл 2	22.0 (18.0 – 25.75)	>0.9
Цикл 3	21.0 (16.0 – 26.25)	>0.9
Цикл 4	19.5 (15.25 – 31.0)	>0.9
Цикл 5	18.0 (12.0 – 24.0)	0.2260
Цикл 6	12.0 (10.0 – 18.0)	<0.05*

Примітка: для розрахунку р-значення використовували критерій Фрідмана для закону розподілу відмінного від нормального; \*позначено змінні, що мають статистичну значущість.

При порівнянні циклів між собою (табл. 3.5), також відзначили помітні відмінності між 6 циклом та кожним попереднім. Загалом дані вказують на те, що суттєвої різниці у кількості зрілих клітин між іншими циклами попарно не спостерігається, що підтверджує помітний вплив на вихід клітин стадії МП лише після 5 циклу стимуляції яєчників, після 4 циклу, аналогічно, спостерігаються незначні відмінності.

Таблиця 3.5.

Порівняння повторних стимуляцій яєчників між циклами

	<i>Цикл 2</i>	<i>Цикл 3</i>	<i>Цикл 4</i>	<i>Цикл 5</i>	<i>Цикл 6</i>
<i>Цикл 2</i>	-				
<i>Цикл 3</i>	$\rho > 0.9$	-			
<i>Цикл 4</i>	$\rho > 0.9$	$\rho > 0.9$	-		
<i>Цикл 5</i>	$\rho = 0.1428$	$\rho = 0.8378$	$\rho = 0.3208$	-	
<i>Цикл 6</i>	$\rho < 0.05^*$	$\rho < 0.05^*$	$\rho < 0.05^*$	$\rho < 0.05^*$	-

Примітка: для розрахунку р-значення використовували критерій Фрідмана для закону розподілу відмінного від нормального; \*позначено змінні, що мають статистичну значущість.

Дослідження кількості клітин із морфологічними порушеннями навпаки показали їх збільшення відносно циклів стимуляції (табл.3.6), при цьому підвищення появи дисморфізмів відзначається після 4 циклу КСЯ. Такі результати можуть бути пов'язані як і з поступовим вичерпанням оваріального запасу донорів і залученням фолікулів, що більш тривалий час піддавались негативному впливу, зокрема, окислювальному стресу, так і з загальною варіативністю фенотипових характеристик отриманих клітин між циклами відносно кожної донорки, залежно від пулу закладених фолікулів.

Таблиця 3.6.

Оцінка кількості ооцитів із морфологічними порушеннями відносно послідовних циклів стимуляції

<i>Кількість циклів КСЯ</i>	<i>Кількість ооцитів МП із дисморфізмами (Me (Q1-Q3))</i>	<i>p-значення</i>
Цикл 1 (контроль)	0 (0 – 1)	-
Цикл 2	0 (0 – 1)	>0.9
Цикл 3	0 (0 – 1.25)	>0.9
Цикл 4	2.0 (0 – 3.25)	0.1428
Цикл 5	3.0 (1.0 – 6.0)	<0.05*
Цикл 6	5.0 (3.0 – 9.25)	<0.05*

Примітка: для розрахунку p-значення використовували критерій Фрідмана для закону розподілу відмінного від нормального; \*позначено змінні, що мають статистичну значущість.

Таким чином, кількість ооцитів від молодих донорів підтримується на відносно сталому рівні протягом принаймні 5 повторюваних циклів стимуляції яєчників. У нашому дослідженні критичною точкою, що має вплив на вихід зрілих клітин та їх морфологічні характеристики є саме 4 цикл стимуляції яєчників, після якого відбувається зниження даних показників. Тоді як, у літературі питання вивчення впливу повторних стимуляцій у донорок на

відповідь яєчників та кількість зрілих клітин представлена поодинокими дослідженнями. Наявні дані підтверджують можливість донорів пройти до 3 циклів стимуляції без негативного впливу на відповідь яєчників на гонадотропіни, кількість отриманих зрілих ооцитів, якість ембріона або клінічну вагітність [32, 42].

При цьому, існуючі обмеження у кількості циклів стимуляції обумовлені можливими довгостроковими ризиками для донорів, зокрема, що стосується потреби у репродуктивних послугах для самих донорів у майбутньому [46].

Недоліком нашого дослідження є неможливість оцінити вплив повторних КСЯ саме на запліднення та розвиток ембріонів, тому ми могли оцінити лише фактичний вплив на статистику появи дисморфізмів ооцитів, що вже опосередковано впливатимуть на компетентність ембріонів. Окрім того, особливою проблемою як нашого, так і подібних досліджень, є відсутність єдиної бази донорів яйцеклітин, оскільки часто жінки зловживають процедурами донації статевих клітин, відвідуючи різні клініки та нехтуючи при цьому терміном між процедурами та їх кількістю.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Дана робота присвячена проспективному та ретроспективному дослідженню впливу низки факторів на репродуктивну систему донорок статевих клітин, зокрема їх здатності до продукції певного числа ооцитів, що можуть успішно завершити процеси ядерного та цитоплазматичного дозрівання. Серед таких факторів, було обрано вік жінок, індекс маси тіла, рівень антимюллерового гормону та повторні стимуляції яєчників.

Показано, що існує визначена негативна кореляція між віком донорок й загальною кількістю вилучених клітин та кількістю клітин, що досягнули зрілості. Серед жінок більш старшого вікової категорії, що брали участь у програмі донації, не було різниці у кількості клітин із порушеннями морфології, при цьому спостерігали різницю у загальному числі вилучених клітин. Однак наші результати можуть обмежуватись розмірами вибірки та оцінкою лише морфології та кількості ооцитів. Тоді як, дослідження Nogan et al. підтверджують важливість вибору для програм донації більш молодих учасниць за рахунок вищих показників живонародженості у реципієнтів [30], оскільки ті менше піддаються негативному впливу процесів старіння у яєчниках, обумовленому окислювальним стресом чи мітохондріальними порушеннями.

Аналіз впливу маси тіла на досліджувані показники статевих клітин показав негативну кореляцію між ІМТ та загальним числом клітин та позитивну кореляцію між ІМТ та віком, що грає роль не на користь жінок в аспектах репродуктивного здоров'я та можливості отримання здорового потомства. Надмірна вага була визначена більш негативним прогностичним фактором для оцінки загальної кількості клітин та виходу зрілих клітин, порівняно із недостатньою вагою. Одержані результати та літературні дані стосовно недостатньої ваги зосереджуються на незначних показниках зниження ІМТ [15], оскільки у разі критичного зниження маси тіла відбувається припинення нормального перебігу менструального циклу та

суттєво впливає на репродуктивні можливості жінок [12], а отже має рівносильний негативний вплив, відповідно до надмірної ваги та ожиріння.

Вищі показники маркера оваріального резерву асоціювались із кращою відповіддю яєчників на гонадотропіни, відповідно була встановлена позитивна кореляція між АМГ та як загальним числом вилучених клітин, так і показниками їх зрілості. Особливий інтерес представляла оцінка впливу показників АМГ понад 7 нг/мл на морфологічні особливості ооцитів. У ході чого було визначено асоціацію вищих рівнів АМГ із порушеннями нормальної форми ооцитів та грануляцією цитоплазми у 3 рази частіше, порівняно із групою із нижчими показниками. Такі результати частково підтверджуються подібними дослідженнями Allahveisi et al. стосовно особливостей цитоплазми, однак потребують використання більшої вибірки [4]. Окрім того, ми не зосереджували увагу на дослідження низьких рівнів АМГ, що також можуть мати вплив на якісні характеристики ооцитів, згідно даних літератури. Для оцінки кількісних параметрів АМГ залишається золотим стандартом, тоді як варто зосередити більшу увагу навколо оцінки даного маркеру саме на морфологічні показники статевих клітин, оскільки його роль у прогнозуванні якості ооцитів залишається суперечливою.

Що стосується аналізу морфології ооцитів, то найбільш частими порушеннями зареєстрованими серед досліджуваної вибірки були саме екстрацитоплазматичні порушення, здебільшого збільшення перивітелінового простору (25.2 %), обумовлені старінням ооцитів, та витягнута форма клітин (24.4 %). При цьому, передбачаємо, що можлива причина старіння ооцитів обумовлювалась часовими проміжками між введенням триггеру та процедурою збору ооцитів, а також часом їх культивування. Однак меншою мірою може бути обумовлено віковими змінами пов'язаними зі старінням яєчника, оскільки досліджувана вибірка представлена молодими жінками і кількість клітин із дисморфізмами у попередніх дослідженнях між віковими групами не відрізнялась.

Оцінка повторних контрольованих стимуляцій яєчників залишається багатогранним питанням, що враховує варіабельність показників жінок між циклами, що залучались до процедури донації принаймні 6 разів. Аналіз даних показує відсутність впливу протягом 5 послідовних циклів із залученням одних і тих же донорів, однак подальші донації асоціюються зі зниженою кількістю вилучених зрілих клітин. Такі дані підтверджують обмеження стосовно кількості донацій статевих клітин за життя жінки [45, 46], оскільки оваріальний запас залишається невідновлюваним, при цьому накладається вплив репродуктивного старіння з часом. Аналогічно, при поступовому зменшенні кількості зрілих клітин, збільшується кількість клітин із морфологічними порушеннями. Відкритими залишаються питання стосовно довгострокового впливу повторюваних КСЯ на репродуктивну функцію донорок, а також ризики пов'язані із проведенням процедури.

Таким чином, на основі проаналізованих даних, з метою підвищення результативності проведення програм ДРТ із залученням донорів, найбільш оптимальним є використання гамет від жінок, що мають вік до 35 років, нормальний індекс маси тіла та брали участь не більш, ніж у 5 програмах донацій ооцитів. З огляду на суб'єктивність отриманих результатів шляхом оцінки лише ооцитів, заохочуються подальші дослідження для уточнення цих висновків і розробки більш персоналізованих та ефективних підходів до донорства і стимуляції яєчників.

## ВИСНОВКИ

1. Виявлено тенденцію до поступового зниження кількості вилучених ооцитів та зменшення показників їх зрілості з віком у донорок ооцитів. У досліджуваній когорті порушення морфології не були асоційовані з віком.

2. Вплив надлишкової ваги більшою мірою позначався на показниках зрілості та загальної кількості клітин, при цьому вік та ІМТ можуть мати взаємний вплив на вихід статевих клітин після стимуляції.

3. Встановлено асоціацію вищих рівнів АМГ з такими порушеннями морфології, як грануляція цитоплазми та аномалії форми ооцитів, що зустрічались із частотою 14.8 % та 28.9 % відповідно. Тоді як, у групі з показниками АМГ нижче 7 нг/мл частота даних дисморфізмів становила 8.2 % та 16.5 % відповідно, що в 3 рази менше. Для кількісної оцінки отриманих клітин АМГ залишається гарним прогнозованим показником.

4. При оцінці морфологічних показників більша частка зареєстрованих випадків припадала на екстрацитоплазматичні порушення – 67.6 %, серед яких частіше зустрічались саме збільшення перивітелінового простору (25.2 %) та порушення форми клітин (24.4 %).

5. Не виявлено відмінностей у реакції яєчників на гонадотропіни протягом 5 послідовних циклів стимуляцій, якісні характеристики ооцитів зберігались протягом 4 циклів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. A healthy lifestyle – WHO recommendations. URL: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/a-healthy-lifestyle---who-recommendations>
2. Abdelazim I. A. et al. Methods of evaluation of the ovarian reserve. *Journal of Obstetrics and Gynecological Investigations*. 2018. № 1. P. 62–66.
3. Alizadeh A. et al. Causal Effects of Body Mass Index and Maternal Age on Oocyte Maturation in Assisted Reproductive Technology: Model-Average Causal Effect and Bayesian LASSO Method. *Iran J Public Health*. 2020 Nov. Vol. 49, No 11. P. 2161-2169.
4. Allahveisi A. et al. Comparison of morphometric and morphology oocytes after *in vitro* maturation between healthy women and patients with polycystic ovarian syndrome. *Acta Endocrinol (Buchar)*. 2019 Jul-Sep. Vol. 15, No 3. P. 295-300.
5. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*. 2011. Vol. 26, No 6. P. 1270–1283.
6. Aydın G.A. et al. Assessment of the relationship of basal serum anti-mullerian hormone levels with oocyte quality and pregnancy outcomes in patients undergoing ICSI. *Iran J Reprod Med*. 2015 Apr. Vol. 13, No 4. P. 231-236.
7. Baltz J. M., Tartiat A. P., Cell volume regulation in oocytes and early embryos: connecting physiology to successful culture media. *Human Reproduction Update*. March-April 2010. Vol. 16, No 2. P. 166–176.
8. Benc M. et al. Improving the Quality of Oocytes with the Help of Nucleolotransfer Therapy. *Pharmaceuticals*. 2021. Vol. 14, No 4. P. 1-13.
9. Bogolyubova I., Salimov D., Bogolyubov D. Chromatin Configuration in Diplotene Mouse and Human Oocytes during the Period of Transcriptional Activity Extinction. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 15. Vol.24, No 14. P. 1-13.

10. Borges E. et al. The predictive value of serum concentrations of anti-Müllerian hormone for oocyte quality, fertilization, and implantation. *JBRA Assist Reprod.* 2017 Sep 1. Vol. 21, No 3. P. 176-182.
11. Boucret L. et al. Deep sequencing shows that oocytes are not prone to accumulate mtDNA heteroplasmic mutations during ovarian ageing. *Hum Reprod.* 2017. Vol. 32, No 10. P. 2101–2109.
12. Boutari C. et al. The effect of underweight on female and male reproduction. *Metabolism.* 2020. Vol. 107. P. 154-229.
13. Burkart A.D. et al. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J Cell Biol.* 2012 Apr 2. Vol. 197, No 1. P. 37-44.
14. Chen Z.Q., Ming T.X., Nielsen H.I. Maturation arrest of human oocytes at germinal vesicle stage. *J Hum Reprod Sci.* 2010 Sep. Vol. 3, No. 3. P. 153-157.
15. Christensen M. W. et al. Effect of Female Body Mass Index on Oocyte Quantity in Fertility Treatments (IVF): Treatment Cycle Number Is a Possible Effect Modifier. A Register-Based Cohort Study. *PLoS One.* 2016 Sep 21. Vol. 11, No 9. P. 1-15.
16. Comhaire F. H., Vandenberghe W., Decler W. External factors affecting fertility, and how to correct their impact. *Facts Views Vis Obgyn.* 2017 Dec. Vol. 9, No 4. P. 217-221.
17. Da Broi M. G. et al. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet.* 2018 May. Vol. 35, No 5. P. 735-751.
18. Da Broi M.G. et al. Oocyte oxidative DNA damage may be involved in minimal/mild endometriosis-related infertility. *Mol Reprod Dev.* 2018. Vol. 85, No 2. P. 128–136.
19. Dai X. et al. AMH has no role in predicting oocyte quality in women with advanced age undergoing IVF/ICSI cycles. *Sci Rep.* 2020 Nov 12. Vol. 10, No 1. P.

20. De Kat A.C. et al. Back to the basics of ovarian aging: a population-based study on longitudinal anti-Müllerian hormone decline. *BMC Med.* 2016 Oct 3. Vol. 14, No 151. P. 1-9.
21. Dornelles V.C. et al. The impact of body mass index on laboratory, clinical outcomes and treatment costs in assisted reproduction: a retrospective cohort study. *BMC Women's Health.* 2022. Vol. 22, No 479. P.
22. Duncan F. E., Confino R., Pavone M.E. Chapter 9 Female Reproductive Aging: From Consequences to Mechanisms, Markers, and Treatments, Editor(s): Jeffrey L. Ram, P. Michael Conn. *Conn's Handbook of Models for Human Aging (Second Edition)*, Academic Press. 2018. P. 109-130.
23. Fang T. et al. The impact of oocytes containing smooth endoplasmic reticulum aggregates on assisted reproductive outcomes: a cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2022. Vol. 22, No 838. P. 2-9.
24. Fritz R, Jindal S. Reproductive aging and elective fertility preservation. *J Ovarian Res.* 2018 Aug 11. Vol. 11, No 1. P. 66.
25. Grover A. R. et al. The Oocyte, Editor(s): Michael K. Skinner, *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, Academic Press. 2018. P. 21-28.
26. Halim B. et al. Does oval oocyte have an impact on embryo development in in vitro fertilization? *JBRA Assist Reprod.* 2017 Feb 1. Vol. 21, No 1. P. 15-18.
27. Hassa H., Aydın Y., Taplamacıoğlu F. The role of perivitelline space abnormalities of oocytes in the developmental potential of embryos. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2014 Aug 8. Vol. 15, No 3. P. 161-163.
28. He M. et al. Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Mar 19. Vol. 9. P. 1-18.
29. Hoffman D. Maternal underweight does not adversely affect the outcomes of IVF/ICSI and frozen embryo transfer cycles or early embryo development. *Gynecol Endocrinol.* 2022 Jun. Vol. 38, No 6. P. 467-473.

30. Hogan G. R. et al. Oocyte donor age has a significant impact on oocyte recipients' cumulative live-birth rate: a population-based cohort study. *Fertility and Sterility*. 2019. Vol. 112, No 4. P. 724-730.
31. Howie R., Kay V. Controlled ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2018 Apr 2. Vol. 79, No 4. P. 194-199.
32. Jain A. et al. The effect of multiple cycles in oocyte donors. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 May. Vol. 192, No 5. P. 1382-1384.
33. Ji H. et al. Structural and metabolic cumulus cell alteration affects oocyte quality in underweight women. *Zygote*. 2024. Vol. 32, No 1. P. 77-86.
34. Jirge P. R. et al. Ovarian Stimulation in Assisted Reproductive Technology Cycles for Varied Patient Profiles: An Indian Perspective. *J Hum Reprod Sci*. 2022 Apr-Jun. Vol. 15, No 2. P. 112-125.
35. Lehmann P. et al. Anti-Müllerian hormone (AMH): a reliable biomarker of oocyte quality in IVF. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Apr. Vol. 31, No 4. P. 493-498.
36. Liu D. et al. Effects of body mass index on IVF outcomes in different age groups. *BMC Womens Health*. 2023 Aug 9. Vol. 23, No 1. P. 1-9.
37. Liu Y., Gao J. Reproductive aging: biological pathways and potential interventive strategies. *Journal of Genetics and Genomics*. Vol. 50, No 3, 2023. P. 141-150.
38. Magnus M. C. et al. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *BMJ*. 2019 Mar 20. Vol. 364:l869. P. 1-8.
39. Molinari E. et al. Polarized light microscopy-detectable structures of human oocytes and embryos are related to the likelihood of conception in IVF. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Oct. Vol. 29, No 10. P. 1117-1122.
40. Okudaira Y., Wakai T., Funahashi H. Levels of cyclic-AMP and cyclic-GMP in porcine oocyte-cumulus complexes and cumulus-free oocytes derived from small and middle follicles during the first 24-hour period of in vitro maturation. *J Reprod Dev*. 2017 Apr 21. Vol. 63, No 2. P. 191-197.

41. Palinska-Rudzka K., Mathur R., Principles of controlled ovarian stimulation for assisted reproduction. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. 2023. Vol. 33, No 4. P. 91-96.
42. Paul L. T, Atilan O., Tulay P. The effect of repeated controlled ovarian stimulation cycles on the gamete and embryo development. *Zygote*. 2019. Vol. 27, No 5. P. 347-349.
43. Pei Z. et al. The molecular regulatory mechanisms of meiotic arrest and resumption in Oocyte development and maturation. *Reprod Biol Endocrinol*. 2023 Oct 2. Vol. 21, No 90. P. 1-12.
44. Penzias A. et al. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2020. Vol. 114, No 6. P. 1151-1157.
45. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Repetitive oocyte donation: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2020 Jun. Vol.113, No 6. P. 1150-1153.
46. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee for the Society for Assisted Reproductive Technology. Guidance regarding gamete and embryo donation. *Fertil Steril*. 2021 Jun. Vol. 115, No 6. P.1395-1410.
47. Purcell S.H, Moley K.H. The impact of obesity on egg quality. *J Assist Reprod Genet*. 2011 Jun. Vol. 28, No 6. P. 517-524.
48. Rienzi L. et al. The oocyte. *Human Reproduction*. 1 August 2012. Vol. 27, No 1. Pages 12–121.
49. Robker R. L., Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology*. 2008. Vol. 15, No 2. P. 115-121.
50. Rybska et al. Cytoplasmic and nuclear maturation of oocytes in mammals – living in the shadow of cells developmental capability. *Medical Journal of Cell Biology*. 2018. Vol. 6, No 1. P. 13-17.

51. Sauer M. V. Revisiting the early days of oocyte and embryo donation: relevance to contemporary clinical practice. *Fertility and Sterility*. 2018. Vol. 110, No 6. P. 981-987.
52. Sinha N. et al. Anti-Müllerian hormone treatment enhances oocyte quality, embryonic development and live birth rate. *Biol Reprod*. 2022 Sep 12. Vol. 107, No 3. P. 813-822.
53. Takahashi T. et al. Cellular and molecular mechanisms of various types of oocyte aging. *Reprod Med Biol*. 2011 Jul 2. Vol. 10, No 4. P. 239-249.
54. Titus S. et al. Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. *Sci Transl Med*. 2013 Feb 13. Vol. 5, No 172. P. 1-12.
55. Trebichalska Z. et al. Cytoplasmic maturation in human oocytes: an ultrastructural study. *Biol Reprod*. 2021 Jan 4. Vol.104, No1. P.106-116.
56. Turathum B., Gao E.M., Chian R.C. The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells*. 2021 Sep 20. Vol. 10, No 9. P. 1-18.
57. Ulrich N.D, Marsh E.E. Ovarian Reserve Testing: A Review of the Options, Their Applications, and Their Limitations. *Clin Obstet Gynecol*. 2019 Jun. Vol. 62, No 2. P. 228-237.
58. Whang J. et al.. Effects of Repeated Ovarian Stimulation on Ovarian Function and Aging in Mice. *Dev Reprod*. 2021 Dec. Vol.25, No 4. P.213-223.
59. Winship A. L. et al. The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing. *Human Reproduction Update*. 2018. Vol. 24, No 2., P. 119–134.
60. Wu L., Wu B. Impact of Body Mass Index (BMI) on Retrieval of Oocyte Numbers in *In Vitro* Fertilization Women. 2018. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/87298>
61. Wyse B.A. et al. Transcriptomics of cumulus cells – a window into oocyte maturation in humans. 2020. *J Ovarian Res*. Vol. 13, No 93. P. 1-14.

62. Yang L. et al. Mitochondrial DNA mutation exacerbates female reproductive aging via impairment of the NADH/NAD<sup>+</sup> redox. *Aging Cell*. 2020 Sep. Vol 19, No 9. P. 1-14.

63. Zhang X. et al. Study on follicular fluid metabolomics components at different ages based on lipid metabolism. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020. Vol. 18, No 42. P. 1-8.

64. Zhao J. et al. Relationship between advanced maternal age and decline of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY)*. 2023 Feb 27. Vol. 15, No 7. P. 2460-2472.

65. Баранов В. С, Кузнецова Т. В. Цитогенетика Эмбрионального Развития Человека. СПб: Издательство Н-Л; 2007. 640 с.

66. Заболотько В. М. Інформаційно-статистичний довідник про допоміжні репродуктивні технології в Україні. Київ: ДЗ «Центр медичної статистики МОЗ України». 2022. С.13.

67. Про затвердження Порядку застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні: Наказ Міністерства охорони здоров'я № 383 від 06.03.2024. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1697-13#Text>