

УДК 591.315:599.89

Варианты и вариабельность дробления эмбрионов человека

Ю. К. Доронин^{1*}, И. В. Сенечкин², Л. В. Хилькевич², М. А. Курцер²¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12²Перинатальный медицинский центр, отделение лечения бесплодия и ЭКО, 117209, Москва, Севастопольский просп., 24, корп. 1

*E-mail: ljh_rjycn@mail.ru

Поступила в редакцию 08.09.2015

Принята к печати 25.04.2016

РЕФЕРАТ С целью выяснения природы вариабельности дробления проанализированы цейтраферные видеозаписи доимплантационного развития эмбрионов человека, аккумулярованные в рамках стандартного протокола культивирования после процедуры внутриклеточной инъекции сперматозоида. Детально изучены топографические особенности и временные параметры дробления, определены продолжительности циклов и прослежена генеалогия бластомеров 2–8-клеточных эмбрионов человека. Обнаружено, что 4-клеточные эмбрионы распределяются в четыре группы в соответствии с ориентацией и последовательностью плоскостей второго дробления. Динамика развития эмбрионов с разными вариантами второго деления дробления существенно отличается как параметрами циклов дробления, так и продолжительностями циклов бластомеров. Анализ последовательностей делений бластомеров человека позволил предположить, что в итоге дробления элиминируются влияния зиготических детерминантов, после чего бластомеры приобретают способность к собственным синтезам и регуляциям, к поляризации и формированию функциональных контактов и, в конечном итоге, к собственным специфическим дифференциациям. Полученные с помощью неинвазивной методологии сведения о раннем развитии эмбрионов человека дополняют и расширяют представления о событиях эмбриогенеза плацентарных млекопитающих и могут найти применение в практике репродуктивных технологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА анализ цейтраферной видеозаписи, дробление, генеалогия бластомеров, эмбрионы человека.

ВВЕДЕНИЕ

Последние десятилетия в связи с бурным развитием и коммерциализацией технологий «вспоможения зачатия» (репродуктивных технологий) доимплантационные зародыши человека стали предметом пристального внимания в буквальном смысле этих слов. Этические нормы и юридические ограничения позволяют использовать только неинвазивных методов изучения концептусов, т.е. только микроскопические наблюдения. Итогом тщательных феноменологических исследований стала система оценок морфологии и темпов развития ранних эмбрионов человека *in vitro*, позволяющая с большей или меньшей степенью уверенности предсказывать появление имплантационно-компетентных («качественных») бластоцист [1, 2]. Внедрение в практику репродуктивной медицины инкубаторов, оснащенных устройством непрерывной видеорегистрации, существенно расширило возможности диагностики и прогнозирования качества эмбрионов [3–5]. В настоящее время

в архивах центров репродуктивной биологии человека накоплен огромный фактический материал, тщательный анализ которого может не только усовершенствовать прогностические возможности морфокинетического подхода к выявлению перспективных эмбрионов, но и углубить общие представления о раннем развитии плацентарных млекопитающих.

Первая (меридиональная) борозда дробления поляризованной зиготы плацентарных млекопитающих врезается на анимальном полюсе (в непосредственной близости к полярному тельцу) и распространяется от анимального к вегетативному полюсу [6–10]. Борозды дробления бластомеров 2-клеточных эмбрионов ортогональны первой борозде дробления и распространяются в плоскостях, приблизительно совпадающих с экваториальной и меридиональной плоскостями зиготы. Соответственно возможны четыре варианта дробления бластомеров 2-клеточных эмбрионов: оба бластомера делятся экваториально (Е) или меридионально (М) (варианты ЕЕ или ММ),

либо первое деление меридиональное, а второе – экваториальное (вариант МЕ) и наоборот (вариант ЕМ).

Перечисленные сочетания вторых делений дробления описаны у эмбрионов мышей, причем варианты 4-клеточных зародышей различаются «фенотипами». При МЕ- или ЕМ-делениях бластомеры формируют тетраэдрическую структуру (т.е. проецируются на вершины воображаемого тетраэдра). В результате ЕЕ- или ММ-делений бластомеры распределяются в виде «пластинки» или «розетки» [11, 12]. Согласно каноническим описаниям, 4-клеточный эмбрион человека в отличие от 4-клеточных эмбрионов мышей формируется в результате последовательных меридиональных и экваториальных делений бластомеров 2-клеточных эмбрионов и соответственно приобретает тетраэдрическую форму [6, 10, 13]. Между тем, существование принципиальных отличий, в том числе в способах формирования 4-клеточных эмбрионов, на столь ранних (филогенетически древних) базисных этапах эмбриогенеза лабораторных млекопитающих и человека кажется маловероятным.

Возникновение вариантов 4-клеточных эмбрионов в результате вторых делений дробления представляется важным событием раннего онтогенеза. Различия в сегрегации ооплазмы сопряжены с различиями динамического паттерна последующего развития эмбрионов [14, 15], которое, вопреки этому, в норме завершается формированием однотипной финальной структуры, т.е. бластоцисты. Иными словами, этот феномен следует полагать одной из причин вариабельности последующего развития и соответственно наиболее ранним проявлением регуляторной способности эмбрионов млекопитающих.

В соответствии с представленными выше посылами целью этого исследования стал (1) детальный анализ топографических особенностей второго деления дробления культивируемых эмбрионов человека; и (2) анализ вариаций временных параметров последующих этапов дробления у эмбрионов, различающихся вариантами второго деления дробления. Сопоставление генеалогии бластомеров с последовательностью их делений позволило предположить роль дробления, предопределяющую нормальное развитие событий компактизации и кавитации эмбрионов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом исследования послужили цейтраферные видеорегистрации развития 101 эмбриона человека (микроскоп Primo Vision, помещенный в термостат Thermo; видеозахват через каждые 15 мин), полученные в рамках стандартного протокола культивирования от 20 анонимных пациенток в воз-

расте от 27 до 44 лет (в среднем 34.7 г). Ориентацию первых трех делений дробления относительно анимально-вегетативной оси зиготы и последовательные моменты делений зиготы и каждого бластомера вплоть до 16-клеточной стадии развития определяли, просматривая кадры цейтраферной съемки отдельных эмбрионов. Параллельно прослеживали генеалогию бластомеров. На основании этих регистраций 4-клеточные эмбрионы классифицировали в соответствии с вариантами делений второго цикла дробления и рассчитывали продолжительности зиготического периода (от оплодотворения до деления зиготы) и циклов дробления, т.е. разницы времен наступления третьего и первого делений бластомеров (второй цикл дробления), седьмого и третьего делений (третий цикл дробления) и 15-го и седьмого делений (четвертый цикл дробления). Определяли также продолжительности периодов, не сопровождающихся клеточными делениями (разницы времен наступления второго и первого, четвертого и третьего, восьмого и седьмого делений), и периодов клеточных делений (разницы времен третьего и второго, седьмого и четвертого, 15-го и восьмого делений) второго, третьего и четвертого циклов дробления (см. рис. 2). Эти же измерения позволили вычислить продолжительности циклов отдельных бластомеров как разницы моментов делений соответствующих материнских и дочерних бластомеров. На основании этих данных можно восстанавливать и сопоставлять генеалогию бластомеров до наступления 16-клеточной стадии, используя в качестве маркировки бластомеров длительность их циклов. Результаты измерений анализировали и сравнивали с помощью непараметрических методов вариационной статистики с использованием пакетов программ Stadia (А.П. Кулаичев, МГУ им. М.В. Ломоносова) и Statistica v6 (StatSoft). По истечении стандартного срока культивирования диагностировали стадии развития зародышей в соответствии с принятой классификацией [16, 17].

Уже в период первых делений дробления 33 эмбриона обнаружили разнообразные аномалии развития: чрезмерную фрагментацию, чрезвычайно короткие или длительные клеточные циклы (десятки минут или двое и более суток, вплоть до полного отсутствия цитотомии на протяжении всего периода наблюдений), слияния бластомеров вскоре после деления, гигантские внутриклеточные вакуоли и внеклеточные полости у 4–8-клеточных эмбрионов. Эти зародыши были исключены из рассмотрения, но в отдельных случаях поддающиеся определению параметры их первых циклов сопоставляли с соответствующими параметрами у эмбрионов, развивавшихся без органических нарушений.

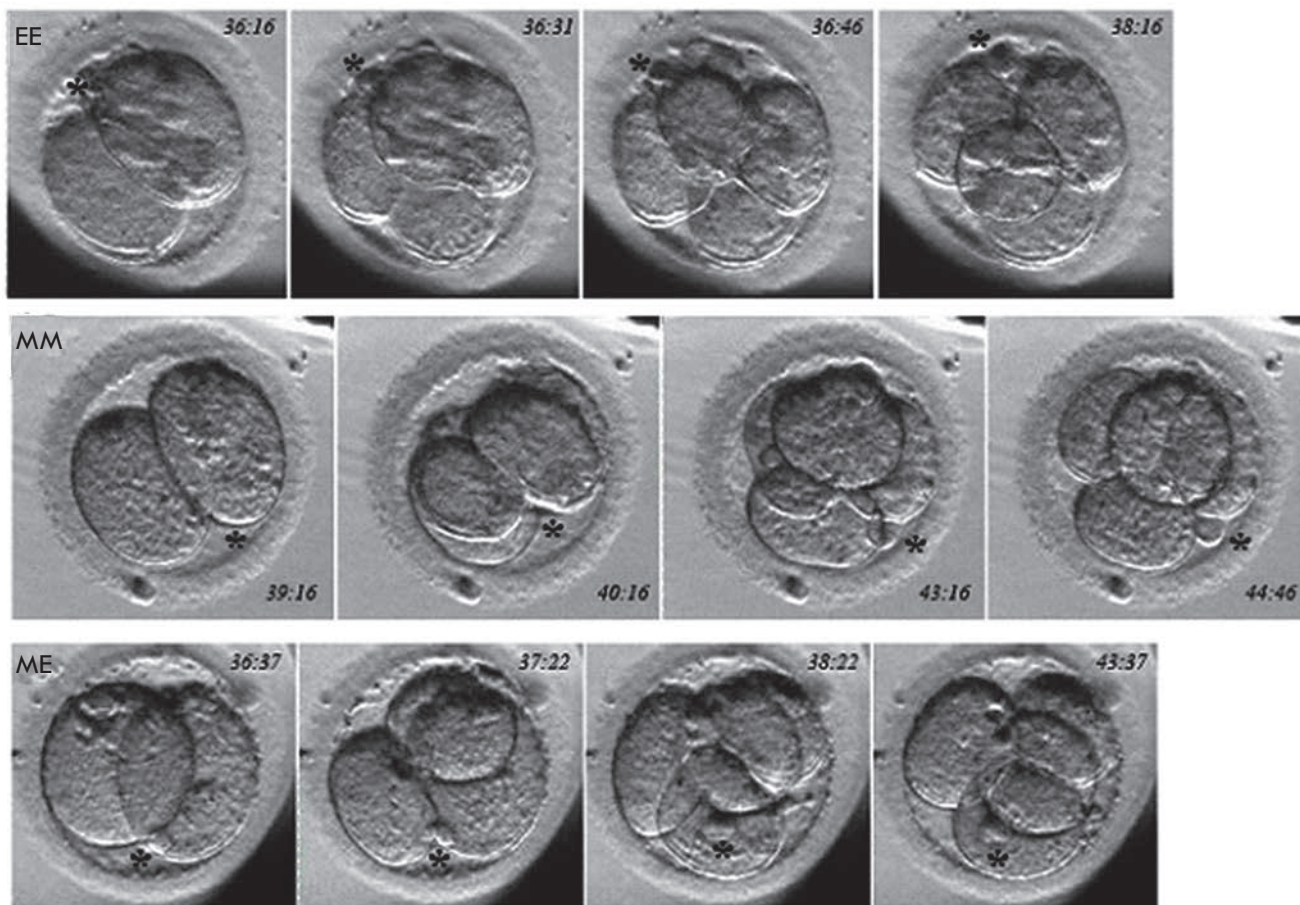


Рис. 1. Становление универсальной тетраэдрической формы 4-клеточных эмбрионов в результате последовательных экваториальных (ЕЕ), меридиональных (ММ) и меридионального и экваториального (МЕ) делений во втором цикле дробления. Вариант экваториального и меридионального деления (не представлен) отличается от варианта МЕ только последовательностью делений. Время после внутриклеточной инъекции сперматозоида (ч:мин) указано в поле изображений. Звездочкой обозначено второе полярное тельце

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимоотношения делящихся бластомеров

Варианты ЕЕ-, ММ-, МЕ- и ЕМ-делений бластомеров обнаружены у 10,3, 19,1, 27,9 и 42,6% 2-клеточных эмбрионов, развивавшихся без структурных аномалий (N = 68). В случае МЕ- или ЕМ-делений в силу ортогональности плоскостей деления бластомеров 2-клеточного зародыша две пары сестринских клеток оказываются ориентированными почти взаимно перпендикулярно, а 4-клеточный эмбрион приобретает близкую к тетраэдру конфигурацию. Со временем геометрическая правильность такого тетраэдра совершенствуется за счет медленных перемещений сестринских пар бластомеров (рис. 1). В результате ЕЕ- или ММ-делений образуются своего рода «пла-

стинка» или «розетка» бластомеров. И в этих случаях сестринские пары бластомеров смещаются, ориентируясь взаимно перпендикулярно. В результате, «пластинка» или «розетка» также принимают форму тетраэдра (рис. 1). Таким образом, форма 4-клеточных эмбрионов человека становится однотипной вне зависимости от ориентации предшествующих борозд дробления. Смещения клеточных пар, вероятнее всего, связаны с оптимизацией формы 4-клеточных зародышей в результате уравнивания механических напряжений, возникающих в ограниченном объеме зародыша после делений бластомеров. Ассоциация сестринских бластомеров, вероятно, связана с длительно сохраняющимися цитоплазматическими мостиками [8, 11, 18]. Длительный контакт между сестринскими бластомерами способствует появлению

клеточных кластеров – компактному размещению потомков blastomerov 2-, 4- и 8-клеточных зародышей, образование которых мы наблюдали при восстановлении генеалогии blastomerov.

Частоты встречаемости вариантов EE, MM, ME и EM у эмбрионов со структурными дефектами (30.3, 15.2, 24.2 и 30.3% соответственно; N = 33) не отличаются от частот у эмбрионов, развивавшихся без структурных аномалий ($\chi^2 = 6.471$, $P = 0.091$), но не соответствуют распределению, характерному для последних ($\chi^2 = 15.130$, $P = 0.002$). Это связано с тем, что доли MM-, ME- и EM-вариантов второго дробления в сравниваемых группах эмбрионов одинаковы (значения χ^2 для соответствующих альтернативных сравнений равны 0.17, 0.09, 0.65; $P = 0.682$, 0.763 и 0.419 соответственно). Частота EE-вариантов деления у аномальных эмбрионов имеет явную тенденцию к превышению (почти втрое) частоты у нормальных эмбрионов ($\chi^2 = 4.30$, $P = 0.038$; с поправкой Йейтса $P = 0.072$). Вероятно, следует полагать, что EE-эмбрионы склонны к органическим нарушениям развития в большей мере, чем эмбрионы с иными вариантами вторых делений дробления. Такая же тенденция отмечена у EE-эмбрионов мышей [19].

Циклы и траектории дробления

Варианты делений blastomerov во втором цикле дробления небезразличны для последующего развития. Для EE-эмбрионов характерна сглаженная «волнообразная» временная траектория развития. У MM-, ME- и EM-эмбрионов ярче выражена «ступенеобразная» траектория (рис. 2). Усредненные временные траектории (см. рис. 2) различаются между собой (парный критерий Вилкоксона; значимость различий (P) между EE- и MM-, EE- и EM-, MM- и ME-, MM- и EM-вариантами равны 0.001; значимость различий между EE- и EM-вариантами – 0.002; между ME и EM – 0.023).

Различия продолжительности циклов дробления становятся явными в третьем цикле дробления и усугубляются в 4-м. Наиболее продолжительны циклы у EE-, наименее – у MM-эмбрионов. EM- и ME-эмбрионы занимают промежуточное положение. Удлинение полных циклов дробления связано, главным образом, с удлинением периодов клеточных делений. Соответственно частота делений максимальна у MM- и минимальна у EE-эмбрионов (табл. 1). MM-эмбрионы достигают стадии 16 клеток через 80.5 ± 4.85 ч (среднее \pm стандартное отклонение); EM-эмбрионы – через 87.7 ± 9.47 ч, а ME- и EE-эмбрионы – через 94.8 ± 11.29 и 98.1 ± 5.05 ч (различия средних величин статистически значимы за исключением различий для EE- и ME-групп ($P = 0.197$); критерий Ван-дер-Вардена).

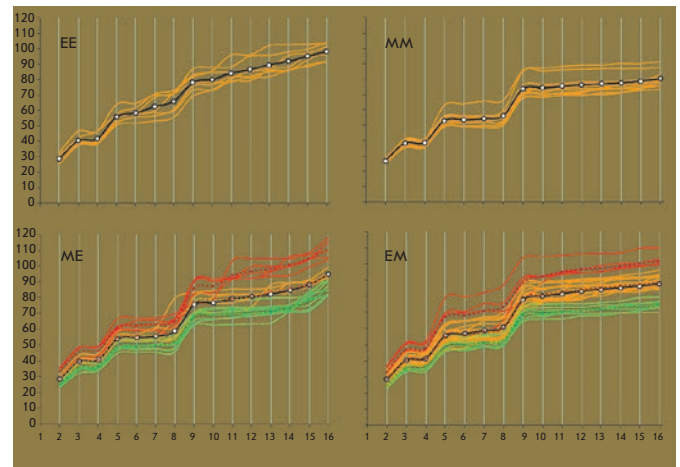


Рис. 2. Траектории дробления отдельных эмбрионов, сгруппированные в соответствии с порядком и ориентацией плоскостей делений во втором цикле дробления (EE, MM, ME и EM). Зеленые, красные и желтые линии в ME и EM группах – траектории эмбрионов с высоким (1), низким (2) и промежуточным (3) темпами дробления. Пунктирные линии – усредненные траектории дробления эмбрионов каждой из различающихся темпом развития групп. Сплошные линии с маркерами – усредненные траектории развития для каждого из вариантов 4-клеточных эмбрионов. Горизонтальная ось – число blastomerov в эмбрионе. Вертикальная ось – время после внутриклеточной инъекции сперматозоида, ч

Вариабельность траекторий развития у ME- и EM-эмбрионов заметно выше, чем у EE- и MM-эмбрионов (см. рис. 2; сравните соответствующие значения стандартных отклонений, представленные в табл. 1). ME- и EM-эмбрионы можно распределить на три группы в соответствии со сходством траекторий. Усредненные траектории развития как ME-, так и EM-эмбрионов из разных групп значимо различаются между собой ($P = 0.0007$ для всех вариантов сравнений, парный критерий Вилкоксона). Эмбрионы второй группы отличаются большей продолжительностью циклов. Циклы дробления у эмбрионов третьих групп могут быть сравнимыми или превышать по продолжительности соответствующие циклы эмбрионов из первых групп, а в отдельных случаях – циклы эмбрионов из вторых групп (см. детали в табл. 2).

ME-эмбрионы первой, второй и третьей групп достигают 16-клеточной стадии развития через 85.1 ± 4.28 (среднее значение \pm стандартное отклонение), 110.5 ± 6.10 и 94.6 ± 2.57 ч; EM-эмбрионы – через

Таблица 1. Временные параметры циклов дробления (среднее значение и стандартное отклонение, ч) эмбрионов с различными вариантами последовательных делений бластомеров 2-клеточных зародышей

		ЕЕ	ММ	МЕ	ЕМ
Численность и проспективные стадии развития зародышей*		В5(2), В4(1), В3(1), В1(3)	В5(7), В4(3), В3(2), В1(1)	В5(3), В4(5), В3(2), В2(2), В1(5), М(2)	В5(8), В4(6), В3(5), В2(4), В1(5), М(1)
Зиготический период		28.6 ± 2.70 ¹	26.7 ± 1.44 ¹	28.2 ± 3.96	28.5 ± 3.61
Полная продолжительность циклов	цикл 2	13.1 ± 2.52	12.1 ± 1.05	12.4 ± 1.22	12.8 ± 1.85
	цикл 3	24.4 ± 5.72 ^{2,3,4}	17.4 ± 3.33 ²	18.1 ± 5.58 ³	19.4 ± 4.96 ⁴
	цикл 4	32.1 ± 8.67 ^{5,6}	24.3 ± 3.06 ^{5,7,8}	36.0 ± 8.12 ^{7,9}	26.9 ± 4.57 ^{6,8,9}
Период без делений	цикл 2	11.9 ± 1.33	11.6 ± 1.12	11.5 ± 1.16	11.9 ± 1.48
	цикл 3	14.3 ± 2.81	14.1 ± 2.78	13.2 ± 1.88	14.3 ± 3.72
	цикл 4	12.1 ± 3.36 ^{10,11}	17.5 ± 4.05 ¹⁰	16.8 ± 7.04	17.3 ± 4.67 ¹¹
Период делений бластомеров	цикл 2	1.1 ± 1.60	0.5 ± 0.31 ^{12,13}	0.9 ± 0.55 ¹²	1.0 ± 0.89 ¹³
	цикл 3	10.0 ± 4.57 ^{14,15,16}	3.3 ± 2.08 ^{14,17}	4.9 ± 5.07 ¹⁵	5.1 ± 2.99 ^{16,17}
	цикл 4	20.0 ± 6.87 ^{18,19}	6.8 ± 2.47 ^{18,20}	19.2 ± 5.93 ^{20,21}	9.6 ± 5.29 ^{19,21}
Среднее время между последовательными делениями клеток**	цикл 2	0.6 ± 0.80	0.2 ± 0.15	0.4 ± 0.28	0.5 ± 0.45
	цикл 3	2.5 ± 1.14	0.8 ± 0.52	1.2 ± 1.27	1.3 ± 0.75
	цикл 4	2.5 ± 0.86	0.9 ± 0.31	2.4 ± 0.74	1.2 ± 0.66

Примечание. Одинаковыми надстрочными цифрами указаны статистически значимые различия средних значений (критерий Ван-дер-Вардена, $P < 0.05$).

*В – стадия бластоцисты; М – стадия морулы; цифрами указаны градации эмбрионов на стадии бластоцисты; в скобках указана численность эмбрионов, достигших указанной стадии.

**Средние значения различаются между собой так же, как средние значения продолжительностей периодов делений бластомеров.

74.9 ± 3.10, 102.1 ± 5.20 и 88.8 ± 3.05 ч соответственно. Различия этих показателей статистически значимы (критерий Ван-дер-Вардена, $P = 0.001$, 0.024 и 0.001). В то же время усредненные траектории развития МЕ- и ЕМ-эмбрионов первой, второй и третьей групп не различаются (парный критерий Вилкоксона; $P = 0.256$, 0.158 и 0.112 соответственно).

К завершению срока регистрации МЕ- и ЕМ-эмбрионы из разных групп достигли разных стадий развития (табл. 2). Первые группы объединяют эмбрионы, сформировавшие развитые бластоцисты (градации 4 и 5). Вторые группы включают медленно развивавшиеся эмбрионы, которые достигли стадии морулы или начинающей кавитировать бластоцисты. Третьи группы разнородны, поскольку к концу наблюдений составляющие их эмбрионы имеют весь спектр бластоцист, хотя большую часть составляют бластоцисты градаций 2 и 3 (табл. 2). Сопоставление альтернативных распределений (численности эмбрионов, достигших градаций 5 и 4, с численностью более ранних эмбрионов в конце срока регистраций) показывает явное доминирование как МЕ-, так и ЕМ-эмбрионов в группе 1 и соответственно доминирова-

ние отстающих в развитии зародышей в группе 2 (двусторонний точный критерий Фишера, $P = 0.021$ и 0.001). Такое же сопоставление групп 1 и 3 показало значимое различие альтернативных распределений у ЕМ-эмбрионов ($P = 0.019$), но сходство у МЕ-эмбрионов ($P = 0.277$).

Срок развития ММ-эмбрионов до 16-клеточной стадии занимает промежуточное положение между показателями для МЕ- и ЕМ-эмбрионов из первых групп, значимо короче первого показателя (критерий Ван-дер-Вардена, $P = 0.017$), но длиннее второго ($P = 0.001$). Усредненная траектория дробления ММ-эмбрионов отличается от траектории у МЕ- и ЕМ-эмбрионов из первых групп (парный критерий Вилкоксона, $P = 0.001$ и 0.000 соответственно). Альтернативное распределение (продвинутые против отстающих в развитии) в группе ММ не отличается от аналогичных распределений в первых группах МЕ- и ЕМ-эмбрионов (точный критерий Фишера, $P = 0.590$ и 0.148), но отличается от распределений во вторых группах ($P = 0.015$ для обоих сравнений).

Усредненные параметры дробления (и соответственно траектории развития в период дробления)

Таблица 2. Временные параметры циклов дробления (среднее значение, стандартное отклонение, ч) МЕ- и ЕМ-эмбрионов с различными темпами развития (группы 1, 2 и 3)

	МЕ			ЕМ			
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 1	Группа 2	Группа 3	
Численность и перспективные стадии развития зародышей	В5(2), В4(4), В3(1), В1(1)	В2(2), В1(2), М(1)	В5(1), В4(1), В3(1), В1(2), М(1)	В5(5), В4(2)	В1(4), М(1)	В5(3), В4(4), В3(5), В2(4), В1(1)	
Зиготический период	25.5 ± 2.01 ^{1,2}	33.3 ± 3.29 ^{1,3}	27.7 ± 2.01 ^{2,3}	25.1 ± 2.19 ^{1,2}	32.9 ± 3.60 ^{1,3}	28.7 ± 2.53 ^{2,3}	
Полная продолжительность цикла	цикл 2	11.3 ± 0.62 ^{4,5}	13.3 ± 0.94 ⁴	13.1 ± 0.87 ⁵	11.7 ± 1.25 ⁴	15.0 ± 0.63 ^{4,5}	12.7 ± 1.81 ⁵
	цикл 3	15.3 ± 3.28 ⁸	18.4 ± 1.21	21.7 ± 8.22 ⁸	16.3 ± 1.94 ⁸	25.7 ± 6.08 ^{8,9}	18.8 ± 3.94 ⁹
	цикл 4	33.0 ± 3.68 ¹¹	45.5 ± 6.49 ^{11,12}	32.1 ± 7.91 ¹²	21.9 ± 3.11 ^{13,14}	28.5 ± 4.50 ¹³	28.5 ± 3.62 ¹⁴
Период без делений	цикл 2	10.5 ± 0.97 ^{6,7}	12.4 ± 0.51 ⁶	12.2 ± 0.64 ⁷	10.8 ± 0.41 ⁶	14.2 ± 0.56 ^{6,7}	11.6 ± 1.21 ⁷
	цикл 3	11.9 ± 0.87 ^{9,10}	14.6 ± 2.51 ⁹	13.9 ± 1.08 ¹⁰	12.3 ± 1.49 ¹⁰	19.6 ± 4.99 ^{10,11}	13.6 ± 2.47 ¹¹
	цикл 4	15.6 ± 4.29	21.3 ± 9.22	14.8 ± 7.57	15.6 ± 1.74	15.1 ± 6.65	18.6 ± 4.65
Период делений бластомеров	цикл 2	0.8 ± 0.60	0.9 ± 0.57	0.93 ± 0.56	0.9 ± 1.01	0.76 ± 0.25	1.08 ± 0.98
	цикл 3	3.4 ± 2.89	3.9 ± 2.18	7.75 ± 7.92	4.0 ± 1.41 ¹²	6.08 ± 2.16 ¹²	5.21 ± 3.59
	цикл 4	17.5 ± 2.81	24.2 ± 9.63	17.3 ± 2.66	6.2 ± 2.98 ¹⁵	13.4 ± 6.00 ¹⁵	9.95 ± 5.19

Обозначения те же, что и в табл. 1.

Таблица 3. Продолжительности и сопоставления циклов бластомеров у эмбрионов с различными вариантами второго деления дробления

Бластомеры	Средние значения ± стандартное отклонение			
	ЕЕ (N = 7)	ММ (N = 13)	МЕ (N = 19)	ЕМ (N = 29)
1	11.9 ± 1.29 ^a	11.6 ± 1.13 ^a	11.7 ± 1.09 ^a	11.9 ± 1.46 ^a
2	13.1 ± 2.51 ^a	12.0 ± 1.09 ^a	12.5 ± 1.21 ^a	12.9 ± 1.83 ^a
1:1	17.6 ± 6.20 ^b	14.9 ± 2.76 ^{b,c}	14.6 ± 2.16 ^{b,c}	15.5 ± 4.01 ^{b,c,d}
1:2	21.1 ± 6.15 ^{1,6,b}	16.6 ± 3.20 ^{6,b}	15.5 ± 2.58 ^{1,9,b,d}	18.2 ± 5.34 ^{9,b,e}
2:1	17.7 ± 2.86 ^{2,7,c}	15.0 ± 3.46 ^{7,d}	14.2 ± 2.44 ^{2,10,d,e}	16.3 ± 3.60 ^{10,c,e,f}
2:2	24.4 ± 9.30 ^{3,4,8,c}	16.2 ± 3.47 ^{5,8,c,d}	17.9 ± 5.66 ^{3,c,e}	18.6 ± 4.33 ^{4,5,d,f}
1:1:1	23.6 ± 5.00 ^{d,e,f}	21.8 ± 3.64 ^{15,e,f}	25.3 ± 6.93 ^{f,g}	24.4 ± 5.15 ^{15,g,h,k,l}
1:1:2	29.7 ± 10.71 ^d	23.8 ± 3.99 ^{12,16,e,g,h,k}	32.4 ± 9.71 ^{12,f,h,k,l}	28.0 ± 5.89 ^{16,g,m,n,p,q}
1:2:1	22.4 ± 5.36 ^g	21.5 ± 4.13 ^{g,l,m,n}	23.0 ± 6.87 ^{h,m,n,p}	24.3 ± 5.32 ^{m,r,s}
1:2:2	32.2 ± 12.50 ^{20,e,g}	22.7 ± 3.67 ^{17,20,l}	28.1 ± 9.74 ^m	27.1 ± 5.55 ^{17,h,r,t,u}
2:1:1	25.4 ± 9.17 ^h	21.4 ± 3.8 ^{13,18,h,p}	26.0 ± 7.88 ^{13,k,q}	24.5 ± 4.43 ^{18,n,t,v,x}
2:1:2	33.8 ± 11.38 ^{21,22,f,h,k}	24.3 ± 3.67 ^{19,21,f,m,p,q}	30.3 ± 10.76 ^{g,n,q,r}	27.6 ± 4.78 ^{19,22,k,s,v,y,z}
2:2:1	20.2 ± 3.77 ^{k,l}	21.2 ± 3.26 ^{k,q,r}	22.8 ± 6.30 ^{l,r,s}	21.7 ± 5.94 ^{l,p,u,x,y}
2:2:2	26.5 ± 10.22 ^l	23.8 ± 3.33 ^{14,n,r}	28.7 ± 6.34 ^{14,p,s}	25.7 ± 5.01 ^{q,z}

Примечание. Одинаковые надстрочные буквы указывают на статистически значимые различия ($P < 0.05$, парный критерий Вилкоксона) длительностей циклов бластомеров у эмбрионов каждой из групп (различия значений в столбцах). Одинаковые надстрочные цифры указывают на статистически значимые различия ($P < 0.05$, критерий Ван-дер-Вардена) длительностей соответствующих циклов у эмбрионов из разных групп (различия значений по строкам).

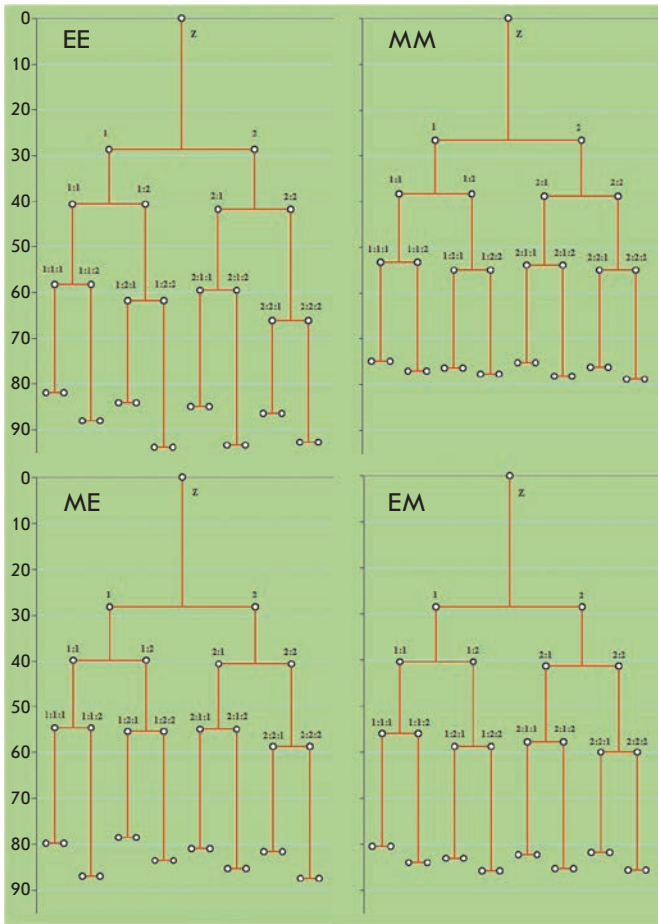


Рис. 3. Генеалогия бластомеров EE-, MM-, ME- и EM-эмбрионов. Вертикальная ось – время от момента внутриклеточной инъекции спермия, ч. Последовательность цифр отражает порядок появления бластомеров: меньшая цифра кодирует бластомеры с менее продолжительным циклом. Вертикальные линии соответствуют средним значениям продолжительностей циклов бластомеров. Z – зигота

ME- и EM-эмбрионов первых групп, так же как MM-эмбрионов (т.е., в совокупности, параметры быстро дробящихся зародышей), хорошо соответствуют прогностическим критериям успешно развивающихся зародышей (см. табл. 1 и 2).

Генеалогия и циклы бластомеров

Продолжительности циклов бластомеров у 4- и 8-клеточных эмбрионов с разными вариантами второго деления дробления, в целом, различны (критерий Крускала–Уоллиса, $P < 0.000$ в обоих случаях). Наиболее короткие циклы свойственны MM-эмбрионам, наиболее длительные – EE-эмбрионам. Промежуточное положение занимают ME- и EM-

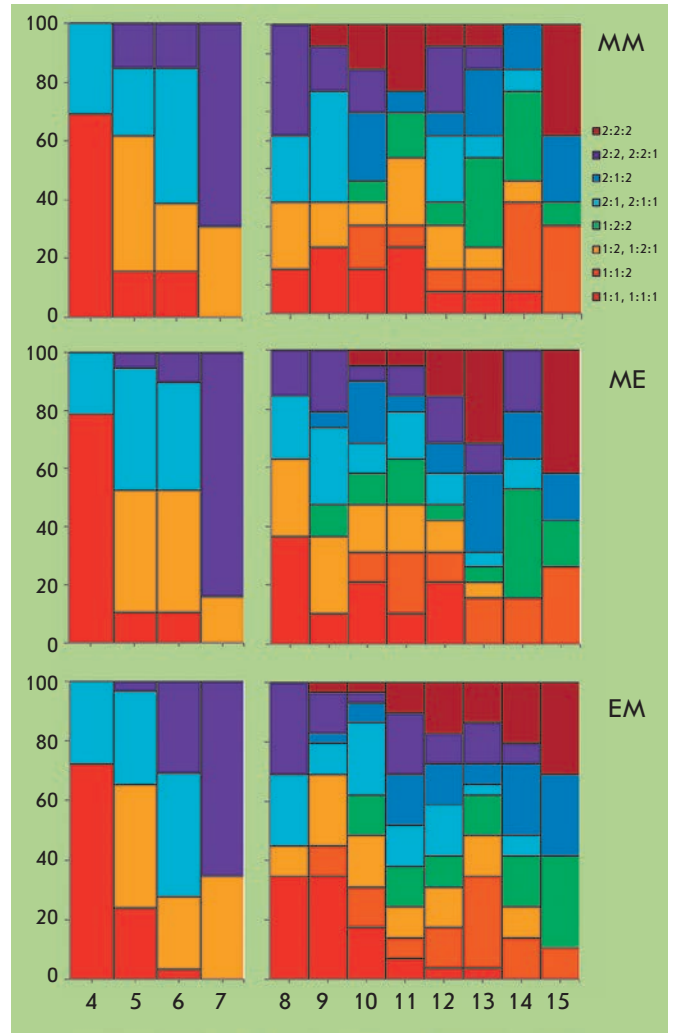


Рис. 4. Распределения моментов делений бластомеров 4- (левые диаграммы) и 8-клеточных (правые диаграммы) MM-, ME-, EM-эмбрионов. Горизонтальные оси – последовательные деления дробления. Отличающиеся цветом столбцы – частоты делений отдельных бластомеров в % от совокупной частоты делений в каждом из последовательных делений (вертикальные оси). Цветовой код различающихся происхождением бластомер представлен в поле правого верхнего рисунка

эмбрионы, у которых циклы соответствующих бластомеров (особенно на 8-клеточной стадии) достаточно близки между собой (см. табл. 3). Циклы бластомеров первых групп ME- и EM-эмбрионов короче, чем соответствующие циклы у эмбрионов из вторых и третьих групп (значения продолжительностей циклов и их статистические сравнения представлены в табл. 4).

В силу генеалогической иерархии время деления того или иного бластомера складывается из продол-

Таблица 4. Продолжительности циклов бластомеров (средние значения, стандартное отклонение, χ^2) и их сопоставления у МЕ- и ЕМ-эмбрионов с различными темпами развития (группы 1, 2 и 3)

Бластомеры	МЕ			ЕМ		
	Группа 1 (N = 8)	Группа 2 (N = 5)	Группа 3 (N = 6)	Группа 1 (N = 7)	Группа 2 (N = 5)	Группа 3 (N = 17)
1	11.0 ± 1.21 ^{1,2,a}	12.4 ± 0.51 ^{1,a}	12.2 ± 0.59 ^{2,a}	10.9 ± 0.46 ^{1,a}	14.2 ± 0.59 ^{1,2,a}	11.7 ± 1.15 ^{2,a}
2	11.7 ± 1.11 ^{3,4,a}	13.3 ± 0.94 ^{3,a}	13.1 ± 0.85 ^{4,a}	11.9 ± 1.33 ^{3,a}	15.0 ± 0.66 ^{3,4,a}	12.7 ± 1.80 ^{4,a}
1:1	13.1 ± 2.10 ^{5,8,b}	16.5 ± 1.77 ⁵	15.1 ± 0.81 ^{8,b}	13.2 ± 1.90 ^{5,9,b,c}	21.0 ± 6.44 ^{5,10,b}	14.9 ± 2.06 ^{9,10,b,c}
1:2	13.8 ± 2.43 ^{6,9,b,c}	17.5 ± 2.47 ⁶	16.1 ± 1.25 ^{9,b}	15.2 ± 2.14 ^{6,b}	25.6 ± 6.95 ^{6,11,b}	17.3 ± 3.76 ^{11,b}
2:1	12.4 ± 0.92 ^{7,10,c,d}	15.5 ± 2.79 ⁷	15.5 ± 2.24 ^{10,c}	14.2 ± 1.40 ^{7,d}	20.9 ± 4.43 ^{7,12,c}	15.8 ± 2.85 ^{12,d}
2:2	14.9 ± 3.13 ^{13,11,d}	18.2 ± 1.53	21.7 ± 8.24 ^{11,c}	15.8 ± 2.06 ^{8,c,d}	23.0 ± 4.89 ^{8,13,c}	18.4 ± 3.96 ^{13,c,d}
1:1:1	20.0 ± 4.06 ^{12,17,e,f,g}	31.9 ± 5.95 ^{12b,c,d}	26.9 ± 5.45 ^{17,d}	20.4 ± 1.83 ^{14,21,e}	24.3 ± 5.07 ^{d,e}	26.0 ± 5.40 ^{14,21,e,f}
1:1:2	27.3 ± 6.78 ^{13,18,h,k}	42.9 ± 9.15 ^{13,20,b,e,f}	30.5 ± 7.15 ^{20,d,e,f}	23.1 ± 3.07 ^{15,22,e,f,g}	31.1 ± 6.18 ^{15,d,f}	29.2 ± 5.72 ^{e,22,g,h}
1:2:1	20.1 ± 2.98 ^{h,l}	27.2 ± 11.5 ^{e,g,h}	23.5 ± 4.37 ^{e,g}	19.9 ± 2.79 ^{16,23,h,k}	25.1 ± 3.37 ^{16,g}	25.9 ± 5.69 ^{23,g,k,l}
1:2:2	25.8 ± 7.43 ^{f,l,m}	32.9 ± 14.7 ^{f,g}	27.1 ± 7.63 ^g	21.5 ± 3.16 ^{17,24,h,l}	28.3 ± 4.68 ^{17,g}	29.0 ± 5.14 ^{f,24,e,k,m,n,p}
2:1:1	19.9 ± 2.62 ^{14,18,k,n,p,q}	34.9 ± 7.18 ^{14,21,k}	26.7 ± 5.70 ^{18,21,h,k}	20.6 ± 3.19 ^{18,25,f,m}	26.8 ± 5.97 ^{18,h,k}	25.4 ± 3.54 ^{25,m,q}
2:1:2	21.9 ± 3.56 ^{15,19,n,r}	42.9 ± 9.99 ^{15,22,c,h,k,l}	30.9 ± 6.89 ^{19,22,h,l}	22.4 ± 2.98 ^{19,26,k,m,n}	28.8 ± 6.31 ^{19,h,l}	29.4 ± 3.34 ^{26,f,l,q,r,s}
2:2:1	23.2 ± 5.00 ^{p,s}	27.8 ± 5.17 ^{23,d,f,l,m}	18.2 ± 6.02 ^{23,f,k,l,m}	19.0 ± 2.20 ^{27,g,l,n,p}	19.4 ± 10.43 ^{f,k,l,m}	23.6 ± 4.89 ^{27,h,n,r,t}
2:2:2	27.3 ± 5.30 ^{16,g,m,q,r,s}	34.8 ± 4.67 ^{16,24,m}	25.7 ± 6.02 ^{24,m}	21.2 ± 2.92 ^{20,28,p}	28.0 ± 6.86 ^{e,20,m}	26.8 ± 4.18 ^{28,p,s,t}

Обозначения те же, что и в табл. 3.

жительности цикла делящегося бластомера и продолжительностей циклов предшествующих ему бластомеров. Неравенство циклов сестринских бластомеров (рис. 3) является событием, «структурирующим» периоды делений бластомеров в каждом цикле дробления и траектории дробления в целом.

Замена временных параметров траектории дробления последовательностью (порядком) делений бластомеров (опосредующих сроки существования линий бластомеров, см. рис. 3) позволяет выявить вариабельность циклов отдельных бластомеров в составе различных эмбрионов. Распределения, связывающие частоты делений сходных по происхождению бластомеров с последовательностью их деления в третьем и четвертом циклах траекторий дробления, значимо отличаются от соответствующих равновероятных как для 4-клеточных ЕЕ-, ММ-, МЕ- и ЕМ-эмбрионов (χ^2 равны: 20.0, 40.3, 84.0 и 93.1 соответственно; пороговое значение χ^2 ($P < 0.05$) равно 16.9), так и для 8-клеточных ММ-, МЕ- и ЕМ-эмбрионов (χ^2 равны: 79.4, 98.9 и 133.8 соответственно; пороговое значение χ^2 равно 66.3). Распределение для 8-клеточных ЕЕ-эмбрионов не отличается от равновероятного ($\chi^2 = 56.0$, $P > 0.250$), что связано с малочисленностью выборки таких эмбрионов.

У 4-клеточных МЕ-эмбрионов бластомер 1 : 1 делится раньше остальных в 78.9% случаев ($\chi^2 = 31.7$, $P < 0.000$), а бластомер 2 : 2 – в 84.2% ($\chi^2 = 40.6$, $P < 0.000$). Бластомеры 1 : 1 : 1, 2 : 2 : 2 и 1 : 2 : 2 значимо чаще делятся восьмыми, 15-ми и 14-ми (36.8,

42.1 и 36.8%; $\chi^2 = 12.6$, 26.1 и 15.1; $P < 0.050$, < 0.001 и 0.050 соответственно). Бластомеры 1 : 1 и 2 : 2 у 72.4 и 65.5% ЕМ-эмбрионов делятся четвертыми и седьмыми ($\chi^2 = 40.6$ и 34.6, $P < 0.000$); бластомер 1 : 1 : 1 – восьмым и девятым (в 34.5% случаев, $\chi^2 = 36.9$ и 22.0, $P < 0.000$ и < 0.005), бластомеры 1 : 1 : 2 и 2 : 2 : 2 – 14-ми и 15-ми (в 31.0 и 34.5%, $\chi^2 = 35.8$, $P < 0.000$) (см. рис. 4). У ММ-эмбрионов первыми и последними делятся бластомеры 1 : 1 и 2 : 2 (69.2%, $\chi^2 = 16.8$, $P < 0.025$) и бластомеры 2 : 2 : 1 и 2 : 2 : 2 (в 38.5% случаях, $\chi^2 = 15.9$ и 18.4, $P < 0.050$ и < 0.025 соответственно).

Таким образом, на протяжении третьего и четвертого циклов дробления в составе эмбрионов появляются и возрастают в численности бластомеры, у которых, вопреки сходству происхождения, существенно различны последовательности делений (т.е. сроки существования линий бластомеров до моментов их делений). У подавляющего большинства 4-клеточных эмбрионов два бластомера преемственно делятся первыми и последними, в то время как последовательности делений двух других бластомеров переменны. У 8-клеточных эмбрионов вероятность преемственного раннего или позднего делений бластомеров снижается, но увеличивается количество бластомеров, момент деления которых варьирует у разных эмбрионов. Если такая тенденция продолжается в пятом и шестом циклах дробления, то последовательность делений всех бластомеров – 16- и 32-клеточных – станет стохастичной. Поскольку

эмбрионы раньше или позже, но достигли финальной стадии развития (бластоцисты), можно полагать, что обсуждаемый феномен представляет собой одно из проявлений регуляционности бластомеров и зародышей в целом, возрастающей по мере дробления. Возрастание регуляционности, по определению, предполагает расширение спектра потенциальных дифференцировок. Соответственно можно ожидать расширение потенциальных возможностей к дифференцировкам у бластомеров 8-клеточных и, тем более, 16- и 32-клеточных эмбрионов.

Традиционно считается, что ооцит и зигота тотипотенты. Однако по цитологическим критериям ооцит и зигота, наследующая структуру ооцита, представляют собой высокоспециализированные клетки. Помимо характерной морфологии и специфических синтезов, специализация зиготы проявляется в поляризованности, обеспеченной неравномерным распределением в объеме (и по протяженности кортикального слоя) клеточных органелл и комплекса специфических регуляторных макромолекул [18–20 и др.]. Мы предполагаем, что только после элиминации специфических особенностей организации зиготы и освобождения от влияний зиготических детерминантов бластомеры приобретают способность к собственным синтезам и регуляциям, к поляризации и формированию функциональных контактов и, в конечном итоге, к собственным специфическим дифференциациям [21–23]. На молекулярно-генетическом уровне события, освобождающие бластомеры от «диктата зиготы» в период первых делений дробления, исследованы слабо и, вероятнее всего, сопряжены с регуляциями клеточных циклов [24, 25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У плацентарных млекопитающих, в отличие от низших позвоночных, поляризованность («предразметка») зиготы достаточно лабильна, что предопределяет вариабельность временных параметров раннего развития и при несовершенстве или недостаточности этой предразметки – довольно высокий уровень аномалий раннего развития. В результате реализации всех возможных комбинаций меридиональных и экваториальных борозд при дроблении 2-клеточных эмбрионов человека (так же как эмбрионов мышей и, вероятно, иных видов плацентарных млекопитающих) формируются четыре варианта 4-клеточных

эмбрионов. Бластомеры эмбрионов, относящихся к разным вариантам, включают в свой состав существенно разные части зиготы, приобретая таким образом разные «дозы» детерминантов. Сегрегация зиготической цитоплазмы и детерминантов продолжается в следующих делениях дробления. Это, в свою очередь, находит отражение в существенной вариабельности временных параметров (циклов бластомеров, циклов дробления и траектории дробления в целом) в следующих раундах дробления каждого из вариантов 4-клеточных эмбрионов. Вариабельность, связанная со степенью «совершенства» организации зиготы, интерферирует с вариабельностью, приносимой способом ее сегрегации, что проявляется в траекториях дробления. Примером могут служить траектории развития ME- и EM-эмбрионов с существенно разными темпами дробления (первая, вторая и третья группы). По предварительной оценке частоты формирования имплантационно-компетентных бластоцист, восходящих к каждому из вариантов 4-клеточных эмбрионов, различаются. Из этого следует, что вариант формирования 4-клеточных эмбрионов следует учитывать при раннем прогнозе перспективности отдельных зародышей.

Замена временных показателей на порядковые (последовательности делений бластомеров в траектории дробления или, иными словами, опосредованные сроки существования линий бластомеров) позволила обнаружить еще одну форму вариабельности, связанную с особенностями собственно процесса дробления: изменчивость моментов вступления в следующий цикл дробления сходных по происхождению бластомеров в составе разных эмбрионов. Мы предполагаем, что это явление связано с градуальным снижением эффектов детерминантов в результате последовательной элиминации специфической организации зиготы в ее фрагментах (т.е. бластомерах). Достигаемая таким образом дедифференциация бластомеров предшествует и, возможно, разрешает осуществление их собственной экспрессии, регуляции и, в конечном итоге, собственных дифференцировок. В большей или меньшей мере успешная дедифференциация бластомеров предопределяет большее или меньшее временное смещение событий асимметричных делений и компактизации, что, возможно, сказывается на соотношениях внутренней клеточной массы и муральной трофэктодермы в бластоцистах. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Human preimplantation embryo selection. Reproductive medicine and assisted reproductive techniques / Eds K. Elder, J. Cohen. Informa Healthcare, 2007. 379 p.
2. van den Bergh M., Ebner T., Elder K. Atlas of oocytes, zygotes

- and embryos in reproductive medicine. N.Y.: Cambridge University Press, 2012. 237 p.
3. Pribenszky C., Losonczy E., Molnar M., Lang Z., Matyas S., Rajczy K., Molnar K., Kovacs P., Nagy P., Conceicao J., et al. // Reprod. BioMed. Online. 2010. V. 20. P. 371–379.

4. Kirkegaard K., Agerholm I.E., Ingerslev H.J. // *Hum. Reprod.* 2012. V. 27. № 5. P. 1277–1285.
5. Herrero J., Meseguer M. // *Fertil. Steril.* 2013. V. 99. P. 1030–1034.
6. Gulyas B.J. // *J. Exp. Zool.* 1975. V. 193. P. 235–248.
7. Graham C.F., Deussen Z.A. // *J. Embryol. Exp. Morph.* 1978. V. 48. P. 53–72.
8. Gardner R.L. // *Development.* 1997. V. 124. P. 289–301.
9. Cooke S., Tyler J.P.P., Driscoll G.L. // *Hum. Reprod.* 2003. V. 18. P. 2397–2405.
10. Edwards R.G., Hansis C. // *Reprod. BioMed. Online.* 2005. V. 11. № 2. P. 206–218.
11. Gardner R.L. // *Hum. Reprod.* 2002. V. 17. № 12. P. 3178–3189.
12. Piotrowska-Nitsche K., Zernicka-Goetz M. // *Mech. Dev.* 2005. V. 122. P. 487–500.
13. Edwards R.G. // *Reprod. BioMed. Online.* 2003. V. 6. № 1. P. 97–113.
14. Edwards R.G., Beard H.K. // *Mol. Hum. Reprod.* 1997. V. 3. № 10. P. 863–905.
15. Zernicka-Goetz M., Morris S.A., Bruce A.W. // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. P. 467–477.
16. Gardner D.K., Schoolcraft W.B. // *Towards reproductive certainty: Fertility and genetics beyond 1999* / Eds R. Jansen, D. Mortimer. Carnforth: Parthenon Publ., 1999. P. 378–388.
17. Gardner D.K., Stevens J., Sheehan C.B., Schoolcraft W.B. // *Human preimplantation embryo selection: Reproductive medicine & assisted reproductive techniques series* / Eds K. Elder, J. Cohen. Informa Healthcare, Informa UK Ltd., 2007. P. 79–87.
18. Goodall H., Johnson M.H. // *J. Embryol. Exp. Morph.* 1984. V. 79. P. 53–76.
19. Bischoff M., Parfitt D.-E., Zernicka-Goetz M. // *Development.* 2008. V. 135. P. 953–962.
20. Kloc M., Ghobrial R.M., Borsuk E., Kubiak J.Z. // *Mouse development – from oocyte to stem cells* / Ed. J.Z. Kubiak. Berlin, Haidelberg: Springer-Verlag, 2012. P. 23–44.
21. Marikawa Y., Alarcón V.B. // *Mol. Reprod. Dev.* 2009. V. 76. № 11. P. 1019–1032.
22. Zhang P., Zucchelli M., Bruce S., Hambiliki F., Stavreus-Evers A., Levkov L., Skottman H., Kerkelä E., Kere J., Hovatta O. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 11. e7844.
23. Cockburn K., Rossant J. // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. № 4. P. 995–1003.
24. Kiessling A.A., Bletsa R., Desmarais B., Mara C., Kallianidis K., Loutradis D. // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010. V. 27. № 6. P. 265–276.
25. Duronio R.J. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 746–750.