



УДК 611.013+575

Доімплантаційний розвиток ембріонів жінок старшого репродуктивного віку

О.В. Чапля^{1,2}, Ю.В. Гонтар², Н.М. Білько¹

¹Центр молекулярних та клітинних досліджень

Національного університету «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна

²ТОВ «Інститут генетики репродукції», Київ, Україна

Досліджували морфокінетичні характеристики еуплоїдних і хромосомно незбалансованих ембріонів, отриманих у випадку запліднення *in vitro* ооцитів 58 молодих жінок і 28 пацієток старшого репродуктивного віку. Частка ембріонів із нормальним хромосомним набором із віком жінки зменшувалася до 39,9% у групі ембріонів молодих пацієток і 25,2% у когорті зразків жінок старшого репродуктивного віку. За результатами оцінки темпів розвитку нормальних та аберантних ембріонів встановлено, що еуплоїдні ембріони розвивалися швидше, а в разі пролонгованого культивування формують бластоцисти у півтора раза частіше. Однак суттєвих відмінностей за морфокінетичними характеристиками зразків з аналогічними хромосомними наборами між досліджуваними віковими групами не виявлено. Зростання відносної кількості хромосомно незбалансованих ембріонів на фоні сталої дії природного добору на доімплантаційному етапі розвитку може бути однією з передумов підвищення вірогідності народження дитини з генетичними аномаліями у жінок старшого репродуктивного віку.

Ключові слова: доімплантаційний розвиток; хромосомна аномалія; ембріон; старший репродуктивний вік

Preimplantation development of embryos in women of advanced maternal age

O.V. Chaplia^{1,2}, J.V. Gontar², N.M. Bilko¹

¹Centre of Molecular and Cell Research, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

²Reproductive Genetics Institute, Kyiv, Ukraine

In order to reveal the influence of genetic component on the early embryo development, the retrospective study of morphokinetic characteristics of 717 embryos subjected to preimplantation genetic testing was conducted. Blastomere biopsy for FISH-based preimplantation genetic screening of 7 chromosomes was performed on the third day of culture, while embryo developmental potential and morphological features at the cleavage and blastulation stage were studied regarding maternal age particularly in the group of younger women and patients older than 36. Results of genetic testing revealed that euploid embryos rate gradually decreased with maternal age comprising 39.9% in young women group and 25.3% of specimen belonging to elder patients. At the cleavage stage, morphological characteristics of aneuploid and euploid embryos didn't differ significantly regardless of the age of patients that could be accounted for the transcriptional silence of embryo genome till the third day of its development. However, in case of prolonged culture chromosomally balanced embryos rarely faced developmental arrest (in 7.9%) and formed blastocysts half more frequently compared to aberrant embryos (respectively 75.6 versus 49.8%). Nevertheless, no substantial difference was found between blastocyst formation rate among embryos with similar genetic component regardless of the maternal age. Taking into consideration high rate of chromosomally unbalanced embryos specific to patients of advanced maternal age, the relative proportion of aneuploid blastocysts was significantly higher in this group of embryos. Thus, without genetic screening there is a possibility of inaccurate selection of embryos for women of advanced reproductive age for transfer procedure even in case of prolonged culture. Consequently, increase of aneuploid embryos frequency associated with permanent preimplantation natural selection effectiveness along with the postimplantation natural selection failure may be the cause of elevated risk of chromosomally abnormal child birth for advanced age women after natural conception, as well as after assisted reproduction therapy.

Keywords: preimplantation development; chromosome abnormality; embryo; advanced maternal age

Вступ

Численні дослідження доімплантаційного розвитку тварин дозволили встановити ключові етапи раннього онтогенезу ссавців, однак видоспецифічні особливості перебігу даних процесів суттєво обмежують екстраполяцію отриманих даних на ранній онтогенез людини (Niakan, 2012). Розробка методики запліднення *in vitro* та її наступне широке застосування в клінічній практиці з метою подолання безпліддя дали можливість спостерігати за найбільш ранніми етапами доімплантаційного ембріогенезу людини. Сингамія материнського та батьківського проядер у процесі запліднення супроводжується їх генетичним і епігенетичним репрограмуванням до ембріонального стану, після чого відбувається серія клітинних поділів із формуванням однакових за розміром бластомерів. Паузи між окремими мітозами дуже короткі, кількість клітин швидко зростає без збільшення їх розмірів, а відтак перші три доби розвитку ембріона називають дробленням (Niakan, 2012; Sudheer, 2007). На даній стадії ембріон перебуває у стані транскрипційного спокою, адже активація новосформованого геному відбувається лише на третій день розвитку, на стадії 4–8 клітин (Taylor, 1997; Tesarik, 2004). Відтак, раннє дробіння ембріона людини цілковито залежить від запасів ооцита, і від початку синтезу білків новоствореного організму здійснюється на матриці материнських мРНК, присутніх у цитоплазмі яйцеклітини (Sudheer, 2007).

Успішна активація ембріонального геному – обов'язкова передумова процесу компактизації, при якому клітини ембріона тісно взаємодіють завдяки формуванню численних щільних контактів. У результаті контури окремих бластомерів поступово зникають, а ембріон переходить до стадії морули (Prados, 2012). На наступному етапі (112–144 год розвитку) всередині скупчення клітин формується заповнена рідиною порожнина – бластоцель, яка позначає перехід до первинного клітинного диференціювання ембріона. У процесі бластуляції частина клітин ембріона утворює внутрішньоклітинну масу (ВКМ), яка у майбутньому сформує власне плід, тоді як інші клітини, що сплющуються та огортають бластоцель, відносять до трофектодерми – предтечі екстраембріональних тканин (Wennekamp, 2013). Перехід до наступних етапів розвитку ембріона відбувається у чітко визначені часові інтервали й, у разі молекулярних чи клітинних аномалій, перехід до наступної стадії розвитку ембріона блокується. Імплантація ембріона людини відбувається на сьому добу і лише за умови вилуплення бластоцисти з оболонки запліднення (Macklon, 2002). При цьому ВКМ поділяється на ранні епібласт і ендодерму, однак спостерігати за даними процесами *in vitro* уже неможливо.

Описаний перебіг подій у ранньому, доімплантаційному ембріогенезі людини сталий і в нормі не зазнає впливу індивідуальних батьківських факторів (Munne, 2007). Тобто послідовність ключових етапів раннього ембріогенезу людини не залежить від віку батьків і є однаковою для ембріонів, отриманих у разі запліднення ооцитів пацієнок молодшого та старшого репродуктивного віку. У той же час вірогідність настання вагітності у жінок, старших 36 років, суттєво знижена у зв'язку з

поступовим зменшенням оваріального резерву та порушенням рецептивності ендометрію матки (Liu, 2012). Окрім того, віковозалежне виснаження яєчникового пулу може стати причиною підвищеної частоти формування анеуплоїдних ооцитів та, як наслідок, ембріонів із кількісними хромосомними аномаліями у жінок старшого репродуктивного віку (Munne, 2005; Christopikou, 2013). Деякі вчені (Niakan, 2012) припускають, що з віком також порушуються процеси міжклітинних взаємодій і контролю мітотичного поділу, що може спричинити аномалії раннього ембріогенезу та послаблення негативної селекції аномальних ембріонів на доімплантаційних етапах розвитку. Таким чином, вивчення морфокінетичних характеристик ранніх ембріонів жінок, старших 36 років, дозволило б оцінити ефективність реалізації програми їх доімплантаційного розвитку, його залежність від хромосомного набору ембріонів і встановити передумови високого ризику народження дітей із хромосомними патологіями зростанням віку материнства.

Мета даної роботи – встановити частоти формування та особливості доімплантаційного розвитку хромосомно незбалансованих ембріонів, отриманих у разі запліднення ооцитів жінок старшого репродуктивного віку.

Матеріал і методи досліджень

У межах проведеного дослідження аналізували морфокінетичні та генетичні характеристики ембріонів, отриманих із липня 2010 по грудень 2012 року на базі клініки «Інститут генетики репродукції» (м. Київ) за умов застосування методу запліднення *in vitro* для лікування безпліддя. Протягом указанного періоду доімплантаційний генетичний скринінг хромосомних аномалій проведений для 717 ембріонів із 84 лікувальних циклів. Ембріони поділено на дві групи відповідно до віку обстежених пацієнок. Порівняльну вибірку склали 558 зразків, отриманих у межах 58 процедур запліднення *in vitro* ооцитів молодих жінок, середній вік яких складав $29,8 \pm 2,3$ року (варіювання в межах 26–35 років). До основної групи дослідження віднесли 159 ембріонів жінок старшого репродуктивного віку (> 36 років). Середній вік пацієнок в основній групі, що включала 28 лікувальних циклів, становив $39,26 \pm 2,5$ року та перебував у діапазоні 37–46 років. Усі обстежені пацієнтки мали задовільний стан соматичного здоров'я та нормальний каріотип і для отримання більшої кількості ооцитів проходили гормональну стимуляцію суперовуляції.

Запліднення зрілих ооцитів, отриманих при пункції оваріальних фолікулів, здійснювали методом інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда. Успішність проведеної процедури запліднення оцінювали через 16–18 год за формуванням другого полярного тільця у первітєльному просторі та наявністю двох пронуклеусів у цитоплазмі зиготи. Ембріони культивували у маркованих краплях живильного середовища (MediCult, Данія) протягом 120–144 год за 37°C та насичення повітря вуглекислим газом на рівні 6,0%.

На стадії дробіння, коли всі клітини ембріона є тотипотентними, а відтак здатні компенсувати втрачений матеріал (De Vos, 2009), один із бластомерів вилучали для проведення генетичного аналізу. Отримані клітини

обробляли гіпотонічним розчином (0,3% бичачий альбумін, 1% цитрат натрію), і після руйнування оболонки бластомера фіксували його ядро на скельці за допомогою суміші етанолу та оцтової кислоти у співвідношенні 3:1 (Velilla, 2002). Діагностику хромосомних аномалій ембріонів здійснювали методом флюоресцентної *in situ* гібридизації. Зразки денатурували за 69 °C та інкубували щонайменше 4 год у вологій камері за температури 37 °C. Постгібридаційна обробка передбачала промивання в 0,7 x SSC/0,4% NP-40 при 73 °C та 2 x SSC/0,1% NP-40 за кімнатної температури. Протокол дослідження включав два послідовні цикли гібридизації з використанням набору багатоколірних проб до аутосом 13, 16, 18, 21, 22 (PB Multivision, Vysis, США) та суміші центромерних зондів до статевих хромосом X та Y (CEPX/CEPY, Vysis, США) (Munne, 1998). Оцінку сигналів проводили мікроскопіюванням у флюоресцентному світлі з використанням комп'ютерного забезпечення ISIS (MetaSystems, Німеччина) згідно з вимогами Європейської асоціації репродукції людини (Thornhill, 2005). Якщо чітко встановити кількість сигналів, що відповідали певній хромосомі, було неможливо, проводили додатковий третій раунд гібридизації з використанням проб до альтернативних локусів досліджуваних хромосом.

Контроль розвитку ембріонів проводили за збільшення x400 з періодичністю 24 год, починаючи з моменту оцінки успішності запліднення. Протягом перших трьох днів культивування оцінювали темпи їх поділу та відмічали наявність аномалій будови (Bączkowski, 2004; Fragouli, 2014). На четвертий день культивування відмічали ознаки компактизації клітин ембріона: завдяки утворенню численних щільних контактів, чіткість контурів окремих бластомерів втрачалася, що візуально нагадувало злиття клітин. Дане явище досягало максимуму на стадії морули, коли вирізнити окремі клітини ембріона було вже неможливо (Тао, 2004).

На стадії первинної клітинної диференціації, через 120–144 год культивування, імплантаційний потенціал ембріона оцінювали за класифікацією Gardner (табл. 1). Згідно з установленими морфологічними характеристиками зразка його відносили до відповідного класу якості. На п'ятий день культивування не більше ніж три еуплоїдні ембріони з найвищим морфологічними показниками переносили до порожнини матки реципієнтки за допомогою спеціального катетера. За умов значної кількості зразків, визнаних нормальними за результатами проведеної діагностики, їх решту кріоконсервували та зберігали у рідкому азоті до моменту наступного ембріотрансферу.

Таблиця 1

Морфологічна класифікація ембріонів людини на стадії бластоцисти (Gardner, 1999)

Параметри оцінки бластоцисти	Клас якості	Опис будови бластоцисти відповідного класу якості
Етап розвитку бластоцисти	1	Бластоцель кавітованого ембріона за розмірами не перевищує половини його об'єму
	2	Бластоцель займає більше половини об'єму ембріона
	3	Бластоцель остаточно заповнює зародок і починає його розтягувати
	4	Експандована бластоциста, що має великі розміри та тонку, розтягнену блискучу оболонку
	5	Бластоциста, що розпочала вихід із блискучої оболонки
	6	Ембріон залишив блискучу оболонку
Морфологія внутрішньоклітинної маси	A	Багато щільно упакованих клітин, чітка форма ембріобласта
	B	Невелика кількість безсистемно згрупованих клітин
	C	Дуже мало клітин
Будова трофектодерми	A	Багато щільно прилеглих одна до одної клітин
	B	Невелика кількість клітин із порушенням щільної організації
	C	Дуже мало клітин великого розміру, між ними можуть виникати проміжки

Достовірність виявлених відмінностей між двома проаналізованими групами ембріонів підтверджували порівнянням вибірових долей за критерієм Фішера (для якісних ознак) та оцінкою розходжень центральних тенденцій двох вибірок за критерієм Манна – Уїтні (для кількісних ознак) за умов $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

За результатами проведеного генетичного скринінгу по дві копії усіх досліджуваних хромосом несли лише 33,1% обстежених ембріонів. При цьому частка еуплоїдних зразків у порівняльній групі становила 39,9%, тоді як серед ембріонів жінок старшої вікової групи хромосомно збалансованими були визнані лише 25,2 % (різниця є статистично достовірною, $P < 0,05$). Отримані дані узгоджуються з висновками інших дослідників: за даними Munne (2007), частка нормальних ембріонів, отриманих у жінок віком < 38 років, становить 38,5%, а

для пацієнток, старших 38 років, цей показник не перевищує 24%. У когорті ембріонів молодих жінок на кожну процедуру запліднення *in vitro* припадало в середньому 3,4 \pm 2,8 еуплоїдних ембріона. В основній групі дослідження середня кількість хромосомно збалансованих зразків, виявлених в окремому лікувальному циклі, становила лише 1,61 \pm 1,30, що достовірно нижче показників порівняльної групи ($P < 0,05$).

Хромосомний скринінг ембріонів, отриманих у випадку застосування допоміжних репродуктивних технологій у жінок різних вікових категорій, виявив тенденцію до зниження відносної кількості хромосомно збалансованих зразків за зростання репродуктивного віку пацієнток. Вірогідність виявлення еуплоїдного ембріона в окремому циклі лікування для жінок, старших 36 років, у 2,5 раза нижча за показники порівняльної групи. В основній групі майже удвічі зростає частка лікувальних циклів, у яких під час проведення генетичної діагностики не виявлено ембріонів, придатних для перенесення до порожнини матки. Для жінок старшого репродук-

тивного віку 15,3% процедур завершилися відміною ембріотрансферу у зв'язку з патологічним хромосомним набором усіх обстежених ембріонів, тоді як у групі порівняння еуплоїдні зразки не виявлено тільки в 6,8% випадків. Проводячи доімплантаційний генетичний скринінг під час лікування безпліддя у жінок, старших 36 років, урахували також ризик відміни ембріотрансферу у зв'язку з відсутністю серед проаналізованої когорти еуплоїдних ембріонів.

Оцінку морфологічних характеристик ембріонів, у тому числі встановлення темпів їх дробіння, розглядають як прогностичний параметр для виокремлення зразків із найвищим імплантаційним потенціалом (Magli, 2007; Mastenbroek, 2011). Аналіз морфологічних характеристик ембріонів показав, що, всупереч очікуванням, зразки з порівняльної та основної груп дослідження на стадії дробіння розвивалися з однаковою швидкістю (табл. 2). На 40–42-гу годину культивування середня кількість клітин в аномальних і еуплоїдних ембріонів обох груп статистично не відрізнялася та становила в середньому $3,7 \pm 1,0$ бластомера. На третю добу розвитку аномальні ембріони порівняльної та основної груп містили $7,1 \pm 1,8$ та $7,2 \pm 1,3$ клітин відповідно, тоді як хромосомно збалансовані ембріони молодих і старших пацієнток склалися з $7,3 \pm 1,5$ та $7,3 \pm 1,2$ бластомера. Частка ембріонів, що на другу та третю добу культиву-

вання містили оптимальну кількість клітин, не відрізнялася між когортами жінок різних вікових категорій. Через 64–66 годин після запліднення частка анеуплоїдних ембріонів, що склалися із 7 чи 8 бластомерів, була достовірно нижчою у порівняльній групі. Можливо, це спричинено дією природного добору проти хромосомно незбалансованих ембріонів, тиск якого лише посилюватиметься протягом наступних днів культивування.

Аномалії будови (присутність без'ядерних фрагментів, неспіврозмірність клітин, багатоядерність і вакуолізацію) розглядають як негативний прогностичний фактор [12], адже вони можуть бути спричинені порушеннями функціонування генетичного апарату чи окремих органел бластомерів. Частка ембріонів із морфологічними відхиленнями на другу добу розвитку була співставною у порівняльній і основній групах і не залежала від хромосомного компонента ембріона (див. табл. 2). Через 64–66 годин культивування аномалії будови виявляли достовірно частіше серед анеуплоїдних ембріонів, причому дана тенденція спостерігалася в обох групах. Вірогідно, активація ембріонального геному, що проходить на третю добу розвитку, могла виступати передумовою накопичення зразків із помітними недоліками будови серед хромосомно незбалансованих ембріонів жінок старшої та молодшої вікових груп.

Таблиця 2

Темпи дробіння та особливості будови еуплоїдних і аномальних ембріонів жінок різних вікових груп

Частка ембріонів, які відповідають наведеним характеристикам	Основна група дослідження		Порівняльна група дослідження	
	ембріони з аномаліями хромосомного набору, %	еуплоїдні зразки, %	ембріони з аномаліями хромосомного набору, %	еуплоїдні зразки, %
Друга доба розвитку (40–42-га година культивування)				
Оптимальний темп дробіння (4 бластомери)	62,0	63,2	51,83	62,6
Прискорений розвиток (> 5 клітин)	8,3	10,5	13,8	9,9
Аномалії будови	12,4	10,5	19,2	16,3
Третя доба розвитку (64–66-та година культивування)				
Оптимальний темп дробіння (7–8 бластомерів)	60,3	55,3	48,2	62,6
Прискорений розвиток (> 8 клітин)	11,6	13,2	14,1	9,9
Аномалії будови	46,3	29,0	53,5	16,3

На п'яту добу розвитку до зразків високої якості відносять ті ембріони, що змогли успішно пройти первинну диференціацію та сформувати бластоцисту (Gardner, 1999; Wączkowski, 2004), при цьому перевага віддається експандованим бластоцистам, які вже почали процес вилуплення з оболонки запліднення, а відтак готові імплантуватися у порожнині матки. Аналіз результатів пролонгованого культивування ембріонів показав, що близько 36,0% зразків з аномаліями хромосомного набору зупиняються у розвитку на стадії первинної диференціації, тоді як блокування росту нормальних зразків спостерігається лише у 7,9% випадків. Тенденція до припинення розвитку анеуплоїдних зразків на стадії бластуляції з одночасним збільшенням питомої ваги хромосомно збалансованих ембріонів серед сформованих бластоцист спостерігалася у порівняльній та основній групах дослідження. При цьому частота успішної бластуляції еуплоїдних ембріонів перевищувала відповідні показники

аномальних зразків приблизно у півтора раза: 72,9 та 78,4% серед ембріонів молодих і старших пацієнток, тоді як серед анеуплоїдних ембріонів первинну клітинну диференціацію успішно пройшли 49,2 та 50,4% відповідно. Таким чином, розвиток ембріонів жінок старшого репродуктивного віку проходив за правилами, яким підкорялися й ембріони молодших пацієнток, причому механізми негативної селекції анеуплоїдних ембріонів працювали в основній групі так само ефективно, як і в порівняльній когорті. Власне на стадії первинної диференціації єдиною відмінністю ембріонів жінок старшої вікової групи було уповільнення темпів виходу еуплоїдних ембріонів з оболонки запліднення (рис.). Ефективність вилуплення експандованих бластоцист жінок старшого репродуктивного віку була співрозмірною з показниками хромосомно незбалансованих зразків і становила лише 13,5%, тоді як нормальні ембріони молодих жінок на п'яту добу залишали оболонку достовірно частіше (33,3%).

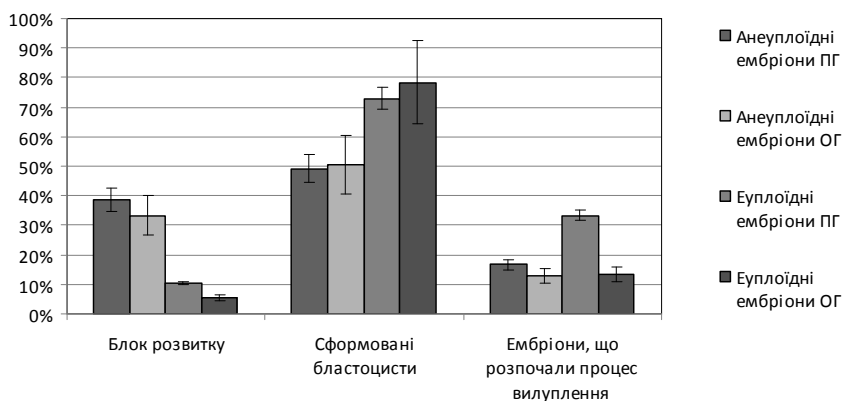


Рис. Морфокінетичні особливості хромосомно збалансованих і аномальних ембріонів жінок порівняльної (ПГ) та основної групи (ОГ) дослідження на 112–114-ту годину культивування

Стабільна ефективність дії природного добору на фоні високої частоти анеуплоїдних ембріонів у жінок старшого репродуктивного віку викликала накопичення бластоцист з аномаліями хромосомного набору у групі дослідження. У порівняльній групі хромосомно незбалансованими були лише 33,0% бластоцист, тоді як у старших пацієнок аномалії хромосомного набору несли 46,5% ембріонів, що пройшли первинну диференціацію ($P < 0,05$). Таким чином, вірогідність імплантації у порожнину матки аномального ембріона була вищою у пацієнок старшого репродуктивного віку, а з урахуванням віковозалежного зниження ефективності постімплантаційної елімінації анеуплоїдних зразків власне й формувався високий ризик настання та збереження патологічної вагітності.

Висновки

Перебіг подій доімплантаційного розвитку ембріонів жінок старшого репродуктивного віку суттєво не відрізняється від показників молодих жінок, а відтак навряд чи виступає однією з основних причин опосередкованого віковим фактором зниження фертильності. На фоні виснаження оваріального резерву виявлене підвищення частоти формування хромосомно незбалансованих ембріонів старших жінок може значно знижувати вірогідність настання вагітності природним шляхом, навіть за умови застосування допоміжних репродуктивних технологій. Зростання кількості анеуплоїдних ембріонів за умови збереження сталої ефективності елімінації аномальних зразків на доімплантаційному етапі ембріогенезу може бути однією з передумов підвищення вірогідності народження дитини з хромосомними аберациями у жінок старшого репродуктивного віку.

Бібліографічні посилання

Bączkowski, T., Kurzawa, R., Głabowski, W., 2004. Methods of embryo scoring in *in vitro* fertilization. *Reprod. Biol.* 4(1), 5–22.
 Christopikou, D., Tsorva, E., Economou, K., Shelley, P., Davies, S., Mastrominas, M., Handyside, A.H., 2013. Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age. *Hum. Reprod.* 28(5), 1426–1434.

De Vos, A., Staessen, C., De Rycke, M., Verpoest, W., Haentjens, P., Devroey, P., Liebaers, I., Van de Velde, H., 2009. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: A prospective cohort of single embryo transfers. *Hum. Reprod.* 24, 2988–2996.
 Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., Wells, D., 2014. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol. Hum. Reprod.* 20(2), 117–126.
 Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., 1999. *In vitro* culture of human blastocysts. Toward reproductive certainty: Fertility and genetics beyond. Jansen, R., Mortimer, D. (eds.). Parthenon Publishing, Carnforth, UK.
 Liu, J., Wang, W., Sun, X., Liu, L., Jin, H., Li, M., Witz, C., Williams, D., Griffith, J., Skorupski, J., Haddad, G., Gill, J., 2012. DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploid and mosaic. *Biol. Reprod.* 87(6), 148.
 Macklon, N., Geraedts, J., Fauser, B., 2002. Conception to ongoing pregnancy: The ‘black box’ of early pregnancy loss. *Hum. Reprod. Update.* 8, 333–343.
 Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Ruberti, A., Farfalli, V., 2007. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil. Steril.* 87(3), 534–541.
 Mastenbroek, S., van der Veen, F., Aflatoonian, A., Shapiro, B., Bossuyt, P., Repping, S. Embryo selection in IVF. *Hum. Reprod.* 26(5), 964–966.
 Munne, S., Chen, S., Colls, P., Garrisi, J., Zheng, X., Cekleniak, N., Lenzi, M., Hughes, P., Fischer, J., Garrisi, M., Tomkin, G., Cohen, J., 2007. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod. Biomed. Online* 14(5), 628–634.
 Munné, S., Chen, S., Fischer, J., Colls, P., Zheng, X., Stevens, J., Escudero, T., Oter, M., Schoolcraft, B., Simpson, J.L., Cohen, J., 2005. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil. Steril.* 84, 331–335.
 Munné, S., Márquez, C., Magli, C., Morton, P., Morrison, L., 1998. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes XY, 13, 16, 18 and 21. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 863–870.
 Niakan, K.K., Han, J., Pedersen, R.A., Simon, C., Pera, R.A., 2012. Human pre-implantation embryo development. *Development.* 139(5), 829–841.
 Prados, F.J., Debrock, S., Lemmen, J.G., Agerholm, I., 2012. The cleavage stage embryo. *Hum. Reprod.* 27(Suppl 1), i50–71.
 Sudheer, S., Adjaye, J., 2007. Functional genomics of human pre-implantation development. *Funct. Genomic Proteomic.* 6(2), 120–132.

- Tao, J., Craig, R.H., Johnson, M., Williams, B., Lewis, W., White, J., Buehler, N., 2004. Cryopreservation of human embryos at the morula stage and outcomes after transfer. *Fertil. Steril.* 82(1), 108–118.
- Taylor, D.M., Ray, P.F., Ao, A., Winston, R.M., Handyside, A.H., 1997. Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three-to-four-cell stage. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 442–448.
- Tesarik, J., Greco, E., Mendoza, C., 2004. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum. Reprod.* 19(3), 611–615.
- Thornhill, A.R., de Die-Smulders, C.E., Geraedts, J.P., Harper, J.C., Harton, G.L., Lavery, S.A., Moutou, C., Robinson, M.D., Schmutzler, A.G., Scriven, P.N., Sermon, K.D., Wilton, L., 2005. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum. Reprod.* 20(1), 35–48.
- Velilla, E., Escudero, T., Munné, S., 2002. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod. Biomed. Online* 4(3), 210–217.
- Wennekamp, S., Mesecke, S., Nédélec, F., Hiiragi, T., 2013. A self-organization framework for symmetry breaking in the mammalian embryo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14(7), 452–459.

Надійшла до редколегії 02.04.2014