

УДК 618.2/4:615.361.013.014.41:616-089.843

UDC 618.2/4:615.361.013.014.41:616-089.843

**Возникновение многоядерных бластомеров эмбрионов человека
после криоконсервирования**

М.П. ПЕТРУШКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков***Appearance of Multi-Nucleated Blastomeres of Human Embryos
Following Cryopreservation**

PETRUSHKO M.P.

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

Обнаружено увеличение частоты возникновения многоядерных бластомеров в эмбрионах человека после криоконсервирования с 2,1 до 8,2%. Показано, что количество ядер в бластомерах четко коррелирует с их плоидностью. Возможным механизмом полиплоидизации бластомеров является слияние клеточных мембран с образованием двухъядерных бластомеров, либо кариокинез при отсутствии цитокинеза.

Ключевые слова: бластомеры, эмбрионы, криоконсервирование, хромосомы.

Виявлено збільшення частоти виникнення багатоядерних бластомерів в ембріонах людини після криоконсервування з 2,1 до 8,2%. Показано, що кількість ядер у бластомерах чітко корелює з їх плоїдністю. Можливим механізмом поліплоїдизації бластомерів є злиття клітинних мембран з утворенням двох'ядерних бластомерів, або кариокінез при відсутності цитокінезу.

Ключові слова: бластомери, ембріони, криоконсервування, хромосоми.

The frequency of multinucleated blastomere appearance in human embryos after cryopreservation from 2.1 to 8.2 % was shown to increase. There was demonstrated, that the nuclei rate in blastomeres correlated with its ploidy rate. Fusion of cell membranes or karyokinesis without cytokinesis is the possible mechanism of blastomere poliploidy .

Key words: blastomeres, embryos, cryopreservation, chromosomes.

Криоконсервирование эмбрионов человека является перспективным направлением во вспомогательных репродуктивных технологиях. После замораживания-оттаивания производится тщательная оценка морфологии эмбрионов: форма, размеры, количество, расположение, темпы дробления бластомеров, прозрачность, степень фрагментации цитоплазмы [5].

Несмотря на достаточно высокую выживаемость деконсервированных эмбрионов (17-80%) [18], частота их имплантации составляет 10-12% [8]. Свой вклад в статистику преимплантационных летальностей вносят хромосомные аномалии, которые по данным многих исследователей наблюдаются в 80% эмбрионов [6, 11]. Большую часть из них составляют полиплоидии.

В нормально развивающемся эмбрионе, находящемся на стадии 2-4-х бластомеров, четко визуализируются ядра (рис. 1). Отмечено возникновение многоядерных бластомеров в эмбрионах человека после их замораживания-оттаивания.

Human embryo cryopreservation is known to be a perspective trend in assistant reproductive techniques. Freeze-thawing is followed by a thorough estimation of embryo morphology: shape, sizes, number, location, cleavage rates of blastomeres, transparency rate, cytoplasm fragmentation rate [5].

Despite quite a high viability among frozen-thawed embryos (17-80%) [18], the rate of their implantation makes 10-12% [8]. Chromosome abnormalities, observed according to the data of a number of scientists in 80% of embryos make impact into pre-implantation lethality statistics [6, 11]. Polyploidy is known to be a major part among them.

In an embryo of normal development at the stage of 2-4 blastomeres, the nuclei are clearly visualized (Fig. 1). There was noted the appearance of multi-nucleated blastomeres in human embryos following their freeze-thawing.

Studying the morphological characteristics of frozen-thawed embryos and rate of multinucleated blastomeres appearance was the aim of the work.

Адрес для корреспонденции: Петрушко М.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-11-19, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Petrushko M.P., Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7721119, fax: +38 (057) 77200084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua.

Цель исследования – изучение морфологических характеристик деконсервированных эмбрионов и частоты возникновения многоядерных бластомеров в эмбрионах человека после криоконсервирования.

Материалы и методы

В работе использовали эмбрионы человека, которые не были перенесены пациенткам в программах лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и были добровольно пожертвованы для научных исследований.

Индукцию суперовуляции, аспирацию ооцитов, подготовку спермиев к оплодотворению и культивирование гамет и эмбрионов проводили по стандартной технологии программы ЭКО [2].

Эмбрионы были разделены на две группы: в первой – эмбрионы, оставшиеся после эмбриопереноса, культивировали до стадии бластоцисты. Вторую группу эмбрионов, находящихся на стадии 2-8 бластомеров, подвергали замораживанию-оттаиванию, после чего их культивировали *in vitro*.

Каждые 24 ч культивирования отмечали морфологические особенности нативных и деконсервированных эмбрионов. К первой категории качества относили эмбрионы с количеством бластомеров, соответствующим срокам развития, которые характеризовались отсутствием фрагментации и упорядоченным расположением четких, ровных бластомеров; ко второй – эмбрионы с фрагментацией не более 25% и небольшой зернистостью цитоплазмы.

Замораживание-оттаивание проводили по Lassalle с модификацией [10]. В качестве криопротекторов использовали 1,5 М 1,2-пропандиол и сахарозу.

Эмбрионы охлаждали со скоростью 2°C/мин от 22 до 5,5°C. После “сидинга” охлаждение вели со скоростью 0,3°C/мин до -35°C. Затем пайеты погружали в жидкий азот.

Оттаивание эмбрионов производили быстро инкубированием соломинок при комнатной температуре в течение 30 с. После высвобождения эмбрионов из пайеты их переносили в среды с убывающей концентрацией растворов криопротекторов.

Оценку морфологии деконсервированных эмбрионов производили при помощи микроскопирования (×400). Цитогенетические препараты готовили по методу Тарковского [15]. FISH-анализ проводили по Е. Coonen [4].

Результаты и обсуждение

Были проанализированы нативные и деконсервированные эмбрионы после 24 часов культиви-



Рис.1. Эмбрион человека на стадии 2-х бластомеров. Бластомеры одноядерные (×400).

Fig. 1. Human embryo at the stage of 2 blastomeres. Uninuclear blastomeres (×400).

Materials and methods

Human embryos, which had not been transferred to the patients during infertility treatment programs using the method of *in vitro* fertilization (IVF) and donated for the research were used in the work.

Superovulation induction, oocytes aspiration, spermatozoa preparing to gametes and embryos fertilization and culturing were accomplished according to the standard IVF program technique [2].

Embryos were divided into two groups: the first one comprised the embryos left after embryo transfer, cultured up to the stage of blastocyst. The second group of embryos at the stage of 2-8 blastomeres underwent freeze-thawing followed by *in vitro* culturing.

Every 24 hours of culturing we noted morphological characteristics of native and frozen-thawed embryos with the number of blastomeres corresponding to the development terms characterized by the absence of fragmentation and an ordered location of distinct, smooth blastomeres; the second group comprised the embryos with the fragmentation not less than 25% and a slight cytoplasm granularity.

Freeze-thawing was performed according to Lasalle with a modification [10]. As cryoprotectants there were used 1.5M 1,2-propane diol and sucrose.

Embryos were cooled with the rate of 2°C/min from 22 down to 5.5°C. After “seeding” the cooling was performed with the rate of 0.3°C/min down to -35°C. Straws were immersed into liquid nitrogen afterwards.

Embryos were thawed by quickly incubating the straws at room temperature for 30 s. After the embryos removal out of straws they were transferred into the media with slowly decreasing concentrations of cryoprotectants solutions.

рования: 143 эмбриона первой группы и 146 второй. Среднее количество blastomeres эмбрионов первой группы – $3,7 \pm 0,07$. Первой категории качества 128 (89,5%) эмбрионов и 15 (10,5%) – второй. Перед криоконсервированием среднее количество blastomeres во второй группе составило $3,73 \pm 0,08$. Все эмбрионы были отнесены к первой категории качества. После деконсервирования среднее количество blastomeres в данной группе составило $2,84 \pm 0,1$. Снижение количества blastomeres в эмбрионах после замораживания-оттаивания связано с лизисом отдельных blastomeres после криоконсервирования. После криоконсервирования 74,7% эмбрионов соответствовали первой категории качества и 25,3% – второй. Морфологический анализ эмбрионов контрольной группы через 24 и 48 ч культивирования выявил многоядерные blastomeres в 3-х эмбрионах (2,09%). Остальные эмбрионы характеризовались наличием одноядерных и безъядерных blastomeres.

Морфологическая оценка эмбрионов через 24 ч культивирования выявила наличие многоядерных blastomeres в 12 (8,2%) деконсервированных эмбрионах. Нами были отмечены различные механизмы образования многоядерных blastomeres: двухъядерные макробlastomeres, возникшие, очевидно, за счет слияния отдельных клеток в 3-х эмбрионах (рис.2); дробление ядер без разделения цитоплазмы в 9 эмбрионах (рис.3).

Наблюдение за дальнейшим развитием эмбрионов с аномальным количеством ядер позволило установить, что темпы дробления таких эмбрионов отличаются от нативных. Так, 5 из 12 эмбрионов не дробились через 24 ч культивирования, 7 – остановились в развитии на стадии 8-ми blastomeres.



Рис. 2. Эмбрион человека после криоконсервирования. Образование макробlastomера ($\times 300$).

Fig. 2. Human embryo following cryopreservation. Macroblastomere with two nuclei formation ($\times 300$).

Morphology of frozen-thawed embryos was evaluated using microscope ($\times 400$). Cytogenetic preparations were prepared according to Tarkovsky's method [15]. FISH analysis was accomplished on E. Coonen [4].

Results and discussion

There were examined native and cryopreserved embryos following 24hrs of culturing: 143 embryos of the 1st group and 146 ones of the second group. Average number of blastomeres in the first embryo group made 3.7 ± 0.07 , 128 (89.5%) among those were of the 1st quality grade and 15 (10.5%) of the 2nd one. Prior to cryopreservation an average number of blastomeres in the 2nd group made 3.73 ± 0.08 . All the embryos were referred to the 1st quality grade. Following freeze-thawing an average number of blastomeres in this group was 2.84 ± 0.01 . Fall of blastomere number in the embryos after freeze-thawing is related to lysis in some blastomeres following cryopreservation. After cryopreservation 74.7% of embryos corresponded to the 1st quality grade and 25.3% to the 2nd quality grade. Morphological analysis of the control group embryos in 24 and 48 hrs of culturing revealed multinucleated blastomeres in 3 embryos (2.09%). All the rest of the embryos were characterized by the presence of uninuclear and nucleus-free blastomeres.

Morphological estimation of the embryos in 24 hrs of culturing revealed the presence of multi-nucleated blastomeres in 12 (8.2%) of frozen-thawed embryos. We noted various mechanisms for multi-nucleated blastomere formation: binuclear macroblastomeres which may have appeared due to the fusion of some cells in 3 embryos (Fig. 2); nucleus cleavage with no cytoplasm division in 9 embryos (Fig. 3).



Рис. 3. Эмбрион человека на стадии 2-х blastomeres. Blastomeres восьмиядерные ($\times 600$).

Fig. 3. Human embryo at the stage of 2 blastomeres. Eight-nuclear blastomeres ($\times 600$).

Морфофункциональный, цитогенетический и молекулярно-генетический анализ многоядерных деконсервированных эмбрионов человека

Morphofunctional, cytogenetic and molecular-genetic analysis of multinucleated frozen-thawed human embryos

Количество клеток Cell amount	Категория качества эмбрионов Quality grade of embryos	Количество клеток Cell amount	Категория качества эмбрионов Embryo quality grade	Сохранность бластомеров,% Blastomeres integrity,%	Кариоти- пирование Karyotyping	FISH – анализ FISH – analysis
до консервирования prior to cryopreservation		после криоконсервирования following cryopreservation				
2	1	2	1	100	–	Тетраплоид 4n Tetraploidy 4n
4	1	4	1	100	–	Мозаик 2n/6n Mosai cism 2n/6n
8	1	8	1	100	–	Мозаик 2n/4n Mosai cism 2n/4n
2	1	2	1	100	92,XX	–
4	1	3	2	75	–	–
4	1	4	1	100	–	–
4	1	3	2	75	–	–
4	1	2	2	50	–	–
2	1	2	1	100	92,XY 92,XY	–
4	1	4	1	100	–	–
4	1	4	1	100	92,XX	–
2	1	2	1	100	–	–

Мы провели цитогенетический и молекулярно-генетический анализ деконсервированных эмбрионов, в которых были обнаружены двухъядерные бластомеры (таблица).

Таким образом, многоядерные бластомеры содержат полиплоидное количество хромосом: 5 – тетраплоидное, 1 – гексаплоидное.

Полиплоидия – достаточно редко встречающаяся спонтанная геномная aberrация в эмбриогенезе человека [1]. Данная хромосомная аномалия может возникнуть в результате патологий созревания гамет, оплодотворения и нарушения начальных стадий развития зародыша. При этом могут возникать полиплоидные эмбрионы и мозаики, т.е. эмбрионы с диплоидными, анеуплоидными и полиплоидными бластомерами.

При нормальном развитии, в результате первого деления, образуются 2 бластомера, ядра которых диплоидны. Если подавить цитотомию после того, как пронуклеусы осуществили редупликацию ДНК, они могут сливаться в одно тетраплоидное ядро, при последующем дроблении выявляются тетраплоидные бластомеры [13].

Observation of further development of the oocytes with abnormal nuclei amount allowed to reveal the cleavage rates in such embryos to be different from the native ones. Thus 5 among the 12 embryos did not cleave in 24 hrs of culturing, 7 of them stopped the development at the stage of 8 blastomeres.

We carried out cytogenetic and molecular-genetic analysis of frozen-thawed embryos, where binucleated blastomeres were found (Table).

Thus multinucleated blastomeres were found to contain polyploid number of chromosomes: 5 – tetraploidal, 1 – hexaploidal.

Polyploidy is known to be quite rare spontaneous genomic aberration in human embryogenesis [1]. Such a chromosome abnormality may appear as a result of pathologies of gamete maturation, fertilization and impairment of the initial stages of embryo development. In this case polyploid embryos and mosaicism may appear, that is embryos with diploidal, aneuploidal and polyploidal blastomeres.

During normal development as a result of the 1st cleavage there are formed 2 blastomeres, nuclei of which are diploidal. If we suppress cytotomy after the

Скорее всего, образование многоядерных бластомеров связано с дефектом цитоскелета. У млекопитающих ацитокнез может возникать из-за дефектов микрофиламентов [13]. Аномалии веретена деления могут включать и артефакты в функционировании микротрубочек.

Вторым механизмом двухъядерности является слияние отдельных бластомеров. Ряд авторов считает, что слияние бластомеров происходит только у морфологически аномальных эмбрионов [3, 6, 7, 17]. Munne показал, что 57% таких эмбрионов останавливаются в развитии на ранних стадиях и только 14% дробятся до стадии бластоцисты [11]. Считают [6, 7, 9], что механизм слияния бластомеров возможен в любых клетках, независимо от их морфологических особенностей, поскольку в его основе лежат дефекты клеточной мембраны, возникающие при действии таких факторов, как криопротекторы либо низкие температуры. В процессе дегидратации между бластомерами возникают цитоплазматические мосты, зона плотного контакта клеток возрастает, что, возможно, приводит к их дальнейшему слиянию [16, 17].

Дезагрегации эмбрионов человека на 207 бластомеров, которые культивировали отдельно в течение 24-х часов, позволили выявить 76% митотически разделенных клеток, в остальных наблюдали безъядерность и многоядерность. Частота двухъядерных бластомеров составила 5,7% [12].

В нашем наблюдении 5 из 12 эмбрионов с многоядерными бластомерами прекратили свое развитие. Тот факт, что большинство полиядерных эмбрионов останавливается в развитии на стадии 8-ми бластомеров, свидетельствует о генетическом механизме коррекции ошибок раннего эмбриогенеза. Хромосомный анализ двухъядерных бластомеров эмбрионов человека показал, что они содержат полиплоидный набор хромосом.

Наблюдения за детьми, родившимися после переноса деконсервированных эмбрионов, показывают, что частота хромосомных патологий находится в пределах общепопуляционной нормы [14]. Интересным является случай обнаружения 2-х пустых тетраплоидных плодных пузырей после переноса деконсервированных эмбрионов, находящихся на стадии зиготы [6]. Возможно, в данном случае имел место перенос эмбрионов с двухъядерными бластомерами.

Показано, что многоядерные бластомеры могут элиминировать фрагментированием или блокированием митотического деления [3]. Поскольку эмбрионы человека до стадии 8 бластомеров являются тотипотентными, происходит их компенсация оставшимися нормальными клетками.

Таким образом, основными механизмами, лежащими в основе образования многоядерных

pronuclei have accomplished DNA reduplication, they may fuse into one tetraploid nucleus, and at further cleavage there are revealed tetraploid blastomeres [13].

The formation of multinucleated blastomeres is thought to be related to a cytoskeleton defect. In mammals acytokinesis may appear due to microfilaments defects [13]. Abnormalities of the cleavage spindle may also include artifacts in microtubules functioning.

Fusion of separate blastomeres is the 2nd mechanism of binuclear characteristics. A number of authors consider the blastomeres fusion to occur only in morphologically abnormal embryos [3, 6, 7, 17]. Munne demonstrated that 57% of such embryos stopped their development at early stages and only 14% cleaved up to the stage of blastocyst [11]. Mechanism of blastomeres fusion is considered to occur in any cell independently on their morphological peculiarities, as in its base there are the defects of cell membrane appearing under the effect of such factors as cryoprotectants or low temperatures. During dehydration cytoplasmatic bridges are known to appear between blastomeres, zone of dense contact expands, that may result in their further fusion [16, 17].

Disaggregations of human embryos per 207 blastomeres being cultured separately within 24 hours allowed to reveal 76% of mitotically separated cells, in the rest there were observed nucleus-free and multinucleated cells. The rate of binucleated blastomeres made 5.7% [12].

During our observation 5 embryos among the 12 ones with multinucleated blastomeres stopped their development. The fact that the majority of multinucleated embryos terminate the development at the stage of eight blastomeres proves the existence of genetic mechanism for an error correction during early embryogenesis. Chromosome analysis of human embryo binucleated blastomeres demonstrated them to contain a polyploid chromosome set.

Observation of the children which were born following the transfer of frozen-thawed embryo, showed the rate of chromosomal pathologies to be within the general populational norm [14]. There was an interesting case of finding two empty tetraploid fetal vesicles after having transferred frozen-thawed embryos being at the stage of zygote [6]. In this case there probably occurred the embryo transfer with binucleated blastomeres.

It was shown that multinucleated blastomeres might eliminate by fragmentation or blockage of mitotic cleavage [3]. Though human embryos are known to be totipotent up to the stage of 8 blastomeres there occurs their compensation by the normal cells left.

Thus either blastomeres fusion or cytokinesis suppression after genomic duplication are the main mechanisms lying in the base of formation of multinucleated human embryos following cryopreservation.

эмбрионов человека после криоконсервирования, являются слияние blastomeres либо супрессия цитокинеза после геномной дупликации.

Выводы

Вероятность возникновения многоядерных blastomeres эмбрионов человека после криоконсервирования находится на уровне 8%. Многоядерные blastomeres содержат полиплоидный набор хромосом.

В репродуктивных технологиях наряду с общепризнанной морфологической оценкой blastomeres (количество, четкость контуров, сферичность, степень фрагментации, прозрачность, зернистость цитоплазмы) необходим строгий морфологический контроль количества ядер blastomeres после криоконсервирования.

Литература

1. Дыбан А.П., Баранов В.С. Цитогенетика развития млекопитающих. – М: Наука, 1978. – 216 с.
2. Элдер К. Лабораторные процедуры. – Bourn-Hallam group, 1990. – 23 с.
3. Balakier H., Cabaca O., Bouman D. Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism // Hum. Reprod. – 2000. – Vol. 15, N11. – P. 2404-2410.
4. Coonen E. Genomic Constitution of Gametes and Preimplantation Embryos. – Maastricht, 1995. – 112 p.
5. Edgar D., Bourne H., Speirs S. et al. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos // Human Reproduction. – 2000. – Vol. 15. – P. 175-179.
6. Ginsburg K., Johnson M., Sacco A. et al. Tetraploidy after frozen embryo transfer: cryopreservation may interfere with first mitotic division // Abstract of 39 Annual Meeting of the Pacific Coast Fertility Society. – 1991. – P. 196.
7. Hardy K., Winston R., Handyside A. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro: failure of cytokinesis during early cleavage // J. Reprod. Fertil. – 1993. – Vol. 98. – P. 549-558.
8. Van der Elst J., Van den Abbeel E., Vitrier S et al. Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates // Hum. Reprod. – 1997. – Vol. 12. – P. 1513-1521.
9. Kligman I., Benadiva C., Alikani. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities // Hum.Reprod. – 1996. – Vol. 11. – P. 1492-1498.
10. Lassale B., Testard J., Renard J. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propane diol // Fertil. Steril. – 1985. – Vol. 44. – P. 645-651.
11. Munne S., Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos // Hum. Reprod. Update. – 1998. – Vol. 4, N6. – P. 842-855.
12. Pickering S.J., Taylor A., Jonson M.H. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos // Hum.Reprod. – 1990. – Vol. 10. – P. 1912-1922.
13. Praff H., Chakraborty J., Surani M. Molecular and morphological differentiation of the mouse blastocyst after manipulations with cytochalasin D // Cell. – 1981. – Vol.26. – P. 279-292.

Conclusions

Probability of the appearance of multinucleated blastomeres of human embryos after cryopreservation is at the level of 8%. Multinucleated blastomeres contain polyploidal set of chromosomes.

Reproductive technologies along with generally accepted morphological estimation of blastomeres (the number, distinct contours, sphericity, fragmentation rate, transparency, cytoplasm granularity) should require a thorough morphological control of blastomeres nuclei number following cryopreservation.

References

1. Dyban A.P., Baranov V.S. Cytogenetics of mammal's development. – Moscow: Nauka, 1978. – 216 p.
2. Elder K. Laboratory procedures. – Bourn-Hallam group, 1990. – 23p.
3. Balakier H., Cabaca O., Bouman D. Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism // Hum. Reprod. – 2000. – Vol. 15, N11. – P. 2404-2410.
4. Coonen E. Genomic Constitution of Gametes and Preimplantation Embryos. – Maastricht, 1995. – 112 p.
5. Edgar D., Bourne H., Speirs S. et al. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos // Human Reproduction. – 2000. – Vol. 15. – P. 175-179.
6. Ginsburg K., Johnson M., Sacco A. et al. Tetraploidy after frozen embryo transfer: cryopreservation may interfere with first mitotic division // Abstract of 39 Annual Meeting of the Pacific Coast Fertility Society. – 1991. – P. 196.
7. Hardy K., Winston R., Handyside A. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro: failure of cytokinesis during early cleavage // J. Reprod. Fertil. – 1993. – Vol. 98. – P. 549-558.
8. Van der Elst J., Van den Abbeel E., Vitrier S et al. Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates // Hum. Reprod. – 1997. – Vol. 12. – P. 1513-1521.
9. Kligman I., Benadiva C., Alikani. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities // Hum.Reprod. – 1996. – Vol. 11. – P. 1492-1498.
10. Lassale B., Testard J., Renard J. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propane diol // Fertil. Steril. – 1985. – Vol. 44. – P. 645-651.
11. Munne S., Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos // Hum. Reprod. Update. – 1998. – Vol. 4, N6. – P. 842-855.
12. Pickering S.J., Taylor A., Jonson M.H. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos // Hum.Reprod. – 1990. – Vol. 10. – P. 1912-1922.
13. Praff H., Chakraborty J., Surani M. Molecular and morphological differentiation of the mouse blastocyst after manipulations with cytochalasin D // Cell. – 1981. – Vol.26. – P. 279-292.
14. Sutcliffe A.G. Follow-up of children conceived from cryopreserved embryos // Mol. Cell Endocrinol. – 2000. – Vol. 169, N1-2. – P. 91-93.
15. Tarkowsky A. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // Cytogenetic. – 1966. – Vol. 5. – P. 394-400.
16. Tesarik J., Kopečný V., Plachot M. Ultrastructural and autoradiographic observations on multinucleated blastomeres

14. *Sutcliffe A.G.* Follow-up of children conceived from cryopreserved embryos // *Mol. Cell Endocrinol.*– 2000.– Vol. 169, N1-2.– P. 91-93.
15. *Tarkowsky A.* An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // *Cytogenetic.*– 1966.– Vol. 5.– P. 394-400.
16. *Tesarik J., Kopecky V., Plachot M.* Ultrastructural and autoradiographic observations on multinucleated blastomeres of human cleaving embryos obtained by in vitro fertilization // *Hum. Reprod.*– 1996.– Vol. 2.– P. 127-136.
17. *Trounson A.O., Sathanathan A.H.* The application of electron microscopy in the evaluation of the 2-4 cell human embryos cultured in vitro // *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.*–1984.– Vol.3.– P. 153-165.
18. *Wood M.J.* Embryo freezing: is it safe? // *Hum. Reprod.*– 1997.– Vol.12.– P. 32-37.
- of human cleaving embryos obtained by in vitro fertilization // *Hum. Reprod.*– 1996.– Vol. 2.– P. 127-136.
17. *Trounson A.O., Sathanathan A.H.* The application of electron microscopy in the evaluation of the 2-4 cell human embryos cultured in vitro // *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.*–1984.– Vol. 3.– P. 153-165.
18. *Wood M.J.* Embryo freezing: is it safe? // *Hum. Reprod.*– 1997.– Vol.12.– P. 32-37.

Accepted in 16.12.2003

Поступила 16.12.2003