

УДК 618.177-089.888.11

КРИТЕРИИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ КЛИНИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВИТРИФИКАЦИИ ЭМБРИОНОВ

Гайдуков С.Н., Боярский К.Ю., Фолькерт И.Г., Баласанян В.Г.

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, e-mail: spb@gpma.ru

Замораживание эмбрионов, оставшихся после переноса в цикле овариальной стимуляции, позволяет уменьшить число пересаживаемых эмбрионов и уменьшить процент многоплодной беременности. В настоящее время наиболее перспективным методом замораживания является витрификация. В статье был проведен анализ клинических параметров, позволяющих получать эмбрионы, подходящие для замораживания на четвертый день. Сравнивались две группы по 100 пациенток с бесплодием в каждой. В первой группе в результате проведения процедуры ЭКО были эмбрионы, пригодные для замораживания методом витрификации. Во второй группе эмбрионов для замораживания не было. Пациентки в первой группе были моложе, у них наблюдался более высокий уровень АМГ, была меньшая продолжительность бесплодия, и было меньше предыдущих попыток ЭКО. Также было выяснено, что суммарная частота родов в протоколах с витрификацией эмбрионов на четвертый день в три раза превышает частоту родов в циклах, в которых не было эмбрионов, пригодных для замораживания.

Ключевые слова: ВРТ, витрификация на четвертые сутки развития, критерии клинической эффективности

CRITERIA THAT DETERMINE THE CLINICAL EFFECTIVENESS OF VITRIFICATION OF EMBRYOS OF THE FOURTH DAY OF DEVELOPMENT

Gaydukov S.N., Boyarskiy K.Y., Folkert I.G., Balasanyan V.G.

Saint-Petersburg state pediatric medical University, Saint-Petersburg, e-mail: gaiducovsn@rambler.ru

The freezing of embryos remaining after transfer in a cycle of ovarian stimulation, allows reducing the number of transferred embryos and reducing the percentage of multiple pregnancies. Currently, the most promising method of freezing is vitrification. The article was the analysis of clinical parameters, which allow obtaining embryos suitable for freezing on the fourth day. We compared two groups of 100 patients with infertility in each. In the first group there were IVF embryos suitable for freezing by vitrification. In the second group there were not embryos for freezing. Patients in the first group were younger, they had higher levels of AMH, had a shorter duration of infertility, and had less previous IVF attempts. It was found that the total delivery rate in the protocols with vitrification of embryos on the fourth day, three times increases the frequency of births in cycles in which no embryos are suitable for freezing.

Keywords: ARTs, vitrification on the fourth day of development, criteria for clinical effectiveness

Разработка методик овариальной стимуляции, применяемых при использовании вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), привела к тому, что после переноса одного или двух эмбрионов, в большинстве циклов остаются так называемые «лишние» эмбрионы. Замораживание этих эмбрионов с целью подсадки их в последующих циклах является важнейшей задачей в современном лечении бесплодия. Этот подход позволяет уменьшить процент многоплодной беременности и увеличить суммарную частоту наступления беременности после проведения процедуры ВРТ. Необходимым условием для того, чтобы в циклах овариальной стимуляции имелись эмбрионы, достойные последующего замораживания, является наличие сохраненного овариального резерва [1].

Первое сообщение об успешной беременности и родах после размораживания и переноса пациентке ранее замороженных эмбрионов относится к 1984 году [3, 4].

Успеху данной процедуры способствовали разработка в 70-х годах XX века технологии замораживания и размораживания эмбрионов млекопитающих разных видов [2].

Существуют два подхода к замораживанию человеческих предимплантационных эмбрионов: медленное и быстрое замораживание (витрификация). Методика медленного замораживания эмбрионов была разработана в 80-х годах прошлого столетия и позволила получить первые стабильные клинические результаты. Однако частота наступления беременности при использовании этой методики относительно низкая. Основной проблемой при медленном замораживании биологических объектов является высокая частота образования кристаллов льда при расширении воды при температуре ниже нуля. Альтернативой медленному замораживанию может служить витрификация биологических объектов. Теоретической базой для этой процедуры были исследования, которые показали, что при очень

быстром замораживании воды образование кристаллов льда не происходит, соответственно, вода не расширяется и находится в состоянии, схожем со стеклом. Такой процесс называется витрификацией. В настоящее время метод витрификации успешно используется как для замораживания ооцитов, так и для эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития. Витрификация эмбрионов на четвертый день развития, что соответствует стадии морулы, относительно редко используется для замораживания эмбрионов, в том числе и методом витрификации. В 2002 году австрийские исследователи сообщили о 22 циклах, в которых были разморожены эмбрионы, подвергнутые витрификации на стадии морулы. Из 55 эмбрионов 54 пережили размораживание, 30 эмбрионов у 18 пациенток были перенесены в полость матки, из которых у 5 пациенток наступила беременность (27,8%), во всех случаях закончившаяся родами. Частота имплантации составила 20% [9]. Португальские исследователи изучали частоту выживания эмбрионов после витрификации на стадии морулы. Выяснилось, что частота выживания составила 73%, что было сравнимо с выживанием после размораживания эмбрионов на стадии бластоцисты [10]. Также в работе австрийских исследователей было показано, что витрификация человеческих эмбрионов на стадии морулы, при использовании более высоких концентраций криопротекторов, таких как этиленгликоль и ДМСО, приводит к более высокой частоте наступления беременности по сравнению с более низкими концентрациями [11]. Также в литературе имеется сообщение о повторной заморозке эмбрионов на стадии морулы [12]. Следует отметить, что витрификация эмбрионов на четвертые сутки имеет ряд важных преимуществ. Во-первых, на этой стадии еще не формируется полость эмбриона (бластоцель) и нет необходимости проведения специальных манипуляций для уменьшения этой полости, и процесс витрификации проходит проще. Во-вторых, есть возможность культивировать размороженные эмбрионы в течение суток до стадии бластоцисты, что позволяет выбирать более качественные эмбрионы для переноса.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены данные 100 последовательных циклов ЭКО/ИКСИ, в которых было проведено замораживание оставшихся после переноса эмбрионов и 100 последовательных циклов, в которых таких эмбрионов не было. Также были исследованы исходы переносов размороженных эмбрионов. Все циклы ЭКО/ИКСИ были проведены в период с мая 2011 года по сентябрь 2012 года

в клинике репродукции «Генезис», Санкт-Петербург. Циклы с переносом размороженных эмбрионов были проведены с июля 2011 года по август 2013 года. Из исследования были исключены пациенты, у которых использовались донорские яйцеклетки или сперматозоиды, а также пациенты, участвующие в программе суррогатного материнства. Овариальная стимуляция осуществлялась по стандартному длинному протоколу с использованием агонистов ЛГ-РГ или по протоколу с антагонистами. Препараты, содержащие ФСГ, были использованы как рекомбинантного, так и мочевого происхождения. Оплодотворение и культивирование эмбрионов было осуществлено с помощью сред компании «Ориджи», Дания. Витрификацию эмбрионов осуществляли на четвертые сутки развития с использованием растворов, содержащих следующие криопротекторы: этиленгликоль, фикоколл, сахароза, трегалоза (ЗАО «Протеинсинтез», Россия). После размораживания эмбрионы помещались в те же среды, в которых они культивировались, и перенос в полость матки пациенток осуществлялся через сутки. Во всех случаях было перенесено по два эмбриона. При математической обработке числовых данных был использован *t*-Студент тест, для дихотомических данных χ -квадрат тест. Уровень статистической значимости был принят $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Показаниями для применения процедуры ЭКО/ИКСИ в обеих группах пациенток служили мужской фактор, трубный фактор, эндометриоз, ановуляция, необъяснимое бесплодие, а также сочетание приведенных причин. В обеих группах распределение причин статистически не различалось, за исключением наличия эндометриоза. В группе, где были получены эмбрионы годные для замораживания, у 6 пациенток (6%) был диагностирован эндометриоз, тогда как в группе без замораживания эмбрионов таких пациенток было 23 (23%), различия между группами статистически достоверные ($P = 0,001$).

При анализе клинических параметров пациентов выяснилось, что статистически различались возраст пациенток в обеих исследованных группах, уровень АМГ, продолжительность бесплодия и число предыдущих попыток ЭКО/ИКСИ (табл. 1). В то же время возраст пациентов и показатели спермограммы не различались в обеих группах.

При назначении овариальной стимуляции в обеих группах различалась статистически средняя суммарная доза ФСГ, среднее число полученных яйцеклеток, эмбрионов на третий день развития, а также частота развивающейся беременности после 12 недель в циклах, в которых проводилась овариальная стимуляция (табл. 2).

После того как были завершены переносы эмбрионов в циклах со стимуляцией и оценено количество сообщенных родов, у пациенток с оставшимися эмбрионами

и у которых беременность не наступила, в течение последующих двух лет, были проведены протоколы с переносом раз-

роженных эмбрионов. Суммарная частота сообщенных родов в обеих группах показана в табл. 3.

Таблица 1

Клинические характеристики пациентов в обеих группах

Клинический параметр	Группа с замороженными эмбрионами	Группа без замороженных эмбрионов	Р
Возраст пациенток, годы	32,8 ± 0,4	36,2 ± 0,5	< 0,0001
АМГ, нг/мл	3,2 ± 0,3	1,2 ± 0,1	< 0,0001
Продолжительность бесплодия, годы	5,2 ± 0,3	7,3 ± 0,4	< 0,0001
Число предыдущих попыток	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,02

Таблица 2

Показатели овариальной стимуляции и частота наступления беременности в обеих группах

Клинический параметр	Группа с замороженными эмбрионами	Группа без замороженных эмбрионов	Р
Суммарная доза ФСГ, мЕд	2215 ± 67	3155 ± 88	< 0,0001
Число полученных яйцеклеток	12,8 ± 0,6	6,6 ± 0,5	< 0,0001
Число эмбрионов на третий день развития	8,1 ± 0,3	2,9 ± 0,2	< 0,0001
Частота развивающейся беременности после 12 недель	41 %	19 %	0,001

Таблица 3

Суммарная частота сообщенных родов в исследованных группах

Суммарная частота родов	Группа с криоконсервацией эмбрионов	Группа без криоконсервации эмбрионов	Р
Перенос в цикле стимуляции	33 %	16 %	0,008
Первый перенос размороженных эмбрионов	43 %	–	–
Второй перенос размороженных эмбрионов	48 %	–	–
Итого	48 %	16 %	0,0001

Наличие эмбрионов, оставшихся после переноса в цикле овариальной стимуляции, является важным критерием прогноза успешных родов при проведении процедуры ВРТ. Пациентки с замороженными эмбрионами были более молодого возраста, у них был выше АМГ, меньшая продолжительность бесплодия и меньше предшествующих попыток ВРТ. С клинической точки зрения в этой группе реже встречался эндометриоз, и при овариальной стимуляции требовалась меньшая суммарная доза препаратов ФСГ. В то же время число полученных яйцеклеток и эмбрионов было больше. Частота наступления беременности и родов была выше в цикле овариальной стимуляции. Более того, в группе с замораживанием эмбрионов дальнейшее использова-

ние размороженных эмбрионов приводило к увеличению суммарной частоты родов и после двух переносов она достигала 48 %, что в три раза превышало частоту родов у пациенток без замороженных эмбрионов. Все это говорит о высокой клинической эффективности витрификации эмбрионов на четвертый день развития.

Список литературы

1. Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., Чинчаладзе А.С. Факторы, определяющие овариальный резерв женщины (обзор литературы) // Журнал акушерства и женских болезней. – 2009. – т. 58, № 2. – С. 59–67.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наукова Думка. – 1994. – 431 с.
3. Trounson A., Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo // Nature. – 1983 Oct 20–26. – № 305(5936). – P. 707–9.

4. Zeilmaker G.H., Alberda A.T., van Gent I., Rijkmans C.M., Drogendijk A.C. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos // *FertilSteril.* – 1984 Aug. – № 42(2). – P. 293–6.
5. Lornage J., Bouliou D., Mathieu C., Guerin J.F., Pinatel M.C., James R., Alvarado C. Transfers of frozen-thawed human embryos in cycles stimulated by HMG // *HumReprod.* – 1990 Jan. – № 5(1). – P. 60–5.
6. Karlström P.O., Bergh T., Forsberg A.S., Sandkvist U., Wikland M. Prognostic factors for the success rate of embryo freezing // *HumReprod.* – 1997 Jun. – № 12(6). – P. 1263–6.
7. Mandelbaum J., Belaisch-Allart J., Junca A.M., Antoine J.M., Plachot M., Alvarez S., Alnot M.O., Salat-Baroux J. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes // *HumReprod.* – 1998 Jun. – № 13 Suppl 3. – P. 161–74.
8. AbdelHafez F.F., Desai N., Abou-Setta A.M., Falcone T., Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis // *Reprod Biomed Online.* – 2010 Feb. – № 20(2). – P. 209–22.
9. Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche Ch., Standaert V., van Roosendaal E., Vandervorst M., Bollen N., Zech H., Mukaida T., Takahashi K., Schoysman R. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification // *Hum Reprod.* – 2002 Mar. – № 17(3). – P. 744–51.
10. Cremades N., Sousa M., Silva J., Viana P., Sousa S., Oliveira C., Teixeira da Silva J., Barros A. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes // *HumReprod.* – 2004 Feb. – № 19(2). – P. 300–5.
11. Vanderzwalmen P., Ebner T., Zech N. One decade of experience with vitrification of human embryos in straws, hemi-straws, and high security vitrification straws, In book, *Vitrification in Assisted Reproduction, First Edition, 2007*, Eds by Tucker M., Liebermann J., Informa Healthcare UK Ltd., London. – 320 p.
12. Yokota Y., Yokota H., Yokota M., Sato S., Araki Y. Birth of healthy twins from in vitro development of human refrozen embryos // *FertilSteril.* – 2001 Nov. – № 76(5). – P. 1063–5.
4. Zeilmaker G.H., Alberda A.T., van Gent I., Rijkmans C.M., Drogendijk A.C. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *FertilSteril.* 1984 Aug; 42(2): 293–6.
5. Lornage J., Bouliou D., Mathieu C., Guerin J.F., Pinatel M.C., James R., Alvarado C. Transfers of frozen-thawed human embryos in cycles stimulated by HMG. *HumReprod.* 1990 Jan; 5(1): 60–5.
6. Karlström P.O., Bergh T., Forsberg A.S., Sandkvist U., Wikland M. Prognostic factors for the success rate of embryo freezing. *HumReprod.* 1997 Jun; 12(6): 1263–6.
7. Mandelbaum J., Belaisch-Allart J., Junca A.M., Antoine J.M., Plachot M., Alvarez S., Alnot M.O., Salat-Baroux J. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *HumReprod.* 1998 Jun; 13 Suppl 3: 161–74.
8. AbdelHafez F.F., Desai N., Abou-Setta A.M., Falcone T., Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2010 Feb; 20(2): 209–22.
9. Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche Ch., Standaert V., van Roosendaal E., Vandervorst M., Bollen N., Zech H., Mukaida T., Takahashi K., Schoysman R. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod.* 2002 Mar; 17(3): 744–51.
10. Cremades N., Sousa M., Silva J., Viana P., Sousa S., Oliveira C., Teixeira da Silva J., Barros A. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *HumReprod.* 2004 Feb; 19(2): 300–5.
11. Vanderzwalmen P., Ebner T., Zech N. One decade of experience with vitrification of human embryos in straws, hemi-straws, and high security vitrification straws, In book, *Vitrification in Assisted Reproduction, First Edition, 2007*, Eds by Tucker M., Liebermann J., Informa Healthcare UK Ltd., London, 320 p.
12. Yokota Y., Yokota H., Yokota M., Sato S., Araki Y. Birth of healthy twins from in vitro development of human refrozen embryos. *FertilSteril.* 2001 Nov; 76(5): 1063–5.

References

1. Boyarskiy KU, Gaidukov, S.N., Chinchaladze AS Determinants of ovarian reserve women (literature review), the Journal of obstetrics and female diseases (Russian), 2009. vol. 58, No. 2, pp. 59–67.
2. Belous A.M., VI. Grischenko Cryobiology. Kiev: Naukova Dumka. 1994. 431 p.
3. Trounson A., Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983 Oct 20–26; 305(5936): 707–9.

Рецензенты:

Гуркин Ю.А., д.м.н., профессор кафедры детской гинекологии и женской репродуктологии ФП и ДПО, ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России, г. Санкт-Петербург;

Костюшов Е.В., д.м.н., профессор, главный врач ГБУЗ ЛО «Сертоловская городская больница», г. Сертолово.

Работа поступила в редакцию 25.11.2014.