

Применение ПИКСИ как метода, повышающего эффективность вспомогательных репродуктивных технологий при мужских факторах бесплодия

В.А. Питько, А.И. Ткачев, О.А. Логинова

ГУ «Украинский медицинский центр акушерства, гинекологии и репродуктологии
Министерства здравоохранения Украины», г. Харьков

Изучены клинические результаты применения в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) вспомогательной методики ПИКСИ. Как показали наблюдения по результатам ЭКО+ПИКСИ+ИКСИ, применение селекции сперматозоидов повышает процент положительных результатов при ЭКО и способствует увеличению частоты наступления имплантации.

Ключевые слова: физиологическая интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ПИКСИ), интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ), экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), имплантация.

Мужское бесплодие стало бичом семейных пар в XXI веке. Если ранее преобладающими факторами бесплодия являлись женские факторы, то в настоящее время мужские факторы бесплодия стали соизмеримы по частоте с женскими факторами. Именно поэтому, вслед за дальнейшим развитием и совершенствованием методик экстракорпорального оплодотворения, стали параллельно активно развиваться методики лечения, направленные на мужские факторы бесплодия. Первым достижением в лечении мужского бесплодия стало создание методики ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида), далее – методика ИМСИ (интрацитоплазматическая инъекция морфологически отобранных сперматозоидов), которая дополнила методику ИКСИ. Однако обе эти методики (ИКСИ и ИМСИ) позволяли выбрать лишь визуально морфологически нормальный сперматозоид (без видимых дефектов) и не позволяли отобрать полностью зрелый и готовый к оплодотворению сперматозоид. Профессор G. Nuszgar с коллегами [1] разработали новый инновационный метод – метод ПИКСИ (физиологическое ИКСИ), основанный на том, что только полностью зрелые сперматозоиды с интактной ДНК имеют на головке специальные рецепторы и способны активно связываться с гиалуронатом, который является основным компонентом внеклеточного матрикса и содержится в больших количествах между кумулюсными клетками и зрелым ооцитом [2].

Цель исследования: изучение ценности дополнения метода ЭКО+ИКСИ в лечении супружеских пар с мужскими факторами бесплодия методикой ПИКСИ. При этом в анамнезе у пациентов была одна или более попыток ЭКО, дополненного ИКСИ, с отрицательным результатом лечения либо с прерыванием беременности в ранние сроки гестации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод ПИКСИ основан на снижении подвижности зрелого сперматозоида из-за связывания с гиалуронатом.

Это позволяет отобрать для оплодотворения зрелые, биохимически компетентные (имеющие все необходимые для оплодотворения рецепторы) сперматозоиды, то есть те, которые имеют полную возможность пройти природный «этап отбора» (через оболочку яйцеклетки и физиологически оплодотворить ее).

Для проведения ПИКСИ используют специальную чашку ПИКСИ™ с гиалуроновой кислотой. Использование чашек ПИКСИ™ воспроизводит важный этап естественной селекции сперматозоидов, имеющий место при нормальном оплодотворении – связывание зрелых мужских половых клеток с кумулюс оофорус. Чашка ПИКСИ™ представляет собой культуральную чашку из полистирола с нанесенными на верхнюю часть чашки тремя микрокаплями гиалуроновой кислоты. Для облегчения процесса поиска микрокапель выше них на поверхность чашки нанесены три маркировочные линии. Микрокапля расположена в пределах 2 мм в сторону и 3 мм назад от конца маркировочной линии.

Проведение методики ПИКСИ начинаем с гидратирования микрокапли. Для этого эмбриолог наносит по 10 мкл среды, подходящей для инкубации сперматозоидов, на участок рядом с окончанием маркировочных линий так, чтобы микрокапли гиалуроновой кислоты оказались покрыты средой. Вместо среды для инкубации сперматозоидов на чашку в некоторых случаях наносим капли поливинилпирролидона, необходимые для манипуляции со сперматозоидами. Покрываем чашку маслом для культуральных сред. Гидратирование микрокапель перед добавлением сперматозоидов дает гиалуроновой кислоте время для разбухания. Набухание гиалуроната и связывание сперматозоидов начинаются в среднем через 5 мин после добавления суспензии сперматозоидов. Оптимальной для связывания сперматозоидов с гидрогелем гиалуроновой кислоты является температура ниже 30 °C. Гидратированные микрокапли сохраняют стабильность в течение нескольких часов. Далее эмбриолог вносит в предварительно гидратированную микрокаплю каплю суспензии сперматозоидов равного или большего объема, чем тот, который использовали для гидратирования микрокапли (приблизительно 10 мкл). Кончиком микропипетки, содержащим сперму, эмбриолог прикасается к краю гидратированной капли под маслом на дне чашки и выпускает суспензию сперматозоидов. Добавление спермы в объеме, эквивалентном объему гидратирующей среды, гарантирует немедленное перемешивание и попадание сперматозоидов в область микрокапли гиалуроната. Связавшиеся с гиалуроновой кислотой сперматозоиды легко различимы: они активно бьют хвостом, но при этом лишены прогрессивной подвижности. Для быстрого полу-

чения большого количества связанных с гиалуроновой кислотой сперматозоидов, наносим на микрокаплю суспензию сперматозоидов с концентрацией приблизительно 100 000 способных к связыванию с гиалуронатом сперматозоидов на 1 мл (примерно 1,000–2,000 сперматозоидов на 10–20 мкл). По прошествии 10–20 мин количество связавшихся сперматозоидов будет возрастать, так как большее количество подвижных сперматозоидов попадет в область микрокапли гиалуроновой кислоты. Край микрокапли гиалуроната является физическим барьером, местом первого контакта сперматозоида с каплей гиалуроновой кислоты, поэтому многие сперматозоиды останавливаются у края капли. Для точного отбора сперматозоидов, способных к связыванию с гиалуроновой кислотой, отбор проводим в середине микрокапли. В том случае, если количество связавшихся сперматозоидов слишком мало или слишком велико для осуществления селекции, исходный образец спермы соответствующим образом разбавляем или концентрируем. Суспензию сперматозоидов после оптимизации концентрации наносим на следующую микрокаплю (на каждой чашке ПИКСИ™ их имеется по три). Для отбора связавшегося сперматозоида, кончик микропипетки для ИКСИ располагаем рядом с ним и втягиваем в пипетку жидкость так, чтобы сперматозоид вошел в пипетку. Как правило, отбор продолжаем до тех пор, пока не отберем 20–50 сперматозоидов. Выпускаем селектированные сперматозоиды в каплю PVP для начала и подготовки к ИКСИ (выполняем инактивацию хвоста, повторно оцениваем подвижность и морфологию). Далее действуем согласно стандартному протоколу ИКСИ, загружая в пипетку отобранные сперматозоиды для их инъекции в ооциты. Инкубацию оплодотворенных методом ИКСИ яйцеклеток проводим от трех до пяти суток.

В течение года нами было отобрано 38 семейных пар, имеющих в анамнезе одну и более неудачных попыток ЭКО + ИКСИ или ранние репродуктивные потери в анамнезе после лечения бесплодия. Пациенты были разделены на 2 группы: в I – 20 пациенток, а во II – 18. В состав I группы вошли пациентки, средний возраст которых на момент обращения в клинику составил $33,3 \pm 2,4$ года. Для контролируемой стимуляции яичников пациенток I группы применяли короткий протокол, выполняли ЭКО+ИКСИ. Во II группу вошла 18 пациенток, средний возраст которых составил $35,5 \pm 3,4$ года. Контролируемую стимуляцию яичников пациенток II группы проводили также по короткому протоколу, выполняли ЭКО+ИКСИ, дополненное ПИКСИ, по описанной методике. Мужья пациенток обеих групп имели низкую фертильность (олигоастенотератозооспермия). На момент трансвагинальной пункции размер фолликулов в среднем достигал 18–20 мм. Для поддержки лютеиновой фазы для пациенток двух групп применяли препараты прогестеронового ряда, а также вводили хорионический гонадотропин по 1500 МЕ подкожно по схеме. На полученных после трансвагинальной пункции ооцитах проводили ИКСИ (I группа) и ПИКСИ + ИКСИ (II группа). Ооциты и полученные после оплодотворения эмбрионы культивировали при температуре $37,0^\circ\text{C}$, при содержании CO_2 6,0% в средах СООК. Эмбриотрансфер выполняли на третьи или на пятые сутки развития эмбрионов. Пациенткам переносили не более 2–3 эмбриона в зависимости от пожеланий. Для каждого переноса путем селекции были выбраны эмбрионы лучшего качества.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В I группе было получено 112 ооцитов, во II группе – 101 ооцит. Спустя сутки от момента оплодотворения в I

группе развивалось 86 эмбрионов (76,8% от количества полученных при пункции ооцитов), во II группе – 98 (97,0%). На третьи сутки в I группе оставалось развиваться 74 эмбриона (66,1%). Учитывая бесперспективность дальнейшей селекции 11 (55%) пациенткам группы выполнен эмбриотрансфер на третьи сутки развития эмбрионов. В общей сложности им было перенесено 29 эмбрионов. Из оставшихся 45 эмбрионов на пятые сутки развитие происходило у 39 эмбрионов (86,7%). 9 оставшимся пациенткам группы перенесено в совокупности 24 эмбриона и 15 эмбрионов витрифицировано (резервные эмбрионы 7 пациенток). Во II группе на третьи сутки развивалось 98 эмбрионов (99,0%), учитывая возможность селекции на третьи сутки в данной группе эмбриотрансфер не выполняли. На пятые сутки развивалось 93 эмбриона (94,9%), эмбриотрансфер был произведен всем 18 пациенткам, перенесено в общей сложности 43 эмбриона (46,2% от количества эмбрионов продолжающих развиваться). 50 эмбрионов были витрифицированы, что явилось резервом для 16 пациенток группы.

В день переноса эмбрионов у пациенток обеих групп толщина эндометрия составляла не менее 9 мм. Биохимическая беременность путем количественного определения хорионического гонадотропина в крови в I группе диагностирована на 14-е сутки у 6 пациенток (30%), во II группе у 10 пациенток (55,5%). Наличие клинической беременности подтверждалось с помощью ультразвукового исследования на 21–22-й день после эмбриотрансфера. У пациенток I группы клиническая беременность была диагностирована в 4 случаях (20%). 75% этих беременностей (3 случая) были получены после переносов эмбрионов на третьи сутки культивирования. 25% клинических беременностей (1 пациентка) было получено после переноса эмбрионов на пятые сутки развития. В дальнейшем одна беременность прекратила развиваться в сроке гестации 4 нед. Конечная результативность лечения бесплодия в I группе составила 15%.

Среди пациенток II группы клиническая беременность продолжала развиваться в 9 случаях (50%) и лишь в 1 случае (5,5%) прекратила развитие в сроке гестации 7 нед.

ВЫВОДЫ

По представленным результатам исследований можно сделать вывод о том, что дополнение ЭКО+ИКСИ методикой ПИКСИ у повторно проходящих курс лечения пациенток с мужскими факторами бесплодия повышает вероятность наступления и прогрессирования беременности (в наших наблюдениях это 50% положительных исходов лечения). Данный факт можно объяснить тем, что отобранные при ПИКСИ сперматозоиды являются полностью зрелыми, а значит обладающими максимальной оплодотворяющей способностью и полностью нормальным хромосомным набором ДНК.

Учитывая высокий процент наступления клинических беременностей и их выживаемость в процессе гестации при дополнении ЭКО+ИКСИ методикой ПИКСИ, применение методики ПИКСИ при выраженной астеноотератозооспермии у пациентов при мужских факторах бесплодия является рациональным и обоснованным. Внедрение в практику и расширение использования методики ПИКСИ рекомендовано у категории пациенток, проходящих лечение методом ЭКО+ИКСИ, особенно в тех случаях, когда предыдущие попытки лечения оказались безрезультативными или сопровождались репродуктивными потерями (неразвивающиеся, анэмбрионии).

Використання ПІКСІ, як метода, що підвищує ефективність допоміжних репродуктивних технологій при чоловічих факторах безпліддя
В.А. Питько, О.І. Ткачев, О.О. Логінова

Вивчені клінічні результати використання у програмах екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) допоміжної методики ПІКСІ. Як показало спостереження за результатами ЕКЗ+ПІКСІ+ІКСІ, застосування селекції сперматозоїдів підвищує відсоток позитивних результатів при ЕКЗ та сприяє підвищенню частоти настання імплантації.

Ключові слова: фізіологічна інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїда (ПІКСІ), інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїда (ІКСІ), екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ), імплантація.

The usage of the P'ICSI for male factor infertility as the efficiency power method for reproductive technologies

V.A. Pitko, A.I. Tkachev, O.A. Loginova

The clinical results of assisted P'ICSI method using in the programs of human extracorporal fertilization was studied in the article. The analysis of the results of oocytes fertilization in vitro carried out with applying of the spermatozoa selection by P'ICSI+ICSI procedure indicated the increase of the embryos development and embryos implantation rates.

Key words: Physiologic Intra Cytoplasmic Sperm Injection (P'ICSI), Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI), in vitro fertilization (IVF), implantation.

Сведения об авторах

Питько Валерий Анатольевич – Государственное учреждение «Украинский медицинский центр акушерства, гинекологии и репродуктологии Министерства здравоохранения Украины», 61020, г. Харьков, ул. Тимирязева, 10; тел.: (057) 376-21-49, (057) 376-21-49. E-mail: center_agr@ukr.net

Ткачев Алексей Игоревич – Государственное учреждение «Украинский медицинский центр акушерства, гинекологии и репродуктологии Министерства здравоохранения Украины», 61020, г. Харьков, ул. Тимирязева, 10; тел.: (057) 376-11-00, (057) 376-21-49. E-mail: center_agr@ukr.net

Логінова Ольга Александровна – Государственное учреждение «Украинский медицинский центр акушерства, гинекологии и репродуктологии Министерства здравоохранения Украины», 61020, г. Харьков, ул. Тимирязева, 10; тел.: (057) 376-21-49, (057) 376-21-49. E-mail: center_agr@ukr.net

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huszar G., et al. 2003. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil. Steril.* 79 (3):1616–24.

2. Jakab A. et al. 2005. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil. Steril.* 84 (6):1665 – 73.

Статья поступила в редакцию 19.11.2015

НОВОСТИ МЕДИЦИНЫ

СПОСОБНОСТЬ ЧЕЛОВЕКА КОНЦЕНТРИРОВАТЬ ВНИМАНИЕ ЗАВИСИТ ОТ КАЧЕСТВА НЕЙРОННЫХ СВЯЗЕЙ

Качество нейронных связей головного мозга у здорового взрослого человека может предопределять индивидуальные способности концентрировать внимание, сообщается в журнале *Nature Neuroscience*.

В отличие от некоторых умственных процессов - таких как реакция или память - внимание сложно измерить, опираясь лишь на поведение человека. Группа ученых под руководством Моники Розенберг использовала функциональную магнитно-резонансную томо-

графию для определения способности 25 человек концентрировать внимание на сложных задачах. Авторы статьи изучали мозговую активность пациентов во время отдыха и выполнения заданий. Оказалось, что эта способность напрямую зависит от качества нейронных связей определенного типа в головном мозге человека.

На основе обобщенных наблюдений были созданы модели, с помощью которых оказалось возможным предсказать особенности внимания и у других пациен-

тов, чьи данные не были включены в модель. А подобное исследование 113 детей и подростков в возрасте от 8 до 16 лет позволило определять синдром дефицита внимания и гиперактивности. Исследователи отмечают, что разработанный ими подход дает науке возможности открытия новых нейромаркеров, которые могут быть связаны с другими познавательными способностями и симптомами заболеваний.

Источник: <http://www.gazeta.ru>