

В.И. Пиняев^{1,2}, М.П. Петрушко^{1,2}, Т.А. Юрчук¹

¹ *Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
г. Харьков ул. Переяславская 23, 61016; тел: +38 (057) 373-41-43; cryo@online.kharkov.ua*

² *Медицинский центр «ВРТ-клиника репродуктивной медицины»,
г. Харьков, пр. Гагарина 38Б, тел. +38 (057) 751-23-23; info@artclinic.com.ua*

ПОВЫШЕНИЕ ЧАСТОТЫ НАСТУПЛЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ В ЦИКЛАХ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ ПАЦИЕНТОК С НИЗКИМ ОВАРИАЛЬНЫМ РЕЗЕРВОМ: ТАКТИКА «FREEZE ALL»

Аннотация. Женщины с низким овариальным резервом составляют группу пациентов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), которая характеризуется невысокой частотой наступления беременности при проведении стандартного протокола лечения. Одним из путей увеличения частоты наступления беременности у этой группы пациенток может быть тактика криоконсервирования всех эмбрионов «freeze all», полученных после оплодотворения ооцитов в циклах индукции суперовуляции, с их последующим переносом в полость матки в подготовленных циклах. Цель работы – сравнение частоты наступления беременности у женщин с низким овариальным резервом в стимулированных и подготовленных криоциклах лечения бесплодия методами ВРТ. Результаты исследования показали высокую клиническую эффективность повышения частоты наступления беременности при использовании технологии криоконсервирования эмбрионов с последующим их переносом в полость матки в подготовленных циклах у пациенток с низким овариальным резервом.

Ключевые слова: криоконсервирование, витрификация, эмбрионы, частота наступления беременности.

ВВЕДЕНИЕ

Стратегия криоконсервирования эмбрионов во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ) широко применяется при получении большого количества эмбрионов высокого качества и переносе одного селективно выбранного эмбриона, во избежание многоплодной и увеличения кумулятивной частоты наступления беременности [2]. Эта тактика является необходимой при возникновении синдрома гиперстимуляции яичников [4], неадекватном состоянии эндометрия [6], повышении уровня прогестерона в день введения чХГ [13]. В последнее время сообщается о высоких шансах наступления беременности и положительных перинатальных исходах при переносе криоконсервированных эмбрионов в последующих, не стимулированных циклах [7]. Зачастую, перенос эмбрионов в стимулированных циклах не проводят, криоконсервируя все полученные эмбрионы (тактика “freeze-all”) и перенося их в последующих подготовленных циклах, объясняя это лучшей подготовкой эндометрия и физиологическим гормональным уровнем женщин [12].

Вопрос выбора тактики лечения бесплодия методами ВРТ пациенток с низким овариальным резервом при наличии единичных эмбрионов остается открытым.

Цель работы □ изучение частоты наступления беременности у женщин с низким овариальным резервом и «плохим» ответом яичников при индукции суперовуляции в стимулированных и подготовленных криоциклах лечения бесплодия методами ВРТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование включало данные амбулаторных карт пациенток, проходивших лечение бесплодия методами ВРТ в медицинском центре «ВРТ-клиника репродуктивной медицины» с 2008 по 2018 гг., у которых было аспирировано не более 3-х ооцитов. Первую группу составили 44 пациентки, у которых перенос эмбрионов осуществлялся в стимулированном цикле, вторую – 33 пациентки, которым в полость матки в подготовленном менструальном цикле переносили криоконсервированные эмбрионы.

Стимуляция суперовуляции пациенток была проведена с использованием короткого протокола с агонистами гонадотропин релизинг гормона. Стимуляцию яичников проводили с использованием рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ). Через 36 ч после введения триггера овуляции проводили аспирацию фолликулов (трансвагинально под контролем ультразвукового сканера).

Выделенные ооциты культивировали в среде Globaltotal (Life Global, США). Спермии из эякулята выделяли методом градиента с использованием Sperm Grade (Cook, США). Интрацитоплазматическую инъекцию спермиев в ооцит (ICSI) проводили через 4-6 ч после выделения ооцитов [5]. По наличию пронуклеусов ооцитах через 16-18 ч после ICSI. Зиготы переносили в свежую среду и культивировали *in vitro*. Эмбрионы 5-х суток развития *in vitro*, находящиеся на стадии морула-бластоциста, были криоконсервированы по М.Куwayама с модификациями [9].

Эмбрионы эквивилибировали при комнатной температуре (22±25 °С) в течение 8±15 мин в 7,5% этиленгликоля (EG) + 7,5% диметилсульфоксида (ДМСО) в культуральной среде (Life-Global, США) После сжатия и восстановления исходного объема эмбрионы помещали в витрификационный раствор с 15% EG + 15% ДМСО + 0,5 М сахарозы. После 20-30 сек экспозиции эмбрионы помещали на крионоситель (Cryotech, Япония) в минимальном объеме криозащитной среды и немедленно погружали в жидкий азот. На носителе размещали по одному эмбриону. Для оттаивания носитель вынимали из жидкого азота и переносили в 1,0 М сахарозу, предварительно нагретую до 37 °С. После 1 мин экспозиции, эмбрионы последовательно переносили в 0,75; 0,5; 0,25 и 0М р-р сахарозы на 2 мин, после чего □ в среду культивирования. Выживание эмбрионов оценивали по морфологическим характеристикам: восстановление полости бластоцисты, целостность бластомеров и *Zonapellucida* (ZP).

Эмбрионы размещали по одному в 0,8 мл среды и культивировали *in vitro* при 37 °С в

атмосфере 5,5% CO₂ на протяжении 3-х часов до их переноса в полость матки пациентки.

Количественный уровень ХГ определяли на 12 день после эмбриотрансфера. Клиническую беременность подтверждали при ультразвуковом исследовании (PhilipsHD-11, Япония) по наличию гестационного мешка. Показатель клинической беременности определяли путем деления количества полученных беременностей на общее количество переносов эмбрионов. При расчете частоты имплантации количество гестационных мешков было разделено на количество перенесенных эмбрионов.

Сравнения между группами были выполнены с использованием χ^2 -Теста. Данные были представлены как (M±m) и сравнивались с использованием двухстороннего непарного *t*-теста. Значение *P* <0,05 считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показаниями для ВРТ в исследуемых группах служили трубно-перитонийный фактор, эндометриоз, ановуляция, идиопатическое бесплодие. Анализ клинических параметров показал отсутствие значимого отличия по возрасту пациенток, уровню АМГ, продолжительности бесплодного брака и средней суммарной дозе ФСГ (табл. 1).

Эмбриологические характеристики исследуемых групп значимо не отличались, так среднее количество аспирированных и оплодотворенных ооцитов, а также качественные и количественные характеристики эмбрионов на пятый день культивирования *in vitro* были сопоставимы (табл. 2).

Таблица 1

Клинические характеристики пациентов исследуемых групп

Клинический параметр	Группа 1	Группа 2
Возраст пациенток, годы	38,6 ± 0,3	39,1 ± 0,4
Продолжительность бесплодия, годы	11,2 ± 0,4	13,3 ± 0,8
АМГ, нг/мл	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1
Суммарная доза ФСГ, МЕ	3220 ± 575	3120 ± 687

Таблица 2

Эмбриологические характеристики исследуемых групп

Клинический параметр	Группа 1	Группа 2
Количество ооцитов	2,8 ± 0,8	2,7 ± 0,8
Частота оплодотворения	2,3±0,9	2,5±0,7
Количество бластоцист	1,57±0,5	1,62±0,7
Частота выживания после витрификации	-	98
Частота наступления беременности (%)	27,3	42,4*
Уровень чХГ на 12 день после ЭТ (мМЕ/мл)	259,4±56,2	394±46,6*

Примечание: * □ статистически значимо по сравнению с показателями группы 1, *p* □ 0,05.

Частота виживання бластоцист после криоконсервирования методом витрификации составила 98%. Частота наступления беременности после переноса одного эмбриона составила 27,3% в группе 1 и 42,4% в группе 2. Отмечали значимые отличия в уровне чХГ на 12 день после переноса эмбрионов. Это говорит о высокой клинической эффективности технологии витрификации эмбрионов с последующим их переносом в полость матки в подготовленных циклах.

У женщин с высоким овариальным резервом перенос единственного селективно отобранного эмбриона позволяет получить высокие показатели наступления беременности, как в индуцированном цикле, так и после криопереноса [10].

Увеличение частоты наступления беременности в «freeze-all» циклах, по сравнению с циклами с переносом эмбрионов у хороших ответчиков продемонстрировано во многих исследованиях [15]. По данным одних авторов, политика «freeze-all» является результативной и экономически эффективной стратегией по сравнению с переносом свежих эмбрионов [11]. По данным других исследователей □ эта стратегия не улучшает частоту наступления беременности по сравнению со стимулированными циклами [14]. У пациенток с низким овариальным резервом удается получить единичные эмбрионы хорошего качества [3]. Это может быть связано с качеством аспирированных ооцитов [2]. Ранее было показано, что перенос одного эмбриона у пациентов с низким уровнем АМГ не позволяет получить высокие показатели частоты наступления беременности, поэтому тактика замораживания всех эмбрионов для переноса их в последующих циклах является предпочтительной [8].

Важным условием эффективности тактики «freeze-all» у пациенток со сниженным овариальным резервом является выбор способа криоконсервирования, позволяющего обеспечить высокие морфофункциональные характеристики замороженно-отогретых эмбрионов [16].

ВЫВОДЫ

В циклах лечения бесплодия методами ВРТ у пациенток с низким овариальным резервом тактика криоконсервирования полученных эмбрионов и перенос их в последующем подготовленном цикле является предпочтительной, поскольку позволяет увеличить частоту наступления беременности в 1,5 раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петрушко М.П. Использование криоконсервированных эмбрионов человека во вспомогательных репродуктивных технологиях // Проблемы криобиологии. 2000.10(1):71□76.
2. Петрушко М.П. Сучасний стан проблеми криоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів людини. Вісн. НАН України. 2017. 7: 44□53. doi: doi.org/10.15407/visn2017.07.044
3. Петрушко М.П., Пиняев В.И., Правдина С.С., Подуфалий В.В., Чуб Н.Н. Монозиготная моноамниотическая тройня после переноса одной бластоцисты. Описание случая. Проблемы репродукции. 2013; 3: 47□48.
4. Atkinson P, Koch J, Ledger WL. GnRH agonist trigger and a freeze-all strategy to prevent ovarian hyperstimulation syndrome: a retrospective study of OHSS risk and pregnancy rates. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2014;54(6):581□5. doi: 10.1111/ajo.12277.
5. Ebner T., Yaman C., Moser M. et al. A prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of injection technique and morphological features. J Assist Reprod Genet. 2001;18(12):623□8. PMID:11808841.
6. Groenewoud E.R., Cohlen B.J., Al-Oraiby A. et al. A randomized controlled, non-inferiority trial of modified natural versus artificial cycle for cryo-thawed embryo transfer. Hum Reprod. 2016;31(7):1483□92. doi: 10.1093/humrep/dew120.
7. Kansal K. S, Ratcliffe S.J., Milman L. et al. Perinatal morbidity after in vitro fertilization is lower with frozen embryo transfer. Fertil Steril. 2011;95(2):548□53. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.05.049.
8. Kuroda K, Ezoe K., Kato K. et al. Infertility treatment strategy involving combined freeze-all embryos and single vitrified-warmed embryo transfer during hormonal replacement cycle for *in vitro* fertilization of women with hypogonadotropic hypogonadism. J Obstet Gynaecol Res. 2018; 44(5):922□928. doi: 10.1111/jog.13597
9. Kuwayama M., Vajta G., Kato O. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod. Biomed. Online 2005; 11(3): 300□8. PMID:16176668.
10. Martin A.S., Chang J., Zhang Y. et al. States Monitoring Assisted Reproductive Technology (SMART) Collaborative. Perinatal outcomes among singletons after assisted reproductive technology with single-embryo or double-embryo transfer versus no assisted reproductive technology. Fertil Steril. 2017; 107(4):954□960. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.01.024.

11. Roque M., Roque M., Valle M., Guimarães F. et al. Cost-Effectiveness of the Freeze-All Policy. *JBRA Assisted Reproduction*. 2015; 19(3): 125–130. doi: 10.5935/1518-0557.20150028.
12. Shapiro B.S., Daneshmand S.T., Garner F.C. et al. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil.Steril*. 2011; 96:344–8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.050.
13. Venetis C.A., Kolibianakis E.M., Bosdou J.K. et al. Progesterone elevation and probability of pregnancy after IVF: a systematic review and meta-analysis of over 60 000 cycles. *Hum.Reprod. Update*. 2013;19(5):433–57. doi: 10.1093/humupd/dmt014.
14. Vuong L.T., Dang V.Q., Ho T.M. Freeze-all versus fresh embryo transfer in IVF/ICSI, a randomised controlled trial. *Fertil.Steril*. 2016; 106(3): 376. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.006>
15. Wu M.Y., Chung C.H., Pan S.P. et al. Advantages of cumulative pregnancy outcomes in freeze-all strategy in high responders - A case-control matching analysis of a large cohort. *J Formos. Med. Assoc.* 2018; 117(8):676–684. doi: 10.1016/j.jfma.2018.05.011.
16. Yurchuk T., Petrushko M., Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine - Embryos and oocytes as exemplars. *Early Hum Dev*. 2018; 126:6–9. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016.

В.І. Пиняев, М.П. Петрушко, Т.О. Юрчук

ПІДВИЩЕННЯ ЧАСТОТИ НАСТАННЯ ВАГІТНОСТІ В ЦИКЛАХ ЛІКУВАННЯ БЕЗПЛІДДЯ ПАЦІЄНТОК З НИЗЬКИМ ОВАРІАЛЬНИМ РЕЗЕРВОМ: ТАКТИКА “FREEZE ALL”

Анотація. Жінки з низьким оваріальним резервом складають групу пацієнтів допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), яка характеризується невисокою частотою настання вагітності при проведенні стандартного протоколу лікування. Одним із шляхів збільшення частоти настання вагітності у цієї групи пацієнток може бути тактика криоконсервування всіх ембріонів «freeze all», отриманих після запліднення ооцитів в циклах індукції суперовуляції, з їх подальшим перенесенням в порожнину матки в підготовлених циклах. Мета роботи - порівняння частоти настання вагітності у жінок з низьким оваріальним резервом в стимульованих і підготовлених криоциклах лікування безпліддя методами ДРТ. Результати дослідження показали високу клінічну ефективність підвищення частоти настання вагітності при використанні технології криоконсервування ембріонів з подальшим їх перенесенням в порожнину матки в підготовлених циклах у пацієнток з низьким оваріальним резервом.

Ключові слова: криоконсервування, вітрифікація, ембріони, частота настання вагітності.

V.I. Piniayev, M.P. Petrushko, T.O. Yurchuk

INCREASING OF PREGNANCY RATE IN INFERTILITY TREATMENT CYCLES FOR PATIENTS WITH LOW OVARIAN RESERVE: THE “FREEZE ALL”

Abstract. Women with a low ovarian reserve constitute a group of patients of assisted reproductive technology (ART), which is characterized by a low pregnancy rate with a standard treatment protocol. One of the ways to increase the pregnancy rate in this group of patients may be “freeze all” tactic (cryopreservation of all embryos obtained after fertilization of oocytes in superovulation induction cycles) with their subsequent transfer into the uterus in prepared cycles. The aim of the work is to compare the pregnancy rates of women with low ovarian reserve in stimulated and prepared cryocycles of infertility treatment using ART methods. The results of the study showed a high clinical efficacy of pregnancy rate increasing using the technology of cryopreservation of embryos with their subsequent transfer to the uterine cavity in the prepared cycles in patients with low ovarian reserve.

Key words: cryopreservation, vitrification, embryos, pregnancy rate.

Надійшло до редакції 28.02.2019 р.
Підписано до друку 17.05.2019 р.