

МРНТИ 76.29.48

УДК 618.11-008.64-02-092-06:618.177-08:618.17-089.888.11

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ УЛУЧШЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ ПРОТОКОЛОВ ВРТ У ПАЦИЕНТОК СО СНИЖЕННЫМ РЕПРОДУКТИВНЫМ ПРОГНОЗОМ

Г. Стрелко, Б. Айдин, В. Уланова, О. Малюта, Т. Песчаная, Н. Короткевич, М. Коробко

Медицинский центр «Айвимед»  
Украина, Киев

### АННОТАЦИЯ

#### ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение возможностей улучшения результативности протоколов ВРТ у пациенток со сниженным репродуктивным прогнозом путем применения Са ионофора в работе с ооцитами пациентов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено исследование эффективности методики активации ооцитов в протоколах ЭКО- ICSI у пациенток после как минимум одной неудачной попытки ВРТ. Протоколы КСО были идентичными в исследуемой и контрольной группах. Результативность оценивалась исходя из эмбриологических (частота оплодотворения, дробления эмбрионов, процент бластуляции) и клинических показателей (частота наступления беременности).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Применение кальция ионофора в момент проведения процедуры ICSI позволяет улучшить процент оплодотворения ооцитов, процент дробления, процент бластуляции. Это, в свою очередь, позволило повысить частоту наступления беременности в программах ЭКО- ICSI.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Улучшение эмбриологических показателей позволило существенно улучшить результаты по частоте наступления беременности у женщин старшего репродуктивного возраста со сниженным прогнозом по наступлению беременности.

*Ключевые слова:* контролируемая стимуляция яичников, корифоллитропин-альфа, Са ионофор, ЭКО, ICSI.

В последние десятилетия ситуация с фертильностью людей во всем мире существенно изменяется, она отличается в различных регионах, странах, религиозных общинах, глобальная тенденция – это снижение рождаемости. Так, по данным World Fertility Pattern, 2015, общемировое среднее количество детей на 1 женщину составляет 2,5. Надо отметить, что для Восточной Европы, и для Украины, характерные значительно более низкие показатели – в пределах 1,6 - 1,7. Именно потому проблема бесплодного брака сегодня является актуальной как никогда.

Известно, что наиболее эффективным методом лечения бесплодия является экстракорпоральное оплодотворение. Успех процедуры зависит от множества факторов, среди которых возраст женщины, определяющий качество ооцитов, количество яйцеклеток, качество сперматозоидов. Большое значение имеют также квалификация эмбриологов и условия культивирования эмбрионов. В соответствии со стандартами работы IVF лаборатории, число успешных случаев оплодотворения должно составлять не менее 70%. В большинстве случаев, оплодотворение осуществляют путем введения одиночного сперматозоида в цитоплазму ооцита (ICSI), при этом число успешных случаев оплодотворения должен со-

ставлять не менее 80-85% [1]. Все еще есть случаи полного отсутствия оплодотворения (в 1-3% всех циклов) или уменьшение их количества (число оплодотворившихся ооцитов составляет менее 50%). При этом существенно уменьшаются шансы на получение эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, что может привести к безрезультативному циклу и повторяться в течение последующих циклов резервом [2,3]. Уменьшение случаев оплодотворения или его отсутствие может быть связано с недостаточностью активации ооцитов [3, 4, 5]. Причиной недостаточности активации ооцита после оплодотворения могут быть: нарушение деконденсации хроматина головки сперматозоида, преждевременная конденсация хроматина сперматозоидов, дефекты веретена или дефекты спермы и неправильная техника инъекции сперматозоида [6]. Кроме того, неудача оплодотворения может быть вызвана низкой жизнеспособностью, плохой подвижностью и морфологией (тератозооспермия, в особенности, глобозооспермия) сперматозоидов [7,8,9].

Основным регуляторным механизмом активации ооцитов млекопитающих является повышение концентрации ионов кальция в ооплазме в результате слияния мембраны головки сперматозоида с оолеймой. Такая последовательность событий характерна для классическо-

го ЭКО, в то время как при ICSI внутрицитоплазматическое повышение концентрации кальция происходит непосредственно во время инъекции сперматозоида в цитоплазму ооцита. Источником кальция при этом выступает культуральная [10]. Данный механизм является триггером процесса оплодотворения. Дальнейшие колебания внутрицитоплазматической концентрации кальция являются результатом высвобождения из головки сперматозоида фосфолипазы С дзета (PLCz) в ооплазму и играют ключевую роль в дальнейшем развитии эмбриона [11,12].

Следует отметить, что вышеописанный механизм активации реализуется при условии окончательного созревания ооцитов, результатом которого является зрелость ооплазмы – способность генерировать колебания кальция. Зрелость цитоплазмы ооцита является ключевым фактором для успешного оплодотворения [13]. Таким образом, при оплодотворении активация ооцита реализуется благодаря его способности генерировать колебания внутрицитоплазматического кальция в ответ на PLCz сперматозоида [14].

На данный момент существует несколько описанных в литературе подходов для искусственной стимуляции повышения концентрации кальция в ооплазме, среди которых механические, электрические и химические стимулы. [15, 16, 17]. В данном исследовании в качестве химического стимула мы использовали ионофор кальция – кальцимицин (A23187), механизм действия которого заключается в способности встраиваться в мембрану ооцита, позволяя ионам кальция проникать в ооплазму по градиенту концентрации.

Таким образом, учитывая роль Ca в процессах оплодотворения и развития эмбриона, основной целью данного исследования был сравнительный анализ результативности программ ЭКО у пациентов с одним и более неудачным протоколом в анамнезе при использовании ионофра кальция с их первоначальными результатами. Анализировались такие показатели как количество ооцитов, степень их зрелости, число случаев оплодотворения и дробления, число эмбрионов с наличием фрагментации, число случаев выхода blastocyst и частота наступления беременности.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной цели было проспективно обследовано 45 женщин, страдающих бесплодием. Показаниями к включению женщин в исследование были неудачные протоколы в анамнезе. Из исследования были

исключены женщины с аномальным кариотипом, острыми воспалительными заболеваниями любой локализации на начало лечебной программы ВРТ, врожденными пороками развития или приобретенными деформациями полости матки, при которых невозможна имплантация эмбриона (ов) и вынашивание беременности, доброкачественными опухолями матки, которые деформируют полость матки и (или) требуют оперативного лечения, злокачественными новообразованиями любой локализации.

Обследование пациенток проводили руководствуясь специально разработанной анкетой. Оно включало детальный сбор анамнестических данных, оценку состояния менструальной и репродуктивной функции, гинекологического и соматического статуса. Прогнозирование ответа яичников на стимуляцию проводили путем определения овариального резерва, а именно с помощью оценки сонографических и эндокринных показателей на 2-й или 3-й день спонтанного менструального цикла до начала контролируемой стимуляции яичников. Ультразвуковое сканирование проводили на аппаратах PHILIPS ATL-HDI 4000, PHILIPS HD 11-XE. В процессе стимуляции суперовуляции проводили ультразвуковой мониторинг для динамической оценки роста и созревания фолликулов в яичниках (функционально зрелый фолликул размерами 18-20 мм), прироста эндометрия. Ультразвуковую диагностику беременности выполняли на 21 день после переноса эмбриона, кроме того проводился контроль сердцебиения на сроке 6-7 недель.

Для контролируемой стимуляции яичников использовали новый гормональный препарат для лечения бесплодия - Кориголитропин альфа. Он относится к новому классу рекомбинантных гонадотропинов пролонгированного действия. Особенность этой молекулы - вдвое больший период полувыведения по сравнению со стандартным рекомбинантным ФСГ. Это свойство позволяет инициировать и поддерживать мультифолликулярный рост в течение 7 дней после однократной подкожной инъекции. Согласно данным литературы корифоллитропин альфа в дозе 150 мкг инициирует в среднем чуть более сильный ответ яичников по сравнению с суточной ежедневной дозой ФСГ 200 МЕ, что позволило использовать препарат с целью контролируемой стимуляции яичников при плохих ответчиках в сочетании с дополнительными дозами ФСГ и антагонистами гонадотропин-рилизинг-гормона для упрощения дизайна схемы стимуляции, минимизации количества инъекций и укорочения продолжительности стимуляции.

Таблица 1- Схема назначения корифоллитропина-альфа

Элонва, мкг	Дополнительный ФСГ, МЕ	Антагонист ГнРГ
150	200-300	Стандартно с 6-го дня стимуляции или при наличии фолликула >14 мм

Для подготовки клеток и проведения процедуры ICSI были использованы среды производства Sage, Global, Origio и Irvine Scientific. Клетки получали путем трансвагинальной аспирации фолликулов. Сбор ооцитов проводили в стерильных условиях под ламинарным шкафом при соблюдении соответствующего температурного режима (37С). Ооцит-кумулюсный комплекс помещали в среду для сбора ооцитов (Global Collect). После отмывки, оцит-кумулюсный комплекс выдерживали 1-2 часа в культивационной среде при концентрации CO<sub>2</sub> в атмосфере 6% и температуре 37% до момента денудации.

Для очистки ооцитов от клеток кумклюдса использовали гиалуронидазу (Irvine Scientific). Для предотвращения повреждения яйцеклетки использовались пипетки с соответствующим размером просвета, избегалось слишком энергичного пипетирования. После денудации, ооциты тщательно промывали, чтобы удалить остатки гиалуронидазы. Стадия зрелости ооцитов протоколировалась. Денудация проводилась через определенное время после введения триггера финального созревания (35-36 часов). Учитывая, что денудированные ооциты более чувствительны к изменениям pH, процедура ICSI производилась сразу после денудации. В качестве среды для проведения процедуры ICSI использовали среду с добавлением NEPES (Sage, "Quinn's Advantage Medium"). Оплодотворялись только ооциты на стадии МII. Морфология ооцитов оценивалась дополнительно. Гигантские ооциты или ооциты с морфологическими аномалиями полярного тела не оплодотворялись. Для оплодотворения использовали морфологически нормальные, подвижные сперматозоиды. Инъекция производилась вдали от полярного тела ооцита.

Чашки с каплями среды, содержащей ионофор кальция, готовились за 3-4 часа до начала процедуры ICSI и помещались в инкубатор для уравнивания при концентрации CO<sub>2</sub> в атмосфере 6%. Непосредственно после завершения процедуры ICSI, клетки выдерживали в среде с добавлением ионофора кальция при концентрации CO<sub>2</sub> в атмосфере 6% и температуре 37% (Gynemed, "GM508 Cult Active") на протяжении 15 минут. По окончании инкубирования клетки тщательно промывали в каплях культивационной среды (Origio, "One step") и

переносили в капли свежей культивационной среды того же производителя для дальнейшего культивирования при концентрации CO<sub>2</sub> в атмосфере 6%, кислорода 5% и температуре 37С. Через 16-18 часов проводили оценку оплодотворения исходя из наличия пронуклеусов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Средний возраст пациенток исследуемой группы составил  $38,6 \pm 3,9$  лет. Что касается индекса массы тела, то средний его показатель у исследуемых женщин составил  $22,02 \pm 2,9$  кг/м<sup>2</sup>, то есть подавляющее большинство женщин имели нормальные показатели массы тела. Учитывая, что сравнение проводилось у тех же пациенток спустя несколько месяцев, показатели среднего возраста и ИМТ не отличались в группах.

Исследование репродуктивной функции установило, что первичное бесплодие наблюдалось у 32 (71,1%) и вторичное – у 13 (28,9%). Учитывая, что повторно лечение проводилось тем же пациенткам, структура бесплодия в группах была идентичной: в 60% случаев (n=27) был найден мужской фактор бесплодия, в 57,8% – трубно-перитонеальный (n=26), в 20% – сниженный овариальный резерв (n=9), в 13,3% – бесплодие неясного генеза (n=6).

Были проанализированы: результат стимуляции, количество полученных ооцитов, дробление эмбрионов, а также показатели беременности и имплантации.

В таб. 2 представлены данные о результатах стимуляции в группах. Данные в группах идентичны, т.к. протоколы КСО проводились у одних и тех же пациенток по стандартной схеме, описанной выше.

В таб. 3 представлены данные о количестве полученных ооцитов, степени их зрелости, числу случаев оплодотворения и бластуляции после использования Ca ионофора и без его применения. Обращает на себя внимание высокая частота наступления беременности в исследуемой группе.

Таблица 2 - Сравнительная характеристика протоколов стимуляции

Показатели	Группа 1 N=45	Группа 2 Ca ионофор N=45	P
Средний возраст (лет)	$38,6 \pm 3,9$	$38,6 \pm 3,9$	P>0,05
Средний индекс массы тела (кг/м <sup>2</sup> )	$22,02 \pm 2,9$	$22,02 \pm 2,9$	P>0,05
Средний АМГ	$1,34 \pm 0,75$	$1,34 \pm 0,75$	P>0,05
Средняя длительность бесплодия	$5,77 \pm 4,21$	$5,77 \pm 4,21$	P>0,05
Средняя длительность стимуляции	$9,5 \pm 0,04$	$9,7 \pm 0,05$	P>0,05
Средняя дополнительная доза ФСГ после 7 дней стимуляции (МЕ)	$1242,86 \pm 119,35$	$1267,93 \pm 125,74$	P>0,05

Таблица 3 - Эффективность использования Са ионофора в протоколах ЭКО.

Показатели	Без применения Са ионофора	С применением Са ионофора	P
Количество ооцитов	11,0 ± 3,8	10,7 ± 4,5	P>0,05
M II	8,5±2,6	8,3±3,1	P>0,05
Оплодотворение 2pn, %	6,9±1,3 (81,3%)	7,9±1,7 (96,54%)	P>0,05
Дробление, %	6,6±1,9 (77,7%)	7,7±2,1 (92,3%)	P>0,05
Количество бластоцист, %	4,2±2,2 (49,2%)	5,9±2,1 (71,3%)	
Количество эмбрионов	1,6 ± 0,5	1,4 ± 0,7	P>0,05
Частота наступления беременности, %	0	26 57,8%	P<0,05

Результаты исследования позволяют сделать вывод о положительном влиянии использования кальция ионофора в протоколах ВРТ. Важную роль в результативности лечения играет качество ооцита и его способность к активации в момент оплодотворения. Учитывая высокий средний возраст пациенток, предыдущие неудачные протоколы ВРТ, предполагаемый прогноз наступления беременности у данной группы пациенток был достаточно низким. Существенное улучшение эмбриологических показателей, а именно, частоты оплодотворения, дробления, получения эмбрионов хорошего качества, а также частоты наступления беременности, позволяет широко рекомендовать данную методику работы с ооцитами.

### ВЫВОДЫ

1. Проведение процедуры ICSI с применением кальция ионофора позволяет увеличить вероятность оплодотворения ооцитов, число случаев дробления, число случаев бластуляции.

2. У женщин старшего репродуктивного возраста со сниженным прогнозом по наступлению беременности данная методика позволила существенно улучшить результативность циклов ВРТ.

3. Применение данной методики может быть рекомендовано в повторных попытках ЭКО и у пациенток со сниженным качеством ооцитов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Rosenwaks Z. ICSI: where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med* 2009;27:191–201.
- Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;10:2623–2629.
- Flaherty SP, Payne D, Matthews CD. Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13(Suppl. 1):155–164.
- Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Smitz J, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod* 1995; 10:2630–2636.
- Rawe VY, Olmedo SB, Nodar FN, Doncel GD, Acosta AA, Vitullo AD. Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Mol Hum Reprod* 2000;6:510–516.
- Swain JE, Pool TB. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Hum Reprod Update* 2008;14:431–446.
- Yanagida K. Complete fertilization failure in ICSI. *Hum Cell* 2004; 17:187–193.
- Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Sato A, Yanagimachi H, Yanagimachi R. Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. *Hum Reprod* 1999;14:1307–1311.
- Yanagida K, Morozumi K, Katayose H, Hayashi S, Sato A. Successful pregnancy after ICSI with strontium oocyte activation in low rates of fertilization. *Reprod Biomed Online* 2006;13:801–806.
- Tesarik J, Mendoza C, Greco E. The activity (calcium oscillator?) responsible for human oocyte activation after injection with round spermatids is associated with spermatid nuclei. *Fertil Steril* 2000; 74:1245–1247.
- Parrington J, Davis LC, Galione A, Wessel G. Flipping the switch: how a sperm activates the egg at fertilization. *Dev Dyn* 2007;236:2027–2038.
- Kashir J, Heindryckx B, Jones C, De Sutter P, Parrington J, Coward K. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Hum Reprod Update* 2010;16:690–703.
- Ajduk A, Malagocki A, Maleszewski M. Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: development of a mechanism

- responsible for sperm-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Reprod Biol* 2008;8:3–22.
14. Tesarik J, Mendoza C. In vitro fertilization by intracytoplasmic sperm injection. *Bioessays* 1999;21:791–801.
  15. Tesarik J, Rienzi L, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E. Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique to overcome sperm-borne and oocyte-borne oocyte activation failures. *Fertil Steril* 2002; 78:619–624.
  16. Borges E Jr, de Almeida Ferreira Braga DP, de Sousa Bonetti TC, Iaconelli A Jr, Franco JG Jr. Artificial oocyte activation using calcium ionophore in ICSI cycles with spermatozoa from different sources. *Reprod Biomed Online* 2009a;18:45–52.
  17. F. Vanden Meerschaut, D. Nikiforaki, S. De Gheselle, V. Dullaerts, E. Van den Abbeel, J. Gerris, B. Heindryckx, and P. De Sutter Assisted oocyte activation is not beneficial for all patients with a suspected oocyte-related activation Deficiency *Human Reproduction*, Vol.27, No.7 pp. 1977–1984, 2012.

## SUMMARY

### STUDY OF THE POSSIBILITIES OF IMPROVING THE RESULTS OF PROTOCOLS OF ART IN PATIENTS WITH POOR REPRODUCTIVE PROGNOSIS

G. Strelko, B. Aydin, V. Ulanova, O. Malyuta, T. Peschanaya, N. Korotkevich, M. Korobko

Medical Center IVMED

**Purpose of the study.** Study of the effectiveness of the use of Ca ionophore in IVF - ICSI protocols in patients with a poor reproductive prognosis.

**Materials and methods.** A study was conducted of the effectiveness of the method of oocyte activation in ECO-ICSI protocols in patients after at least one unsuccessful attempt of ART. The protocols of controlled ovarian stimulation were similar in both groups. Effectiveness was estimated on the basis of embryological ( fertilization rate, embryo cleavage, blastulation rate) and clinical indicators (pregnancy rate).

**Results.** The use of calcium ionophore at the time of the ICSI procedure allows to improve the percentage of oocyte fertilization, the percentage of cleavage, the percentage of blastulation. This, in turn, has increased the pregnancy rate in the IVF-ICSI treatment.

**Conclusion** Improvement of embryological parameters allowed to significantly improve the results of the frequency of pregnancy in women of older reproductive age with a reduced prognosis for the occurrence of pregnancy.

**Key words:** *controlled ovarian stimulation, corinollitropin-alpha, Ca ionophore, IVF, ICSI.*

## ТҮЙІНДЕМЕ

### РЕПРОДУКТИВТІ БОЛЖАМЫ ТӨМЕНДЕГЕН НАУҚАСТАРДА ҚРТ ХАТТАМАЛАРЫНЫҢ ТИІМДІЛІГІН АРТТЫРУ МҮМКІНДІКТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Г. Стрелко, Б. Айдин, В. Уланова, О. Малюта, Т. Песчаная, Н. Короткевич, М. Коробко

«Айвимед» медициналық орталығы

#### ЗЕРТТЕУДІҢ МАҚСАТЫ

Пациенттің жұмыртқа жасушаларымен жұмыс жасауда Са ионофорын қолдану арқылы репродуктивті болжамы төмендеген науқастарда ҚРТ хаттамаларының нәтижелерін жақсарту мүмкіндіктерін зерттеу.

**Түйін сөздер:** *бақыланатын аналық безді ынталандыру, кориоллитропин-альфа, Са ионофоры, ЭҚҰ, ICSI.*