

МРНТИ 76.29.48

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВИТРИФИКАЦИИ БЛАСТОЦИСТ ЧЕЛОВЕКА В ПРАКТИКЕ ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

О.В. Шурыгина, А.А. Петрова, О.В. Иванова, Т.В. Быкова, О.В. Кулакова

ФГБОУ ВО САМГМУ
Клинический госпиталь ИДК
Клиника «Мать-и-дитя»
Россия, Самара

АННОТАЦИЯ

Настоящая статья посвящена анализу собственных данных по выживаемости эмбрионов после размораживания в зависимости от стадии развития эмбриона.

Ключевые слова: криоконсервация эмбрионов, ретроспективный анализ, стадия развития эмбрионов, бластоциста.

Конфликт интересов: «Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов».

ВВЕДЕНИЕ

Успехи современной репродуктивной медицины основаны на достижениях в области искусственного оплодотворения, криобиологии и криомедицины последних нескольких десятилетий. Криоконсервация клеток, тканей и органов подразумевает под собой низкотемпературное хранение живых биологических объектов с возможностью восстановления их биологических функций после размораживания [1]. Современные методы криоконсервации позволяют сохранить потенциал гамет, эмбрионов и репродуктивных тканей (яичниковая ткань и тестикулярная ткань) человека, что представляет собой значительный практический интерес. Ряд исследовательских работ фундаментального характера, посвященных криоконсервации биологических объектов, показали разную степень их выживаемости, связанную с рядом факторов [2]. Разработка и совершенствование методов криоконсервации явилось новым этапом в развитии вспомогательных репродуктивных технологий, при этом особое внимание заслуживает возможность замораживания эмбрионов [3].

К преимуществам, которые появились благодаря разработке методов криоконсервации, можно отнести: уменьшение количества переносов свежих эмбрионов с максимальным повышением эффективности цикла ЭКО. Точно так же замораживание эмбрионов является важным методом в случаях отмены переноса эмбрионов из-за риска гиперстимуляции яичников, повышенного уровня прогестерона в сыворотке крови в день переноса, отсутствие роста эндометрия или любых других незапланированных событий. В случае криоконсервации эмбрионов, которые можно замораживать начиная со стадии зиготы, основным критерием для отбора является качество [4]. Однако наибольшую эффективность криопрограмм показала криоконсервация на стадии бластоцисты [5].

Замораживание эмбрионов отличного и хорошего ка-

чества позволяет сохранить репродуктивный потенциал для пациентов в будущем и достичь наступления беременности, используя один цикл стимуляции [6].

Витрификация как метод криоконсервации комбинирует использование высококонцентрированных растворов криопротекторов и быстрого (практически мгновенного) охлаждения путем погружения образцов непосредственно в жидкий азот. За счет этого достигается главная цель витрификации – отсутствие формирования кристаллов льда, которые могут повредить структуры клетки.

Витрификация – это физический процесс, при котором высококонцентрированные растворы криопротекторов в процессе быстрого охлаждения приобретают аморфное стекловидное состояние. Молекулярная и ионная структура, характерная для жидкой фазы, позволяет считать стекловидное состояние экстремально вязкой суперохлажденной жидкостью [5].

Основные преимущества витрификации заключаются в следующем: высокая концентрация криопротекторов и высокая скорость охлаждения/оттаивания исключают повреждение, вызванные образованием внутриклеточного льда, а также нежелательные осмотические эффекты дегидратации и регидратации вследствие внеклеточного кристаллообразования.

Основным критерием эффективности работы системы витрификации является выживаемость эмбрионов. Соответственно данным Венского консенсуса (The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators, 2017) выживаемость бластоцист (эмбрионов 5-6-х суток преимплантационного развития) составляет 90% и более [7,8].

Целью данной работы была оценка выживаемости бластоцист человека в зависимости от стадии развития и определить их имплантационный потенциал в криопротоколах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение выживаемости эмбрионов было проведено в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения на базе эмбриологических лабораторий ЗАО «Медицинская компания ИДК». Использование в научных исследованиях половых клеток и эмбрионов человека было разрешено этическим комитетом ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Эмбрионы были идентифицированы под контролем стереомикроскопа (Nicon, Япония). Для инкубации использованы инкубаторы СООК (Австралия). Для культивирования эмбрионов до 5-6-х суток эмбрионального развития были использованы среды Vitrolife (Швеция). Для витрификации эмбрионов были использованы среды Irvine Scientific (США), носители открытого CryoTop (Япония) и закрытого СтупТор (США) типов. Блastoцисты 5-6-х суток культивирования оценивали по международной классификации (D.K. Gardner et al., 1999) [9]. В основе которой лежит оценка трех основных параметров: степень экспансии (увеличения бластоцисты), выраженность внутриклеточной массы (ВКМ) и степень развития трофэктодермы (ТЭ). В ходе работы для упрощения оценки качества эмбрионов с учетом классификации Гарднера предложена и внедрена в рутинную практику лаборатории ВРТ Медицинской компании ИДК система оценки качества эмбрионов эмбрионов (таблица 1).

Таблица 1 - Система оценки качества эмбрионов 5-6-х суток развития

Оценка качества эмбриона	Стадия развития (D.K. Gardner et al, 2000)
Эмбрион отличного качества	Бластоциста категории AA, AB, BA, BB, 3,4,5 степени экспансии
Эмбрион хорошего качества	Бластоциста категории BC, CB, CA, AC, 3,4,5 степени экспансии, ранняя бластоциста, начало кавитации без вакуолей и фрагментации

Эмбрион удовлетворительного качества	Бластоциста категории CC, 3,4,5 степени экспансии, ранняя бластоциста, начало кавитации с вакуолями или фрагментацией
Эмбрион посредственного качества	Морула, начало кавитации с вакуолями и фрагментацией

Морфологическую оценку жизнеспособности эмбрионов на стадии бластоцисты оценивали через 1-2 часа после размораживания, это время необходимо для восстановления бластоцисты. Если эмбрион имеет более 50% неповрежденных клеток, то он считается жизнеспособным.

Статистическую обработку данных выполняли на компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета статистических программ «Statistica V 10» (США), SPSS Statistics 22 (США) и «SAS V8».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего было проанализировано 1406 эмбрионов на разных стадиях развития. Проведенный анализ зависимости выживаемости эмбрионов от стадии развития показал, что диапазон выживаемости эмбрионов в разных группах составил от 75 до 100%. Суммарные данные представлены в виде Таблицы 2. Следует отметить, что самый низкий уровень выживаемости демонстрируют эмбрионы 6 степени экспансии, а именно вылупившиеся бластоцисты, при этом в более многочисленных группах (более 100 случаев) выживаемость составила более 95%, что свидетельствует о высокой степени криотолерантности эмбрионов отличного и хорошего качества. Низкие, по сравнению с другими группами, показатели выживаемости у эмбрионов со степенью экспансии 6, возможно, связаны с отсутствием у этих эмбрионов оболочки оплодотворения и цитотоксичным влиянием криопротекторов на клетки трофэктодермы. Количество эмбрионов в этой группе крайне мало, чтобы сделать какие-либо однозначные выводы по данному поводу.

Таблица 2 - Выживаемость эмбрионов в зависимости от стадии развития эмбрионов

	Стадия развития эмбриона	Степень развития ВКМ	Степень развития трофэктодермы	Количество эмбрионов	Выживаемость, %
1	0.морула	<NA>	<NA>	5	100.00
2	1.нач.кав	<NA>	<NA>	156	90.33
3	2.ран.бласт	A.вкм1	A.тэ1	1	100.00
4	2.ран.бласт	<NA>	<NA>	187	90.00
5	3.бласт	A.вкм1	A.тэ1	41	100.00
6	3.бласт	A.вкм1	B.тэ1	109	95.51
7	3.бласт	A.вкм1	C.тэ1	3	100.00
8	3.бласт	B.вкм1	A.тэ1	8	100.00

9	3.бласт	В.вкм1	В.тэ1	141	89.33
10	3.бласт	В.вкм1	С.тэ1	27	92.16
11	3.бласт	С.вкм1	С.тэ1	2	100.00
12	3.бласт	<NA>	<NA>	1	NA
13	4.бласт	А.вкм1	А.тэ1	193	96.96
14	4.бласт	А.вкм1	В.тэ1	168	97.90
15	4.бласт	А.вкм1	С.тэ1	1	100.00
16	4.бласт	А.вкм1	<NA>	1	100.00
17	4.бласт	В.вкм1	А.тэ1	21	100.00
18	4.бласт	В.вкм1	В.тэ1	107	97.21
19	4.бласт	В.вкм1	С.тэ1	13	100.00
20	4.бласт	С.вкм1	В.тэ1	1	100.00
21	4.бласт	С.вкм1	С.тэ1	1	100.00
22	4.бласт	<NA>	<NA>	1	100.00
23	5.бласт	А.вкм1	А.тэ1	43	96.43
24	5.бласт	А.вкм1	В.тэ1	15	100.00
25	5.бласт	В.вкм1	А.тэ1	7	100.00
26	5.бласт	В.вкм1	В.тэ1	8	81.82
27	6.бласт	А.вкм1	А.тэ1	5	100.00
28	6.бласт	А.вкм1	В.тэ1	4	75.00
29	6.бласт	В.вкм1	В.тэ1	3	100.00
30	<NA>	<NA>	<NA>	133	37.68
31	Итого			1406	94.49

Был проведен детальный анализ зависимости частоты наступления беременности от стадии замороженной бластоцисты (степени экспансии, выраженности внутриклеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЭ)).

Относительно такого признака, как степень экспансии, было показано, что показатели частоты наступления беременности (ЧНБ) – положительное УЗИ – возрастают с увеличением степени экспансии от стадии начала кавитации бластоцисты до увеличенной бластоцисты (степень экспансии 4), достигая максимума у вылупленных бластоцист, лишенных оболочки оплодотворения.

Подобная тенденция является вполне закономерной: эмбрион с более высоким уровнем организации и клеточной дифференцировкой дает более высокие показатели ЧНБ. Однако, обращает на себя внимание снижение показателей в группе бластоцист со степенью экспансии 5, это эмбрионы, которые находились при замораживании в состоянии хетчинга (вылупления). По всей вероятности, эмбрионы данной стадии развития являются наиболее уязвимыми к воздействию процедуры замораживания. Результаты зависимости ЧНБ от степени развития замороженных эмбрионов представлена в Таблице 3.

Таблица 3 -

Распределение положительных (да) и отрицательных (нет) УЗИ по стадиям развития.				
		УЗИ		
о.ст.1		да	нет	Общее число
0.морула	N	1	4	5
	% стр.	20.0%	80.0%	
1.нач.кав	N	33	122	155
	% стр.	21.3%	78.7%	
2.ран.бласт	N	61	127	188
	% стр.	32.4%	67.6%	
3.бласт	N	147	182	329
	% стр.	44.7%	55.3%	
4.бласт	N	251	255	506
	% стр.	49.6%	50.4%	

5.бласт	N	27	45	72
	% стр.	37.5%	62.5%	
6.бласт	N	8	4	12
	% стр.	66.7%	33.3%	
Общее число	N	528	739	1267
	% стр.	41.7%	58.3%	

Различие в доле положительных УЗИ значимо различалось между стадиями ($p < 0.01$), т.е. % положительных УЗИ рос от морулы (20.0%) до 6.бласт(66,7%) с небольшим «провалом» на стадии экспандированных (5) бластоцист (37,5%).

Проводя сравнительный анализ по следующему признаку – степени развития ВКМ, мы получили ожидаемые результаты: чем выше степень компактизации клеток в ВКМ, тем более высокие показатели ЧНБ. У бластоцист с ВКМ А (581 эмбрион) показатель ЧНБ составил 51,3%,

у бластоцист с ВКМ В (334 эмбриона) – 39,8%. Различия значимы при уровне $p=0,004$. Результаты анализа представлены в Таблице 4.

Следует обратить внимание, что в группе бластоцист с внутриклеточной массой С (клеток крайне мало или она отсутствует), мы получили 50% ЧНБ. Этот показатель вряд ли можно признать объективным вследствие крайне малочисленной группы (4 эмбриона), поскольку эмбрионы с подобной морфологией, как правило, не подлежат замораживанию.

Таблица 4 -

Распределение положительных (да) и отрицательных (нет) УЗИ по ВКМ.				
		УЗИ		
о.вкм.1		да	нет	Общее число
А	N	298	283	581
	% стр.	51.3%	48.7%	
В	N	133	201	334
	% стр.	39.8%	60.2%	
С	N	2	2	4
	% стр.	50.0%	50.0%	
Общее число	N	433	486	919
	% стр.	47.1%	52.9%	

Выраженность трофэктодермы, степень развития которой является наиболее значимой в процессе имплантации, напрямую коррелирует с данными ЧНБ.

При анализе 918 эмбрионов (таблица 5) мы получили, что бластоцисты с трофэктодермой класса А (318) дают

наиболее показатели – 57,5% ЧНБ, бластоцисты с трофэктодермой класса В (553) – 42,9% ЧНБ, с трофэктодермой класса С – 27,7% ЧНБ. Эти различия достоверны при уровне значимости $p < 0,01$.

Таблица 5 -

Распределение положительных (да) и отрицательных (нет) УЗИ по ТЭ.				
		УЗИ		
о.тэ.1		да	нет	Общее число
А	N	183	135	318
	% стр.	57.5%	42.5%	
В	N	237	316	553
	% стр.	42.9%	57.1%	
С	N	13	34	47
	% стр.	27.7%	72.3%	
Общее число	N	433	485	918
	% стр.	47.2%	52.8%	

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, проводя сравнительный статистический анализ, было выявлено влияние всех компонентов оценки blastocyst – стадии, степени развития ВКМ и выраженности трофэктодермы на степень выживаемости и уровень частоты наступления беременности. Эмбрионы с наиболее высоким уровнем развития внутриклеточной массы А и трофэктодермы А дают наиболее высокие результаты. Неожиданными получены результаты по ЧНБ в группе эмбрионов с внутриклеточной массой С (50%), вряд ли их можно считать закономерными с учетом малого количества случаев (4). Степень экспансии blastocyst также показывает прямую связь с ЧНБ, исключением являются blastocyst 5 стадии преимплантационного развития (blastocyst с хетчингом). По своей вероятности, этот энергетически активный процесс для эмбриона (когда эмбрион экспандирует через определенные промежутки времени) крайне важен. Эмбрион пытается найти наиболее благоприятное место для разрыва оболочки оплодотворения и выхода из нее. По сути, эта стадия развития является своеобразным критиче-

ским периодом развития для эмбриона. Соответственно, в этот момент, он представляется наиболее уязвимым для воздействия внутренних и внешних факторов. Витрификация определенным образом в этот момент и является тем самым внешним фактором, который определяет более низкие показатели ЧНБ у эмбрионов данной стадии развития.

ВЫВОДЫ

1. Морфологическая оценка эмбрионов является определяющей в успехе их витрификации
2. Степень экспансии, выраженность внутриклеточной массы и степень развития трофэктодермы эмбрионов человека влияют на уровень выживаемости и частоту наступления беременности
3. Витрификация эмбрионов может быть использована для резервации их биологической компетенции и применяться как эффективный инструмент для сохранения их репродуктивного потенциала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mazur P. Science. 1970; 168: 939-949.
2. Cobo A., García-Velasco J.A., Coello A., Domingo J., Pellicer A, Remohí J. Fertil Steril. 2016; 105(3): 755-764
3. Pegg D.E. Semin. Reprod. Med. 2002; 20 (1): 5-13.
4. Pegg D., Kleinhans F. Cryobiology 2016; 72(2): 83-85.
5. Mukaida, T., Oka C. Best Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol. 2012; 26 (6): 789-803.
6. Roque M. J. Assist Reprod Genet. 2015; 32: 171-176.
7. Sciorio R. Thong K.J., Pickering S.J. Cryobiology. 2018; 84: 40-45.
8. Kuwayama M. Theriogenology. 2007; 67(1):73–80.
9. Gardner D.K., Schoolcraft W.B. Toward Repr.Certainty: Fert. and Gen. Beyond. 1999; 378–388.

SUMMARY

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF VITRIFICATION OF HUMAN BLASTOCYSTS IN THE PRACTICE OF EMBRYOLOGICAL LABORATORIES

O.V. Shurygina, A.A. Petrova, O.V. Ivanova, T.V. Bykova, O.V. Kulakova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Samara State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation of Clinical Hospital IDK, Clinic “Mother and child”
Russia, Samara

This article is devoted to the analysis of own data on the survival of embryos after unfreezing, depending on the stage of embryo development.

Key words: *embryo cryopreservation, retrospective analysis, embryo developmental stage, blastocyst.*

ТҮЙІНДЕМЕ
ЭМБРИОЛОГИЯЛЫҚ ЛАБОРАТОРИЯЛАРДА АДАМ БЛАСТОЦИСТТЕРІНІҢ
ВИТРИФИКАЦИЯСЫНЫҢ ТИІМДІЛІГІНЕ РЕТРОСПЕКТИВТІ ТАЛДАУ

О.В. Шурыгина, А.А. Петрова, О.В. Иванова, Т.В. Быкова, О.В. Кулакова

ЖБМБФМ САММУ
ИДК госпитальдық ауруханасы,
«Ана мен бала» клиникасы
Ресей, Самара

Бұл мақала эмбрионның даму сатысына байланысты еріткеннен кейін эмбриондардың өмір сүруі туралы жеке деректерді талдауға арналған..

Түйін сөздер: эмбрионның криоконсервациясы, ретроспективті талдау, эмбрионның даму сатысы, бластоцист.