

ИСКУССТВЕННАЯ АКТИВАЦИЯ ООЦИТОВ – ПОЛОЖИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ НА ЛАБОРАТОРНЫЙ И КЛИНИЧЕСКИЙ ИСХОД С ВИТРИФИЦИРОВАННЫМИ ДОНОРСКИМИ ЯЙЦЕКЛЕТКАМИ

Н.П. Нигматова MMedSci*, Б.Ж. АбдильмановаMD¹, Б.Б. Калдарбекова¹, Г.Г. Арстанбаева¹,
Е. Буянжаргал¹, К.Б. КажибековMD¹, Н.М. ХоникMD¹, В.Н. ЩиголевMD, PhD².

1. Клиника репродукции человека «Геном-Астана»
Казахстан, Нур-Султан

2. Центральный офис сети «Геном»,
Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Донорство ооцитов является установленным трендом в лабораторной и клинической практике. Витрификация донорских ооцитов в целях создания криобанка – это целесообразный и эффективный процесс. В то же время, для клинической эффективности также важно количество размораживаемых донорских ооцитов, рекомендуется в среднем 10-15 яйцеклеток. В данном исследовании мы демонстрируем, что за счет использования искусственной активации можно уменьшить количество размораживаемых донорских ооцитов, соответственно, сделать программу более доступной для пациентов без вреда для лабораторных и клинических показателей.

Цель исследования: Цель исследования – улучшить качество blastocyst при использовании искусственной активации с витрифицированными донорскими ооцитами. Можно ли увеличить за счет этого шансы на наступление беременности и рождение ребенка при размораживании небольшого количества ооцитов – 6-8?

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В ретроспективное исследование были включены 40 свежих (Группа А) и 12 донорских программ с витрифицированными ооцитами (Группа Б). У всех как метод оплодотворения применено ИКСИ. В группе Б была также применена искусственная активация ооцитов методом ионофора кальция. Для вычисления статистической разницы между группами был использован Т тест Стьюдента. Значение $P < 0.05$ рассматривалось как статистически значимая разница.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основная масса рабочих blastocyst 93% (14/15) в группе Б и 72% в группе А, сформировалась на 5 сутки. Частота наступления клинической беременности (ЧНКБ) не различается между группами А и Б и составляет 52.5% и 50% соответственно. Частота пролонгированной беременности составляет 50% в группе А и 33% в группе Б. Частота имплантации незначительно выше в группе Б, 42%, по сравнению с группой А, 39%. Частота рождения детей выше в группе А (50%) по сравнению с группой Б (25%), но разница статистически не значимая.

ВЫВОДЫ

Исходя из данных нашего исследования, мы считаем, что искусственную активацию ооцитов целесообразно применять с витрифицированными донорскими ооцитами. Это позволит сократить расходы клиники, разделив клетки одного донора на несколько программ, позволит исключить синхронизацию свежего донора и реципиента для переноса эмбрионов, и позволит снизить затраты пациентов не уменьшая шансы на успех.

Ключевые слова: донация, ооциты, рабочие blastocyst, искусственная активация, ЭКО, бесплодие.

ВВЕДЕНИЕ

Донорство ооцитов является установленным трендом в лабораторной и клинической практике, его применение дает высокие результаты [1]. Распространенная форма использования свежих донорских ооцитов влечет за собой определенные минусы. Работа клиники со свежими донорами требует синхронизации донора и реципиента. Реципиенту возможно придется ждать своей очереди для использования ооцитов определенного донора, так как

выбор донора осуществляется по схожести фенотипических признаков. Дополнительно, в силу того, чтобы сохранить пациента, клиники могут стимулировать донора непрерывно, что может привести к ухудшению компетентности клеток и, следовательно, к снижению клинических результатов. Потеря репутации клиники в глазах пациента может вызвать также другой факт, отсутствие яйцеклеток у донора в момент трансвагинальной пунк-

ции, что неприемлемо для клиники. Более того, затрагивается вопрос биологической безопасности, так как рекомендуется наличие карантинного периода полученного биоматериала, независимо это мужские или женские половые клетки [2], хотя прецедент еще не встречался [1]. Указанные недостатки могут быть решены за счет витрификации донорских ооцитов в виде создания криобанка.

Криоконсервация спермы и эмбрионов уже давно подтвердила свою эффективность и стабильность, в то время как, замораживание ооцитов длительное время требовало интенсивного исследования и оптимизации процесса [1]. С созданием системы витрификации, стабильность и оптимизация протокола замораживания и результатов возросла и вывела витрификацию ооцитов на новый уровень [3, 4].

Витрификация ооцитов открывает новые горизонты: сохранение фертильности онкологических пациентов, женщин, желающих отложить материнство, отсутствие партнера на момент забора ооцитов, нормативно-правовые акты государства, регулирующие криоконсервацию эмбрионов [1].

Авторы Herrero et al. [5] делают акцент на то, что в наше время даже предпочтительнее замораживать ооциты, а не эмбрионы. Генерирование большого количества эмбрионов порождает вопросы этического характера, особенно, в странах, где эмбрион имеет статус отдельного полноценного живого существа. Также для женщины целесообразнее хранить ооциты в качестве фертильного потенциала, так как она будет иметь возможность заводить детей от своих партнеров (более чем одного).

Возвращаясь к вопросу витрификации донорских ооцитов в целях создания криобанка, это целесообразный и эффективный процесс. Проведены исследования по изучению времени хранения донорских ооцитов и влияния времени на лабораторные и клинические показатели [6]. Результаты исследования продемонстрировали, что витрификация донорских ооцитов в целях длительного хранения (шести лет) не оказывают негативного влияния на кумулятивные клинические показатели [6]. В то же время, авторы нескольких публикаций демонстрируют, что для клинической эффективности также важно количество размораживаемых донорских ооцитов, в среднем 10-15 яйцеклеток [4,6]. Но в условиях нашего государства, при наличии высокой стоимости одного ооцита, маловероятно, что основная масса популяции пациентов позволит себе выкупить 10-15 донорских витрифицированных ооцитов.

Таким образом, мы в данном исследовании демонстрируем, что применение искусственной активации ооцитов методом ионофора кальция с витрифицированными донорскими ооцитами положительно влияет на оплодотворение, развитие, наступление клинической беременности и рождения ребенка. Предположительно за счет использования искусственной активации можно уменьшить количество размораживаемых донорских ооцитов, соответственно, сделать программу с витрифицированными донорскими ооцитами более доступной для пациентов без вреда для лабораторных и клинических показателей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участники, оварийная стимуляция и подготовка эндометрия

Данное исследование представляет собой ретроспективное контролируемое исследование. Использованы данные ЭКО программ с января по декабрь 2019 года включительно. В этот период проведено 73 донорских программы: 59 свежих донорских программ, 14 донорских программ с витрифицированными ооцитами.

Донорские программы без переноса, в целях ПГТ и витрификации (AllFreeze) были исключены из данного исследования. Программы, где часть ооцитов – свежие и часть – замороженные, были исключены из исследования. Анализ данных донорских программ проведен и исключены непрофессиональные доноры (родственница, подруга, знакомая); в расчет взяты только профессиональные доноры, отобранные согласно алгоритму подбора донора, основанного на законодательной базе ВРТ в Республике Казахстан.

Таким образом, в анализ данных данного исследования включены законченные программы со свежим переносом, 52 донорские программы: 40 свежих донорских программ и 12 донорских программ с витрифицированными ооцитами.

Средний возраст профессиональных доноров в группах А и Б составил $25,9 \pm 3,2$ и $26,5 \pm 3,2$ соответственно. Группа А ($n = 40$) – группа участников со свежими донорскими ооцитами. Группа Б ($n = 12$) – группа участников с витрифицированными донорскими ооцитами. В целях контроля исследования, были проанализированы базовые параметры женских доноров в обеих группах такие как: средний возраст, индекс массы тела, продолжительность стимуляции, уровень АМГ и ФСГ на 2-3 день.

Гормональная стимуляция яичников у доноров в обеих группах не отличалась по гормональным препаратам и дозировкам и проведена следующим образом.

С 3 дня менструального цикла донорам яйцеклеток назначено 75 МЕ рекомбинантного ФСГ (Gonal-F; MerkSerono) и 150/75 МЕ рекомбинантного ФСГ и ЛГ (Pergoveris; MerkSerono). На 6-7 день стимуляции, врачи добавили 0,25 мг антагониста (Cetrotide; MerkSerono). Триггер был назначен, когда по ультразвуковому исследованию (УЗИ) визуализировались фолликулы, основная масса которых в диаметре составляла 18, 19 и 20 мм. Триггером служил 0,2 мг агонист (Diphereline; IpsenPharma). Через 36-37 часов от времени триггера проводилась трансвагинальная пункция с забором ооцитов.

Двух доноров в группе А и трех доноров в группе Б врачи стимулировали со 2 фазы менструального цикла по следующей схеме. С момента произошедшей овуляции, назначали однократно 150 мкг корифоллитропин альфа (Elonva; Organon, Netherlands). Когда основная масса фолликулов в диаметре достигала 17-18 мм по УЗИ, назначали триггер – 0,2 мг агонист (Diphereline; IpsenPharma). Через 36-37 часов от времени триггера проводилась трансвагинальная пункция с забором ооцитов. Длительность стимуляции была одинакова для классического типа и со второй фазы стимуляции.

Подготовка эндометрия реципиентов (пациенток) на свежий перенос осуществлялась следующим образом. С 21 дня менструального цикла врачи назначали 3,75 мг агонист (Diphereline; IpsenPharma). Со дня трансвагинальной пункции (0 день культивирования) было назначено прогестерон в виде 8% геля (Crinon; MerkSerono) и 400 мг гестаген (Utrogestan; BesinsHealthcare, SA). С 3 дня стимуляции врачи добавили эстрадиол в виде 0,1% геля (Divigel; OrionCo, Finland). Перенос эмбрионов проводился на 5 день культивирования пациентке. При наличии беременности и ее подтверждения по УЗИ (хотя бы одно плодное яйцо) пациентка продолжала принимать эстрогены до 6-7 недели беременности, гестагены до 12 недель.

Витрификация и размораживание

Денудация и витрификация ооцитов были выполнены через 39–42 часов от времени триггера в зависимости от загруженности лаборатории. Для витрификации донорских ооцитов была использована открытая система замораживания, метод Cryotop с минимальными модификациями (KitazatoBiopharmaCo., Japan), изначально описанный доктором Kuwayama[3]. Эквilibрация ооцитов проводилась при комнатной температуре в 3 этапа в течение 14 минут, затем они перенесены в раствор витрификации (VS) на 40-45 секунд. Через 40-45 секунд, эмбриолог переносил ооциты на носитель Криотоп и незамедлительно опускал носитель с яйцеклетками в жидкий азот. Данный этап с момента переноса яйцеклеток в раствор витрификации не превышал 60-63 секунд. На один носитель – не более трех ооцитов согласно алгоритму нашей лаборатории.

Для размораживания (Kitazato BiopharmaCo., Japan) эмбриолог опускал носитель Криотоп с ооцитами в раствор оттаивания (TS) на 60 секунд, затем перекладывал ооциты в последующие растворы согласно протоколу Китазато. Время размораживания одного носителя Криотоп составляло 10 минут.

После переноса эмбрионов, витрификация «лишних» blastocyst в обеих группах проведена согласно протоколу Китазато с минимальными модификациями.

Проведение ИКСИ, искусственной активации ооцитов методом ионофором кальция и культивирование

В ЭКО программах обеих групп был применен метод ИКСИ как метод оплодотворения в данном исследовании независимо от качества эякулята. В группе А оплодотворение методом ИКСИ проводилось через 40 часов от времени триггера. В группе Б ИКСИ после размораживания донорских ооцитов проводилось через 2-3 часа.

Более того, в группе Б использовали дополнительную методику искусственной активации ооцитов ионофором кальция. Инжектированные размороженные ооциты инкубировали в готовом рабочем растворе ионофора кальция с молярной концентрацией 10 μM в течение 5 минут. Далее проводился обычный этап культивирования.

Оценка оплодотворения проводилась на следующее утро (1 сутки) по Z шкале (Zscore) предложенной Scottetal. [7] с небольшими модификациями адаптированные в нашей лаборатории.

Зиготы культивировались в моношаговой среде SageHSA до 6 суток включительно в условиях 5,9% углекислого газа, 5,0% кислорода при 37.0oC. Оценка blastocyst была проведена согласно системе оценки Gardnerand Schoolcraft [8, 9]. Рабочие blastocyst – это blastocyst хорошего качества (3BB и выше) пригодные для проведения преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) и/или витрификации; ранние blastocyst и начало кавитации не учитывались. Частота формирования рабочих blastocyst была рассчитана от числа зигот культивировавшихся до 5 и 6 суток развития: эмбрионы, перенесенные ранее 5 суток развития, в расчет не брали.

Перенос эмбрионов.

На перенос эмбрионов использовали катетер Cook, серия Gardia, (K-JETS-7019, CookMedical) используя стандартную технику под ультразвуковым контролем. В нашей лаборатории, система оценки эмбрионов на 2-3 сутки (стадия дробления) проводится согласно испанской шкале оценки ASEBIR [10]. Эмбрион хорошего качества на 3 сутки считался эмбрион с 7–16 клетками и не более 25% фрагментации. Blastocystой считается эмбрион 5–6 суток развития с наличием внутриклеточной массы и трофэктодермы [8, 9].

Клинический итог

Отчет по клиническому итогу в следующем формате: частота имплантации – количество имплантировавшихся эмбрионов по УЗИ делить на количество перенесенных эмбрионов; биохимическая беременность – положительный бета ХГЧ на 12-14 день после переноса эмбрионов; клиническая беременность – наличие хотя бы одного плодного яйца в полости матки по УЗИ на 5-6 неделе после переноса эмбрионов; пролонгирующая клиническая беременность – развивающаяся беременность минимум в течение 12 недель (первый триместр); рождение детей – количество рожденных детей.

Статистический анализ данных

Статистический анализ данных проведен с использованием формул в XL-таблице; рассчитаны среднее значение и стандартное отклонение. Онлайн тест Колмогорова-Смирнова[11] был использован для всех лабораторных параметров для определения нормального распределения данных. Под определение «соответствие нормальному распределению» не попали следующие три параметра: группа А «уровень ФСГ на 3 день», группа А «рабочие blastocyst», группа А «количество эмбрионов на перенос». Для вычисления статистической разницы между группами был использован T тест Стьюдента [11]. Значение $P < 0.05$ рассматривалось как статистически значимая разница.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 представлены данные о базовых характеристиках доноров яйцеклеток. Базовые характеристики, такие как средний возраст донора ооцитов, индекс массы тела, уровень ФСГ на 3 день и длительность стимуляции, статистически не отличаются между группами А и Б. Количество размороженных ооцитов на программу в

группе Б, в среднем, составило $8,0 \pm 1,8$. Жизнеспособность ооцитов после размораживания составила 74%. Данные (таблица 1) наглядно демонстрируют статистически значимую разницу в количестве зрелых ооцитов на ИКСИ, оплодотворенных ооцитов, рабочих бластоцист. Не выявлена статистически значимая разница в следующих лабораторных параметрах между группами: частота оплодотворения и частота формирования рабочих

бластоцист. Более того, хочется отметить, что основная масса рабочих бластоцист 93% (14/15) в группе Б сформировалась на 5 сутки. В группе А 72% рабочих бластоцист сформировались на 5 сутки. После переноса эмбрионов в полость матки, «лишние» бластоцисты (минимум одна) подвергались витрификации: в группе Б, показатель составил 42% (5/12) программ с витрификацией рабочих бластоцист и в группе А – 83% (33/40).

Таблица 1 - Базовые характеристики доноров ооцитов и сравнительные лабораторные параметры между группами.

	Группа А	Группа Б	P-value
	Свежие донорские ооциты	Витрифицированные донорские ооциты с Cai	
	(n= 40)	(n=12)	
Средний возраст донора ооцитов	$25,9 \pm 3,2$	$26,5 \pm 3,2$	0,284
ИМТ (индекс массы тела) кг/м ²	$22,7 \pm 2,6$	$23,2 \pm 4,7$	0,315
Уровень АМГ на 3 день (мМЕ/мл)	$4,36 \pm 1,2$	$5,19 \pm 2,2$	0,02
Уровень ФСГ на 3 день (мМЕ/мл)	$9,04 \pm 3,9$	$8,5 \pm 4,2$	0,345
Длительность стимуляции (кол-во дней)	$9,7 \pm 0,9$	$9,7 \pm 0,6$	0,465
Кумулюс-ооцит комплексы (n)	$14,3 \pm 4,9$ (572)	(-)	NA
Количество метафаза II ооцитов (n)	$10,55 \pm 3,5$ (422)	(-)	NA
Количество размороженных метафаза II ооцитов (n)	(-)	$8,0 \pm 1,8$ (96)	NA
Количество ижектированных метафаза II ооцитов (n)	$10,55 \pm 3,5$ (422)	$5,91 \pm 1,5$ (71)	0,000032
Оплодотворенные ооциты (n)	$7,8 \pm 2,8$ (312)	$4,08 \pm 1,6$ (49)	0,000042
Рабочие бластоцисты (n)	$2,77 \pm 1,7$ (111)	$1,25 \pm 1,28$ (15)	0,004
Частота оплодотворения % (n)	74% (312/422)	69% (49/71)	0,337
Частота формирования рабочих бластоцист % (n)	36% (111/312)	30,6% (15/49)	0,236

* Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение;
Cai – использование искусственной активации ооцитов методом ионофора кальция;

Рабочие бластоцисты – бластоцисты 3ВВи выше по системе Gardner and Schoolcraft 1999;
Pvalue < 0,05 – статистически значимая разница;
NA – (not applicable) – неприменимо.

В таблице 2 представлены клинические данные обеих групп. Количество переносов в группе А составило 40, в группе Б – 12 переносов. Количество эмбрионов на перенос, в среднем, не отличается между группами А и Б: $1,6 \pm 0,5$ и $1,58 \pm 0,5$ соответственно. По результатам видно, что основная масса переносов составляет на 5 сутки 80% в группе А и 59% в группе Б. Частота наступления клинической беременности (ЧНКБ)

не различается между группами А и Б и составляет 52,5% и 50% соответственно. Частота пролонгированной беременности составляет 50% в группе А и 33% в группе Б. Частота имплантации незначительно выше в группе Б – 42%, по сравнению с группой А – 39%. Частота рождения детей выше в группе А (50%) по сравнению с группой Б (25%), но разница статистически не значимая.

Таблица 2 – Сравнение клинических данных между группами.

	Группа А	Группа Б	P-value
Количество переносов (n)	40	12	
Количество переносов на 3 сутки % (n)	2,5% (1)	8% (1)	NA
Количество переносов на 4 сутки % (n)	17,5% (7)	33% (4)	NA
Количество переносов на 5 сутки % (n)	80% (32)	59% (7)	NA
Количество эмбрионов на перенос (n)	1,6 ± 0,5	1,58 ± 0,5	0,157
Частота биохимической беременности % (n)	52,5% (21)	50% (6)	0,213
Частота клинической беременности % (n)	52,5% (21)	50% (6/12)	0,213
Частота пролонгирующей клинической беременности % (n)	50% (20/40)	33% (4/12)	0,226
Частота рождения детей (LBR) % (n)	50% (20/40)	25% (3/12)	0,103
Частота имплантации % (n)	39% (26/67)	42% (8/19)	0,481
Случаи синдрома гиперстимуляции яичников (n)	0	0	

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании базовые данные доноров-женщин в обеих группах таковы: средний возраст, индекс массы тела, продолжительность стимуляции, уровень ФСГ на 2 – 3 день статистически не отличаются между группами (таблица 1). Несколько доноров в обеих группах А и Б были стимулированы гормональным препаратом корифоллитропинальфа (однократно) со второй фазы стимуляции, но выделять их в отдельную группу не имело смысла. Исследования демонстрируют отсутствия отличия в лабораторных и клинических результатах в сравнении с алгоритмами многократных инъекций рекомбинантных гонадотропинов в первой фазе стимуляции [12, 13].

Наглядно видно, что использование свежих донорских ооцитов имеет статистически значимое преимущество в количестве (таблица 1). При использовании небольшого количества витрифицированных донорских ооцитов на программу в связи со стоимостью, результаты нашего исследования демонстрируют положительный лабораторный и клинический исход с использованием метода искусственной активации, учитывая, что частота оплодотворения и формирования рабочих blastocyst статистически не отличается между группами А и Б (таблица 1 и 2).

Помимо этого, основная масса blastocyst хорошего качества (ЗВВ и выше) формировалась на 5 сутки в группах со свежими и витрифицированными донорскими ооцитами, 72% и 93% соответственно. Примерно, при таком же количестве ооцитов, размораживаемых 5,62 (5,32-5,93СИ) и инжестированных 4,78 (4,54-5,03СИ), только в одном из трех европейских центров перенос эмбрионов в полость матки проводился на стадии blastocyst (на 5 сутки) и составил 36,5% от общего количества переносов [4], в то время как в нашем исследовании в группе Б, перенос на 5 сутки составил 59% (таблица 2).

Протокол витрификации яйцеклеток широко используется в мировой практике. На сегодняшний день, витри-

фикация является оптимальным решением криоконсервации ооцитов по сравнению с процессом медленного замораживания [14]. В научном обществе немало дебатов касательно использования открытой или закрытой системы витрификации в целях обеспечения безопасности биологического материала, но конкретных рекомендаций и требований по предпочтению закрытой системы витрификации нет [14,15,16].

Витрификация ооцитов уже не является экспериментальной моделью согласно данным Американского сообщества по репродуктивной медицине и Сообщества по вспомогательным репродуктивным технологиям (ВРТ). Данные демонстрируют одинаковые шансы на наличие хромосомных отклонений, врожденных пороков развития между свежими и витрифицированными ооцитами [17]. Протокол витрификации ооцитов позволил имплементировать в практику ВРТ новые направления такие как замораживание донорских ооцитов для создания крио банка и сохранения фертильности пациенток.

Согласно международным публикациям, жизнеспособность донорских ооцитов в среднем составляет 90% [6], в нашем исследовании показатель ниже – 74%. Мы предполагаем, что это связано, в первую очередь, с количеством протоколов размораживания (n = 3 610) и количеством размораживаемых донорских ооцитов (n = 37 725) в клинике ИВИ Валенсия по сравнению с нашим исследованием: 12 протоколов размораживания и 96 размораживаемых ооцитов стадии М2. Чем выше цифры, тем достовернее и адекватнее статистические данные.

Частота наступления клинической беременности (ЧНКБ) не отличается между группами 52,5% и 50% (таблица 2). Частота рождения детей ниже в группе Б, но статистически незначимая разница (таблица 2) и мы не связываем это с применением искусственной активации ооцитов.

Искусственная активация яйцеклеток широко применяется в практике вспомогательных репродуктивных

технологий при тяжелом мужском факторе и весьма успешно [18,19,20]. Более того, авторы демонстрируют значительное увеличение формирования бластоцист на 5 сутки, соответственно, увеличивая клинические показатели такие как частота имплантации, частота клинической беременности и рождения детей [19]. Дефицит ионов кальция в цитоплазме во время проникновения сперматозоида в яйцеклетку приводит к нарушению активации яйцеклетки для дальнейшего оплодотворения и дробления. Пики ионов кальция разной по длине и амплитуде наблюдаются на этапах формирования пронуклеусов, первичного деления и последующего развития эмбрионов. [18,19]

В силу нашего опыта согласимся с авторами [19], что помимо увеличения количества оплодотворенных ооцитов, качества оплодотворения, улучшается выход и качество бластоцист. На начальном этапе работы с витрифицированными яйцеклетками, мы наблюдали те же признаки, что при тяжелом мужском факторе: наличие сегрегации пронуклеусов, слабое оплодотворение, слабое деление на 2-3 сутки. Наблюдения навели на мысль, что можно применить искусственную активацию к замороженным ооцитам, спекулируя тем, что возможно витрификация и/или размораживание приводят к замедленному выбросу ионов кальция или в недостаточном количестве в цитоплазму яйцеклетки во время оплодотворения. Более того, согласно авторам, применение искусственной активации методом ионофора кальция не вызывает ошибок в сегрегации хроматид во время мейоза ооцита, который завершается в момент оплодотворения [20,21]. Таким образом, мы полагаем, что использование ионофора кальция безопасно с витрифицированными ооцитами.

Возвращаясь к вопросу о целесообразности применения искусственной активации ооцитов: исходя из данных нашего исследования, мы считаем, что этот метод

позволит эффективно работать с витрифицированными донорскими ооцитами. В исследовании Cobo et al. [6] при использовании 6 ооцитов без искусственной активации, кумулятивная частота рождения детей (CLBR) составляет 6.1%, наши данные демонстрируют 25% (таблица 2). Более того, будущие кумулятивные клинические показатели по частоте клинической беременности, частоте рождения детей, будут выше в связи с тем, что «лишние» бластоцисты (минимум одна) заморожены в группе Б, 42% (5/12) программ с витрификацией рабочих бластоцист. Чтобы увеличить показатели до 40-60% по кумулятивной частоте рождения детей (CLBR) необходимо 10-15 донорских ооцитов на одну программу согласно модели прогнозирования данных ИВИ Валенсия [6]. В условиях нашей страны, это ляжет огромным финансовым грузом на плечи пациентов, так как стоимость рассчитывается на один витрифицированный донорский ооцит, а не на одну программу ЭКО. Поэтому, чтобы витрификация донорских ооцитов в виде создания криобанка выглядела ликвидно, необходимо найти пути повышения лабораторной и клинической эффективности, по возможности до уровня программ с использованием свежих донорских ооцитов. Но отметим, что применение искусственной активации ооцитов не заменяет качество, компетентность самих клеток и качество выполняемых процедур витрификации и размораживания.

Резюмируем, что при небольшом количестве витрифицированных донорских ооцитов вполне реально добиться формирования рабочих бластоцист и хороших клинических показателей с использованием искусственной активации ооцитов. Это позволит сократить расходы клиники, разделив клетки одного донора на несколько программ, позволит исключить синхронизацию свежего донора и реципиента для переноса эмбрионов, и позволит снизить затраты пациентов не уменьшая шансы на успех.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cobo A., Meseguer M., Remohi J., Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Human Reproduction*. 2010; 25(9): 2239-2246. Doi: 10.1093/humrep/deq146
2. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine and Practice Committee of Society of Assisted Reproduction Technology. 2008 guidelines for gamete and embryo donation: a practice committee report. *Fertility Sterility*. 2008; 90(5): S30-44. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.090
3. Kuwayama, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*. 2007; 67(1): 73-80. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.014
4. Rienzi L., Cobo A., Paffoni A., Scarduelli C., Capalbo A., Vajta G. et al. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Human Reproduction*. 2012; 27(6): 1606-1612. DOI: 10.1093/humrep/des088
5. Herrero L., Pareja S., Aragonés M., Cobo A., Bronet F., Garcia-Velasco J.A. Oocyte versus embryo vitrification for delayed embryo transfer: an observational study. 2014; 29: 567-572. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.016>
6. Cobo A., Garrido N., Pellicer A., Remohi, J. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertility Sterility*. 2015; 104(6): 1426-1434. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.020
7. Scott L., Alvero R., Leondires M., Miller, B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human Reproduction*. 2000; 15: 2394-2403. DOI: 10.1093/humrep/15.11.2394

8. Gardner D.K. and Schoolcraft W.B. In vitro culture of human blastocysts. In Jansen, R. and Mortimer, D. (eds). *Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond 1999*. 1999a. London: Parthenon Publishing 378–388.
9. Gardner D.K. and Schoolcraft W.B. Culture and transfer of human blastocysts. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 1999b; 11: 307–331. DOI: 10.1097/00001703-199906000-00013
10. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*. 2011; 26(6): 1270–1283. <https://doi.org/10.1093/humrep/der037>
11. Формулы для статистического анализа <https://www.socscistatistics.com/tests/kolmogorov/default.aspx>
12. Pouwer A.W., Farquhar C., Kremer J.A.M. Long-acting FSH versus daily FSH for women undergoing assisted reproduction. 2012. DOI: 10.1002/14651858.CD009577.pub2
13. Yovich J.L., Keane K.N., Borude G., Dhalival S.S., Hinchliffe P.M. Finding a place for corifollitropin within the PIVET FSH dosing algorithms. *Reproductive Biomedicine Online*. 2018; 36: 47-58. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.09.017
14. De Los Santos M.J., Apter S., Coticchio G., Debrock S., Lundin K., Plancha C.E., Prados F., Rienzi L., Verheyen G., Woodward B., Vermeulen N. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Human Reproduction*. 2015; 31(4): 685-6. doi: 10.1093/humrep/dew016. Epub 2016 Feb 17.
15. Vajta G., Rienzi L., Ubaldi, F.M. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reproductive BioMedicine Online*. 2015; 30: 325-333. Doi: 10.1016/j.rbmo.2014.12.012.
16. Cai H., Niringiyumukiza J.D., Li Y., Lai Q., Su P., Xiang, W. Open versus closed vitrification system of human oocytes and embryos: a systematic review and meta-analysis of embryologic and clinical outcomes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2018; 16 (123). Doi: 10.1186/s12958-018-0440-0.
17. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertility Sterility*. 2013; 99(1): 37-43. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.028.
18. Borges E., de Almeida Ferreira Braga D.P., de Sousa Bonetti T.C., Iaconelli A., Goncalves Franco J. Artificial oocyte activation with calcium ionophore A23187 in intracytoplasmic sperm injection cycles using surgically retrieved spermatozoa. *Fertility Sterility*. 2008; 92 (1): 131-136. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.04.046
19. Ebner T., Oppelt P., Wober M., Staples P., Mayer R.B., Sonnleitner U et al. Treatment with Ca²⁺ ionophore improves embryo development and outcome in cases with previous developmental problems: a prospective multicenter study. *Human Reproduction*. 2014. Doi: 10.1093/humrep/deu285
20. Phan V.Y., Littman E., Harris D., La A. Pregnancy after the calcium ionophore activation and aneuploid screening using A-CGH in globozoospermia patient. *Human Genetics and Embryology*. 2015. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0436.1000123>
21. Capalbo A., Ottolini C.S., Griffin D.K., Ubaldi F.M., Handyside A.H., Rienzi, L. Artificial oocyte activation with calcium ionophore does not cause a widespread increase in chromosome segregation errors in the second meiotic division of the oocyte. *Fertility Sterility*. 2016; 105(3): 807-813. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.017>

SUMMARY

ARTIFICIAL OOCYTE ACTIVATION IMPROVES THE LABORATORY AND CLINICAL OUTCOME IN VITRIFIED DONOR OOCYTE GROUP

N.P. Nigmatova MMedSci*, **B.Zh. Abdilmanova MD1**, **B.B. Kaldarbekova1**, **G.G. Arstanbaeva1**, **Y. Buyanzhargal1**, **K.B. KazhibekovMD1**, **N.M. Khonik MD1**, **V.N. ShchigolevMD, PhD2**

1. Genom-Astana Fertility Center,
Kazakhstan, Nur-Sultan,
2. Genom,
Russia, Moscow

Introduction: Oocyte donation is proved effective. Vitrification of donor eggs allows creation of donor egg banking. Simultaneously, for good clinical outcome it is recommended to thaw 10-15 oocytes at once. In the current study, we demonstrate the benefit of using artificial oocyte activation in order to reduce the number of thawed donor eggs for IVF program without any affect on laboratory and clinical outcome.

Aim of study: To improve the good quality blastocyst formation rate using artificial activation with vitrified donor eggs. Is it possible to increase the clinical pregnancy rate (CPR) and live birth rate (LBR) thawing only 6-8 donor eggs?

Materials and Methods: The retrospective cohort study included 40 fresh (Group A) and 12 vitrified (Group B) donor egg programs. ICSI was conducted to all oocytes. In Group B, we also used artificial oocyte activation with calcium ionophore. Student T test was used to infer statistical significance. P value < 0.05 was considered significant.

Results: The fertilization and good quality blastocyst formation rate is not different between the groups. The majority of usable blastocysts, 72% in Group A and 93% in Group B were formed on Day 5. The CPR is not statistically different between groups A and B and is 52.5% and 50% respectively. The IR is not statistically significant and is 39% in Group A and 42% in Group B. The LBR is higher in Group A (50%) comparing to Group B (25%), but the difference is not statistically significant.

Conclusions: Considering our data, we suggest that artificial oocyte activation is feasible for use with vitrified donor eggs. It might decrease the expenses of patients on thawing less number of donor oocytes without negative impact on the laboratory and clinical outcome.

Key words: Donation, oocytes, usable blastocysts, artificial activation, IVF, infertility.

ТҮЙІНДЕМЕ

АНАЛЫҚ ЖАСУШАЛАРДЫ ЖАСАНДЫ АКТИВАЦИЯЛАУ ӘДІСІН ВИТРИФИКАЦИЯЛАНҒАН ДОНОРЛЫҚ АНАЛЫҚ ЖАСУШАЛАРҒА ҚОЛДАНУ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ЖІНЕ КЛИНИКАЛЫҚ НӘТИЖИЕЛЕРГЕ ОҢ ӘСЕР ЕТЕДІ

Н.П. Нигматова MMedSci¹*, Б.Ж. Абдильманова MD¹, Б.Б. Калдарбекова¹, Г.Г. Арстанбаева¹, Е. Буянжаргал¹, К.Б. Кажибеков MD¹, Н.М. Хоник MD¹, В.Н. ЩигOLEV MD, PhD².

¹«Геном-Астана» Адам ұрпағын өрбіту Клиникасы
Нұр-Сұлтан, Қазақстан

²«Геном» - клиникалар желісі
Мәскеу, Ресей

Кіріспе: Аналық жасушалар донорын қолдану, зертханалық және клиникалық тәжірибеде қалыптасқан үрдіс болып табылады және жоғары нәтижелер көрсетеді. Криобанк құру мақсатында донорлық аналық жасушаларды витрификациялау мақсатқа сай өтетіндігі процесс. Сонымен қатар клиникалық көрсеткіштің жоғары болуы үшін, ерітілетін аналық жасушалардың санын маңызды, орта есеппен алғанда 10-15 аналық жасушаны бірге еріте отырып қолданған тиімді. Бұл зерттеуде біз жаңа сандық активацияны қолдану арқылы еріген донорлық аналық жасушалардың санына зайтуға болатындығын, оны зертханалық және клиникалық параметрлерге зиян келтірмей пациенттерге қолжетімді ету мүмкіндігін көрсетеміз.

Зерттеу мақсаты: Зерттеудің мақсаты - витрификацияланған донорлық аналық жасушаларға жасанды активацияны қолдана отырып, аз көлемде донорлық аналық жасушаларды қолдануға, сонымен қатар алынған бластоцисталардың сапасын жақсартуға, жүктілікпен босану мүмкіндігін арттыруға бола ма? деген сұрақтың жауабын табу болатын.

Материалдар және әдістер: Ретроспективті зерттеуге 40 жаңа алынған (А тобы) және 12 витрификацияланған донорлық аналық жасушалар (Б тобы) кірді. Олардың барлығы ұрықтандың ICSI-әдісі қолданылды. Сонымен қатар В тобында калыпты ионофор әдісі мен оциттердің жасанды активациясы қолданылды. Топтар арасындағы статистикалық айырмашылықты есептеу үшін Т-тест Стьюдент әдісі қолданылды.

Р нәтижесі < 0,05 статистикалық маңызды айырмашылық болып саналды. Нәтижелер: Эмбриондар дамуының 5-ші күні зерттеу тобындағы бластоциттердің негізгі бөлігі, В тобында 93% (14/15), ал А тобында 72% құрылды. Жүктіліктің клиникалық деңгейі (CLR) А және В топтары арасында ерекшеленбеді және сәйкесінше 52,5% және 50% құрайды. Жүктіліктің сақталуы А тобында 50%, В тобында 33% құрады. Имплантация жылдамдығы В тобында аздап В тобынан жоғары болды, В -42%, А тобымен 39%. Балалардың туу коэффициенті В тобымен (25%) салыстырғанда А тобында (50%) жоғары, бірақ айырмашылық статистикалық маңызды емес.

Қорытынды: Біздің зерттеу мәліметтеріне сүйене отырып, витрификацияланған донорлық аналық жасушаларға жасанды активация әдісін қолданғанды ұсына аламыз. Бұл бір донордың жасушаларын бірнеше бағдарламаға бөлу арқылы клиниканың шығындарына зайтады, жаңа донор мен эмбрионды ауыстыру үшін реципиенттің синхронизациясын болдырмайды және табысқа жетудің мүмкіндігін төмендетпей пациенттердің шығындарына зайтады.

Түйін сөздер: Донор, аналық жасуша, бластоциста, жасанды активация, ЭКҰ, бедеулік.