

Analyzing the effectiveness of in vitro fertilization using vitrified and native donor oocytes

Mykola Gryshchenko,¹ Andrey Lutskiy²

¹Clinic of Reproductive Medicine, Kharkov, Ukraine

²Department of Obstetrics and Gynecology, Kharkov National Medical University, Kharkov, Ukraine



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Received: 2018-10-25

Accepted: 2018-11-25

UDC: 616.1

J Clin Med Kaz 2018;4(50):30-33

Corresponding Author: Lutskiy Andrey, Department of Obstetrics and Gynecology, Kharkov National Medical University. Address: 4 Lenin boulevard, 61022. Kharkov, Ukraine

E-mail: lutsk.sv6@gmail.com

Abstract

Aim: To increase the frequency of pregnancy and delivery rate in in vitro fertilization cycles using native and vitrified donor oocytes.

Methods: Analyzing the results of in vitro fertilization in 62 patients who had oocyte donation programs. Patients were divided into 2 groups: the 1st group included 27 women who had used vitrified donor oocytes, and the 2nd group - 35 patients to whom the native oocytes of the donor were used in the in vitro fertilization cycle. The obtained oocytes were vitrified according to the standard technique using the Cryotech Vitrification kit. To prepare the endometrium for the transfer of embryos, a preparatory hormonal therapy regimen was used and the embryos were transferred in a modified menstrual cycle.

Results: Studies have shown that the application of the vitrification method in assisted reproductive technology programs allows to achieve clinical results that are not inferior and even significantly exceed the effectiveness of treatment in cycles with native donor oocytes in such parameters as clinical pregnancies, implantation rate and labor.

Conclusion: Vitrification is an effective method of cryopreservation of oocytes, which allows to preserve the functional properties of the eggs and, after their fertilization, to obtain embryos with high implantation potential.

Key words: in vitro fertilization, native and vitrified donor oocytes, oocyte survivability

ДОНОРДЫҢ НАТИВТІК ЖӘНЕ ВИТРИФИЦИРЛЕНГЕН ООЦИТТЕРІН ПАЙДАЛАНУ КЕЗІНДЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛДЫҚ ҰРЫҚТАНДЫРУ ТИІМДІЛІГІН ТАЛДАУ

Грищенко Н. Г.,¹ Луцкий А. С.²

¹Репродуктивті медицина клиникасы, Харьков, Украина

²Ұлттық медицина университеті, Акушерлік және гинекология кафедрасы, Харьков, Украина

ТҰЖЫРЫМДАМА

Мақсаты: Донордың нативті және витрифицирленген ооциттерін пайдалана отырып, экстракорпоралдық ұрықтандыру циклдарында жүктілік пен босану жиілігін арттыру.

Әдістері: 62 пациентте ооциттердің донация бағдарламалары қолданылған экстракорпоралдық ұрықтандыру нәтижелеріне талдау жүргізілді. Пациенттер 2 топқа бөлінді: 1-ге 27 әйел кірді, онда эмбрион алу үшін донордың витрифицирленген ооциттерін пайдаланған, 2 – топқа 35 пациент, олар экстракорпоралдық ұрықтандыру бағдарламасында донордың нативтік ооциттері ұрықтандырылғаннан кейін алынған эмбриондарды жатырға көшірген. Алынған ооциттердің витрификациясын Cryotech Vitrification Kit витрификациясы үшін жиынтықты қолдану арқылы әдістеме бойынша жүзеге асырды. Эндометрияны эмбриондарды тасымалдауға дайындау үшін дайындық гормоналды терапия режимін қолданды және модификацияланған етеккір циклінде эмбриондарды көшірді.

Нәтижелері: Зерттеулер қосалқы репродуктивті технологиялар бағдарламаларында витрификация әдісін қолдану имплантация жиілігі, клиникалық жүктілік және босану сияқты параметрлер бойынша донордың нативті ооциттері бар циклдарда емдеудің нәтижелерінен кем түспейтін және тіпті сенімді асып түсетін клиникалық нәтижелерге қол жеткізуге мүмкіндік беретінін көрсетті.

Қорытынды: Витрификация ооциттерді криоконсервациялаудың тиімді әдісі болып табылады, ол аналық жасушалардың функционалдық қасиеттерін сақтауға және оларды ұрықтандырылғаннан кейін жоғары имплантациялық әлеуеті бар эмбриондарды алуға мүмкіндік береді.

Негізгі сөздер: экстракорпоралды ұрықтандыру, нативті және витрифицирленген ооциттер, ооциттердің өміршеңдігі

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАТИВНЫХ И ВИТРИФИЦИРОВАННЫХ ООЦИТОВ ДОНОРА

Грищенко Н. Г.,¹ Луцкий А. С.²

¹Клиника репродуктивной медицины, Харьков, Украина

²Кафедра акушерства и гинекологии, Харьковский Национальный медицинский университет, Харьков, Украина

РЕЗЮМЕ

Цель: Повышение частоты наступления беременности и родов в циклах экстракорпорального оплодотворения с использованием нативных и витрифицированных ооцитов донора.

Методы: Проведен анализ результатов экстракорпорального оплодотворения у 62 пациенток, у которых были применены программы донорских ооцитов. Пациентки были разделены на 2 группы: в 1 вошли 27 женщин, у которых для получения эмбрионов использовали витрифицированные ооциты донора, во 2 группу – 35 пациенток, которым в программе экстракорпорального оплодотворения проводили перенос в матку эмбрионов, полученных после оплодотворения нативных ооцитов донора. Витрификацию полученных ооцитов осуществляли по методике с использованием набора для витрификации Cryotech Vitrification Kit. Для подготовки эндометрия к переносу эмбрионов применяли режим подготовительной гормональной терапии и производили перенос эмбрионов в модифицированном менструальном цикле.

Результаты: Исследования показали, что применение метода витрификации в программах вспомогательных репродуктивных технологий позволяет добиться клинических результатов, не уступающих и даже достоверно превосходящих эффективность лечения в циклах с нативными ооцитами донора по таким параметрам как частота имплантации, клинические беременности и роды.

Заключение: Витрификация является эффективным методом криоконсервации ооцитов, позволяющим сохранить функциональные свойства яйцеклеток и, после их оплодотворения, получить эмбрионы с высоким имплантационным потенциалом.

Ключевые слова: экстракорпоральное оплодотворение, нативные и витрифицированные ооциты донора, выживаемость ооцитов

Введение

В течение последних десятилетий проблема репродукции человека находится в центре внимания ученых и практических врачей всего мира. Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) и перенос эмбриона в полость матки является высокотехнологичным процессом [1]. Совершенствование программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) позволило повысить частоту имплантации и, как следствие, наступление беременности [2].

Криоконсервация (витрификация) ооцитов на сегодняшний день является важной составляющей программ ВРТ [3]. В основе метода витрификации лежит ультрабыстрая технология охлаждения, в результате которой удается избежать образования кристаллов льда, повреждающих клетку [4]. Процесс витрификации ооцитов имеет определенные особенности, которые связаны с рядом цитологических и молекулярно-биохимических особенностей. Для криоконсервации пригодны только ооциты, находящиеся на стадии метафазы II деления, которая характеризуется наличием активного аппарата веретена деления [5].

Программа применения криоконсервированных донорских ооцитов является единственной человеческой моделью для изучения взаимодействия гамет, оплодотворения, эмбрионального развития.

Донорские криоконсервированные ооциты могут быть использованы в случаях недостаточной функции яичников, у женщин с невозможностью получения собственных ооцитов в результате анатомических нарушений (после овариэктомии), после радио или химиотерапии, менопаузе, генетических заболеваниях женщины, при аномалии развития половых органов (дисгенезия гонад, синдром Шерешевского–Тернера) [6].

Донация и криоконсервация ооцитов могут быть предложены при повторных неудачах оплодотворения *in vitro*. При отсутствии оплодотворения ооцитов донора, можно предположить, что причиной неудач является сперма мужа. Донация ооцитов показана при неудачных повторных попытках с малым количеством яйцеклеток и при получении эмбрионов низкого качества [7].

Программа с донорскими яйцеклетками имеет преимущество в получении множества ооцитов у донора, который стимулирован гонадотропинами. Успех всей процедуры применения донорских ооцитов зависит от синхронизации эмбриона и эндометрия [8].

В клинике репродуктивной медицины имени академика В.И. Грищенко создан банк доноров ооцитов. Пациентам предоставляется возможность выбора донора по группе

крови и резус принадлежности, фенотипическим данным, образованию и специальности. Могут быть предложены нативные (свежие) или витрифицированные ооциты. Свежие ооциты оплодотворяют спермой мужа, полученные эмбрионы переносят в полость матки в данном цикле или консервируют, для переноса в последующие менструальные циклы. В случае с витрифицированными ооцитами, производят подготовку эндометрия. Витрифицированные ооциты размораживают, оплодотворяют и полученные эмбрионы переносят в матку реципиентки в период, соответствующий ожидаемому «окну» имплантации.

Целью данного исследования явилось повышение частоты наступления беременности и родов в циклах ЭКО с использованием нативных и витрифицированных ооцитов донора.

Материалы и методы исследования

Проведен анализ результатов ЭКО 62 пациенток, у которых были применены программы донорских ооцитов. Пациентки были разделены на 2 группы: в 1 группу вошли 27 женщин, у которых для получения эмбрионов использовали витрифицированные ооциты донора, во 2 группу – 35 пациенток, которым в программе ЭКО проводили перенос в матку эмбрионов, полученных после оплодотворения нативных ооцитов донора.

Возраст пациенток колебался от 32 до 46 лет. Пациентки исследуемых групп статистически значимо не различались по индексу массы тела ($23 \pm 2,5$) и длительности бесплодия (4 ± 2 года). Всем женщинам, включенным в исследование, были полностью разъяснены аспекты лечения и необходимого обследования. Информированное согласие получено от всех пациенток, участвующих в исследовании. В случае использования «свежих» ооцитов супружеской паре предоставляли от 5 до 10 клеток, при использовании витрифицированных – 5-6 яйцеклеток.

Контролируемую овариальную стимуляцию (КОС) и ЭКО выполняли по общепринятой методике. С 3 дня менструального цикла начинали введение рекомбинантного фоллитропин альфа в дозе 225 МЕ. Ультразвуковое исследование проводилось с помощью трансвагинального датчика на аппарате В-К MEDICAL. При УЗИ-мониторинге, когда фолликулы достигали диаметра 12-14 мм, начинали введение антагонист гонадотропин-рилизинг гормона. Через 35-36 ч. после введения триггера финального дозревания ооцитов донорам проводили трансвагинальную пункцию фолликулов с целью получения ооцитов. После аспирации фолликулов, фолликулярную жидкость передавали в эмбриологический бокс. Поиск клеток проводили под световым бинокулярным микроскопом при температуре 37С. Ооциты отмывали от фолликулярной жидкости в

буферной среде. Затем клетки находились в среде для оплодотворения в CO₂ инкубаторе не менее 2-х часов. Для очистки яйцеклеток от клеток кумулюса ооцит-кумуляус комплекс помещали в гиалуронидазу на 30 секунд, затем яйцеклетки 20 минут находились в среде для дробления. После чего начинали процедуру витрификации.

Витрификацию полученных ооцитов осуществляли с использованием набора для витрификации Cryotech Vitrification Kit [9]. Криоконсервации подвергались ооциты только хорошего качества, находящиеся на стадии метафазы II редукционного деления. Все манипуляции с ооцитами проводили в условиях ламинарного кабинета, на холодной рабочей поверхности. Из культуральной среды ооциты переносили в минимальном объеме на поверхность лунки, содержащую 300 мкл раствора ES, где инкубировались в течение 15 минут. В это время криотек маркировали информацией о доноре. После истечения времени инкубации, в минимальном объеме среды, ооциты переносили в лунку, содержащую 300 мкл раствора VS1, где инкубировались в течение 30 секунд. В процессе инкубации, с помощью пипетки, ооциты трижды изменяли местоположение, излишек среды убирался. После этого ооциты переносили в лунку, содержащую 300 мкл раствора VS2 и инкубировались в течение 30 секунд, сопровождая инкубацию помешиванием вокруг ооцитов кончиком пипетки. Далее, в минимальном объеме среды ооциты помещали на поверхность криотека возле черной метки. Затем криотек быстро погружали в контейнер с жидким азотом, где с помощью пинцета на криотек надевали защитный колпачок.

Отогрев витрифицированных донорских ооцитов проводили при комнатной температуре, на теплой поверхности в условиях ламинарного кабинета, с использованием набора для отогрева Cryotech Warming Kit. Предварительно, не менее чем за 3 часа до начала отогрева виалу со средой TS и чашку для отогрева помещали в инкубатор (температура = 37 градусов). Остальные среды для отогрева инкубировали при комнатной температуре в течение часа. Перед началом отогрева в жидком азоте с криотека снимали защитный колпачок. Далее, криотек быстро погружали в лунку чашки для отогрева, со средой TS, где инкубировали в течение 1 минуты. Объем растворов при переносе ооцитов из одной среды в другую был постоянен и не превышал 3 мм от кончика пипетки. Из среды TS ооциты переносили на дно лунки с 300 мкл раствора DS, где инкубировались в течение 3 минут. После этого ооциты переносили на дно лунки, содержащей 300 мкл раствора WS1, где инкубировались в течение 5 минут. Далее ооциты переносили на поверхность лунки, содержащую 300 мкл раствора WS2, где после опускания, ооциты снова помещали на поверхность среды. Процедуру повторяли несколько раз.

Инкубация в растворе WS2 составляла 1 минуту. Затем ооциты переносили в подготовленную и уравновешенную среду для дальнейших манипуляций. Витрифицированные ооциты были готовы для оплодотворения и получения эмбрионов. Для оплодотворения отбирали ооциты только хорошего качества.

Успешно размороженные яйцеклетки и нативные ооциты оплодотворяли методом интрацитоплазматической инъекции спермиев (ИКСИ) в 100% случаев. Оплодотворение констатировали по наличию 2 пронуклеусов. Морфологическую оценку эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, проводили согласно классификации Гарднера [10]. Количество перенесенных эмбрионов не превышало 1.

Подготовка эндометрия проводилась идентично в обеих группах. В качестве заместительной гормональной терапии использовали эстрадиола валерата со 2–3-го дня менструального цикла по 6 мг в сутки. При достижении толщины эндометрия 8 мм и более по данным УЗИ, к указанной терапии добавляли 90 мг прогестерона для влагилицного введения в виде геля и 25 мг высокоочищенного прогестерона для подкожного введения. Перенос эмбрионов хорошего качества осуществляли на 5-й день развития с помощью мягкого катетера Wallace под контролем УЗИ. В случае использования «свежих» ооцитов, менструальные циклы донора и реципиента синхронизировали приемом синтетических прогестинов.

Результаты обрабатывались с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 фирмы «StatSoft Inc.» (США) для персонального компьютера по программе в операционной среде Statistica for Windows и по прикладным программам пакета Excel, с использованием критерия t-Стьюдента.

Результаты

Было отогрето 164 витрифицированных ооцита донора. 159 клеток по морфологическим признакам признаны жизнеспособными (96,9%). 5 клеток во время размораживания дегенерировали (3,1%). Получено 384 нативных ооцитов, которые по морфологическим признакам признаны жизнеспособными.

Частота оплодотворения в обеих группах достоверно не отличалась (в 1 группе - 77,36%, а во 2 - 76,04%; $p > 0,5$). Однако частота имплантации (1 группа - 57,0%; 2- группа - 43,2%) и наступления клинической беременности в группе с витрифицированными ооцитами была выше (74,07% в 1 группе и 60% во 2-й), $p < 0,01$ (Таблица 1).

Процент своевременных родов после переноса витрифицированных ооцитов в 1 группе пациенток был достоверно выше (59,2%), чем при использовании нативных ооцитов (48,5%) во второй группе наблюдения (Таблица 1).

Таблица 1 Результативность программ с витрифицированными и нативными ооцитами донора

Параметры исследования	Витрифицированные ооциты	Нативные ооциты
Количество пациенток	27	35
Средний возраст	39.81 ± 3.63	42.08 ± 3.10
Количество яйцеклеток	159	384
Частота оплодотворения	123 (77,36%)	292 (76,04%)
Частота бластуляции	83 (67,78%)	215 (73,63%) *
Частота имплантации	57,0%	43,2% *
Частота клинической беременности	20 (74,07%)	21 (60%) *
Частота родов	16 (59,2%)	17 (48,5%)*

Примечание: достоверность отличий между исследуемыми группами * $p < 0,01$;

Обсуждение

Согласно нашим наблюдениям, применение метода витрификации позволяет улучшить клинические результаты. Высокую частоту наступления клинической беременности при использовании витрифицированных ооцитов (74,07%) можно объяснить отсутствием этапа синхронизации донора и реципиента в протоколе ЭКО. Существует мнение, что эмбрионы, полученные из витрифицированных ооцитов попадают в более подготовленный эндометрий [11].

Вариабельность показателя частоты наступления беременности в исследованиях других авторов при применении метода витрификации составляет 46–58 % [12]. В наших исследованиях также удалось повысить такой показатель эффективности программ ВРТ, как “take home baby rate”, который при применении метода витрификации составил 59,2% по сравнению с нативными ооцитами 48,5%.

Полученные результаты имеют важное практическое значение. В случае отсутствия возможности оплодотворения собственных ооцитов в данном цикле, криоконсервация ооцитов методом витрификации с последующим оплодотворением и переносом полученных эмбрионов может являться альтернативной методикой, не снижающей, а повышающей результативность программ ВРТ.

Результаты исследований подтверждают, что ооциты после витрификации сохраняют свои функциональные свойства. Витрификация дает возможность накопить собственные ооциты у пациенток с плохим ответом на контролируемую стимуляцию яичников, создать банк собственных ооцитов при риске потери овариального резерва перед предстоящим оперативным лечением, а также создать банк донорских ооцитов. Использование витрифицированных ооцитов донора исключает проблему синхронизации менструальных циклов донора и реципиента.

Список литературы

1. Kalugina A. S., Kravchuk YA. N., Shly'kova S. A., et al. Vliyanie kachestva poluchenny'h e'mbrionov na ishody' programm kriokonservacii pri sravnenii metodov medlennogo zamorajivaniya i vitrifikacii v ciklah VRT (Effect of the obtained embryos quality on the outcomes of cryopreservation programs in comparison of slow freezing and vitrification methods in ART cycles) [in Russian]. *Jurnal akusherstva i jenskih bolezney*. 2012; LXI (4): 48-53.
2. Smirnova A.A., Tur-Kaspa I. Kriokonservaciya oocitov cheloveka: klinicheskie ishody'. (Cryopreservation of human oocytes: clinical outcomes) [in Russian]. *Problemy' reprodukcii*. 2005; 1:14-8.
3. Andreeva E.A., Khonina N.A., Pasman N.M., Cherny'h E.R. Citokiny' v regulyacii ovarial'nogo follikulogeneza (Cytokines in regulation of ovarian folliculogenesis) [in Russian]. *Problemy' reprodukcii*. 2017; 1:8-14.
4. W.Wang, R.Li, M.Chang, T.Wang, C.Witz, D.Williamz, J.Griffith, J.Skorupski, J.Gill, S. Bello, G. Haddad. Efficiency comparison of eggs and embryos in a shared egg donor program. *Human reproduction*. 2014; 29(1):145.
5. Cobo A., Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011;96:277–85. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.06.030>
6. Kuwayama M. et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Hum. Reprod*. 2011; 4(1):23–8.
7. Cobo A., Kuwayama M. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril*. 2007; 89(6):1657-64. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.050>
8. Bos-Mikich A., Wood M., Candy C. et al. Cytogenetic analysis and developmental potential of vitrified oocytes. *Biol. Reprod*. 1995; 53:780-784. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.4.780>
9. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The CryoTop method. *Theriogenology*. 2007; 67:73-80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.014>
10. Gardner D. K., Vella P., Lane M., Wagley L. et al. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril*. 1998; 69: 84–8. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00438-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00438-X)
11. Maureen J. Wood. Vitrification of oocytes. *Obstetrician Gynaecologist*. 2012; 14:45–9. <https://doi.org/10.1111/j.1744-4667.2011.00078.x>
12. Thomas J. Kim, Seung Wook Hong. Successful live birth from vitrified oocytes after 5 years of cryopreservation. *Assist. Reprod. Genet*. 2011; 28:73–76. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9487-3>

How to cite this article: Mykola Gryshchenko, Andrey Lutskiy. Analyzing the effectiveness of in vitro fertilization using vitrified and native donor oocytes [in Russian]. *J Clin Med Kaz*. 2018; 4(50):30-33