

Новая философия IVF

5-7 апреля в г. Киеве состоялся международный симпозиум по вопросам репродуктивной медицины «От науки к практике», организованный Министерством здравоохранения Украины, Украинской ассоциацией репродуктивной медицины и Буковинским государственным медицинским университетом. Компания MSD выступила генеральным спонсором этого мероприятия, в рамках которого провела научный симпозиум «Новая философия IVF». Основная тема симпозиума была посвящена эмбриологии, предимплантационной диагностике эмбрионов, витрификации ооцитов, что на сегодня является одним из ключевых факторов успеха применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

О современных взглядах на тактику ведения пациентов с многократными неудачными попытками применения ВРТ рассказала научный директор клиники репродуктивной медицины «Надія», доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии Национальной медицинской академии последипломного образования им. П.Л. Шупика Ирина Александровна Судомя.



— В наше время отсутствует единое определение понятия многократных неудачных попыток применения ВРТ. Ранее под многократными неудачными попытками использования ВРТ подразумевали 2-6 программ ВРТ во время проведения которых было перенесено в сумме десять качественных эмбрионов. Однако в последнее время в связи с развитием эмбриологии и законодательным ограничением количества эмбрионов в программах IVF эти критерии подверглись пересмотру: теперь диагноз «Многократные неудачные программы ВРТ» выставляется, как правило, после 3 циклов ВРТ, а суммарное количество качественных эмбрионов ограничивается 3-6.

Накопленный мировой опыт деятельности клиник, занимающихся репродуктивной медициной, позволяет сделать следующие важные обобщения для понимания проблемы многократных неудачных попыток применения ВРТ:

— Частота беременности (ЧБ) существенно не изменяется в течение первых трех программ ВРТ и значительно уменьшается после четвертой (Templeton, Moggis, 1998).

— 1-3 из 4 женщин беременеют после четырех программ ВРТ (Sharma et al., 2002).

— Суммарная ЧБ после трех программ ВРТ для женщин до 35 лет составляет 83%; старше 35 лет с использованием более 6 яйцеклеток — 60%; менее 6 яйцеклеток — 33%.

— Женщины старше 40 лет с нормальным овариальным резервом имеют меньше шансов забеременеть, чем молодые женщины с плохим резервом.

— У женщин в возрасте 43-45 лет соотношение ЧБ/цикл составляет 6,6-9,4%, частота самопроизвольного прерывания беременности — 70%.

Учитывая вышесказанное, можно с уверенностью сказать, что успешность программ ВРТ зависит от двух факторов: эмбрионального (больше 50%) и имплантационного.

К эмбриональным факторам относятся:

- хромосомные аномалии гамет и эмбрионов;
- неоптимальные условия культивирования;
- уплотнение прозрачной оболочки яйцеклетки;

— погрешности при переносе эмбриона;

— другие факторы (мутации митохондриальной ДНК, уменьшение количества митохондрий и др.).

К имплантационным факторам относятся:

— изменения эндометрия — гиперплазия, истончение, сдвиг имплантационного окна;

— изменения матки — Т-образная, седловидная, большие миоматозные узлы, деформирующие полость матки, эндометриоз;

— иммунные изменения — ауто- и алоиммунные нарушения (антифосфолипидный синдром и др.), наследственные и приобретенные тромбофилии;

— курение, избыточная масса тела и ожирение.

постоянное наблюдение за эмбрионами с помощью эмбриоскопа.

Однако нужно отметить, что, несмотря на все перечисленные меры, этим пациенткам забеременеть бывает крайне сложно. Причиной неудач являются хромосомные аномалии, о чем свидетельствуют сообщения ведущих мировых ученых-репродуктологов. Так, по данным Razile et al. (2002), сбалансированные хромосомные поломки у пациенток с многократными ЭКО наблюдают чаще, чем в популяции — 2,5% (13/514). В связи с этим остается дискуссионным вопрос об эффективности проведения предимплантационной генетической диагностики (PGD). Хотя, по данным Gianaroli et al. (1999), Khraman et al. (2000), Pehlivan et al. (2003), PGD все-таки улучшает результативность ЭКО у



Эмбриональный фактор является определяющим и зависит от качества яйцеклеток, качества и количества сперматозоидов, качества и количества зародышей. Считается, что с большой вероятностью в категорию тех, кто прошел многократные неудачные программы ВРТ, попадут лица с эмбриональным фактором: женщины старшего возраста (40 и более лет), пациентки с пониженным яичниковым резервом (АФ, ФСГ, АМГ), пациенты с хромосомными аномалиями и тяжелым мужским бесплодием (менее 1 млн сперматозоидов в эякуляте, тератоспермия).

На базе нашей клиники разработан алгоритм ведения пациенток с многократными неудачными программами ВРТ. Алгоритм работает в двух направлениях, нацеленных на решение проблемы эмбрионального фактора. Задача первого направления — улучшение качества эмбрионов: IMSI (интрацитоплазматическая инъекция морфологически отобранных сперматозоидов), культивирование в среде с факторами роста эмбрионов GM-CSF, лазерные насечки (хэтчинг) для вылупления бластоцисты. Задача второго направления — отбор наиболее качественных эмбрионов: культивирование до бластоцисты, предимплантационная генетическая диагностика,

пациенток с многократными неудачными попытками имплантации эмбрионов.

В нашей клинике проанализировали 196 случаев ведения пациенток с многократными неудачными попытками ВРТ. Пациенток разделили на три группы. В первой группе (21 женщина) проводили CGH-предимплантационный генетический скрининг (PGC), во второй (41 женщина) — FISH-PGC, в третьей (134 женщины) — скрининг не проводили. Результаты анализа показали значительно более высокий процент беременностей у женщин первой и второй групп по сравнению с группой контроля — 40, 22, 13,4% соответственно.

Кроме того, в нашей клинике изучается эффективность специальных сред для эмбрионов с дополнительным фактором роста (GM-CSF). У нас пока нет достаточного количества собственных данных об эффективности использования таких сред, но уже сегодня мы получили бластоцисты у пациенток, эмбрионы которых раньше не достигали этой стадии развития.

Относительно имплантационных факторов многих неудачных попыток применения ВРТ необходимо отметить, что наиболее сложным в репродуктологии остается проблема рецептивности и имплантационной реконструкции

эндометрия, потому что эмбрион можно имплантировать только в течение периода так называемого узкого имплантационного окна, характеризующегося формированием пиноподий, которые представляют собой характерные выбухания апикальной части эпителиальных клеток, которые можно использовать как один из маркеров рецептивности эндометрия. По данным нашей клиники, такая редкая аномалия, как смещение имплантационного окна, наблюдается у пациенток с многократными неудачными попытками использования ВРТ.

Высокая результативность модифицированных протоколов эмбриотрансфера с использованием эмбрионов разного возраста подтверждает необходимость и важность учета особенностей формирования пиноподий у конкретной пациентки. Несмотря на неоспоримый факт существования пиноподий и их прямую связь с рецептивностью эндометрия, неопределенность ряда ключевых моментов этой проблемы мешает широкому использованию исследования пиноподий у пациентов с бесплодием.

Не менее сложной при имплантации является проблема тонкого эндометрия. Бесплодие в этом случае следует рассматривать как защитную реакцию матки на инвазию хориона. В нашей клинике для лечения такого состояния используют клеточную терапию тромбоцитами или стволовыми клетками жировой ткани.

В клинике отработаны и с успехом используются уже в течение 5 лет протоколы коррекции иммунных нарушений, которые могут мешать имплантации зародыша.

Таким образом, ведение пациентов с многократными неудачными попытками применения ВРТ требует учета как эмбрионального, так и имплантационного фактора.

Научный директор клиники Valencia — крупнейшей клиники по лечению бесплодия в Испании — Marcos Meseguer рассказал о морфокинетике эмбрионов как метода их селекции.



— Известно, что эмбрионы, полученные после оплодотворения ооцита одной и той же пациентки, часто отличаются по скорости деления и морфологическим параметрам, что в дальнейшем сказывается на их способности к имплантации в стенку матки. Считается, что максимально способны к имплантации эмбрионы с наибольшей скоростью деления, бластомеры которых имеют регулярную форму без наличия безъядерных фрагментов.

Согласно многочисленным данным ведущих мировых клиник у предимплантационных эмбрионов человека, полученных во время оплодотворения ооцитов после овариальной стимуляции, наблюдается большой процент хромосомных аномалий. В зависимости от возраста женщины, параметров спермограммы и других факторов от 40 до 80% предимплантационных эмбрионов имеют хромосомные аномалии, что является ключевой причиной использования программ IVF для снижения смертности детей, родившихся живыми.

К сожалению, нет единой приемлемой системы оценки качества зародыша.

Как правило, учитывают такие показатели: количество клеток, упорядоченность их расположения, степень фрагментации, толщина оболочек вокруг эмбриона и др., что позволяет прогнозировать вероятность развития беременности после переноса эмбриона. Однако существует множество факторов, которые при современном уровне развития науки невозможно учесть, поэтому прогнозы не всегда сбываются.

Существует огромное количество работ по анализу влияния качества перенесенных в полость матки эмбрионов на частоту их имплантации. Однако их трудно сопоставить из-за использования разных методик оценки качества.

Учитывая мировые тенденции по ограничению количества перенесенных эмбрионов в полость матки с одновременными требованиями повышения процента эффективности ВРТ, коллектив нашей клиники постоянно работает над внедрением новых критериев эмбриоскопии на предимплантационном этапе путем изучения кинетики и динамики морфологии эмбриона, а также хромосомного наполнения blastomeres.

К кинетическим характеристикам эмбриона относят время сжатия, время образования blastocyst, ее расширение и время вылулпнения, продолжительность клеточного цикла, синхронность деления. Кинетику эмбриона можно фиксировать в системе time-lapse во время деления клеток от 2 до 8 blastomeres. Динамика морфологии эмбриона – это изучение толщины прозрачной оболочки, плоскости разделения эмбриона и симметрии во время первого деления.

В нашей клинике был проведен анализ приблизительно 10 тыс. эмбрионов, в результате которого было выявлено, что большинство эмбрионов на третьи сутки утром к восьми часам делятся на восемь клеток. Деление до пяти клеток происходит за 45-50 часов. Как выяснилось, слишком высокая скорость деления эмбриона (например, с одной до трех клеток – меньше чем за 5 часов) также негативно сказывается на перспективах имплантации. Во время исследования мы выявили 7% таких эмбрионов, со способностью к имплантации – всего 1%.

При изучении особенностей деления эмбриона без внимания не осталась асимметричность этого процесса после первого деления. Необходимо отметить, что асимметрия деления и ядра почти не влияли на процессы имплантации.

Учитывая результаты проведенного анализа, мы предлагаем распределять эмбрионы на 5 категорий по динамике морфологии, бракуя эмбрионы с высокими темпами деления и слишком высокой асимметрией, и на 9 категорий по кинетическим признакам.

Кроме того, мы установили критерии качества для blastocyst, согласно которым они делятся на 8 категорий. Также мы пытались выявить взаимосвязь между хромосомным наполнением и кинетикой. Выяснилось, что среди эмбрионов, в которых происходил быстрый переход с двух на пять клеток (в норме дольше 29 часов), только 21% blastomeres имели нормальное хромосомное наполнение.

Таким образом, мы разработали принципы отбора эмбрионов с помощью системы time-lapse и PGC, предотвращающие перенос эмбрионов с аномальным количеством хромосом (числовое нарушение кариотипа, анеуплоидия).

Преимущества системы time-lapse заключаются в том, что мы получаем гораздо больше информации о состоянии эмбрионов, не нарушая при этом условия их развития, так как эмбрионы непрерывно находятся в инкубаторе. Видеомикроскопия эмбрионов в случае правильного использования алгоритма может предоставить достаточное количество маркеров для осуществления эмбриоселекции.

Научный директор Reproductive Biology Associates (г. Атланта, США) Peter Nagy представил доклад «Витрификация ооцитов и банк донорских яйцеклеток».



– Первые сообщения об успешной криоконсервации ооцитов появились еще в 1986 году, после того как мир узнал об успешном замораживании эмбриона. Вполне вероятно, что успех в криоконсервации эмбрионов, достигнутый с помощью методики умеренного замораживания, побудил к ее применению по отношению к яйцеклеткам. В то время считали, что использованный вариант криоконсервации эмбрионов и яйцеклеток получит распространение в мире, однако этого не произошло. Рассматривая публикации по этому вопросу за прошедшие 20 лет, не трудно заметить, что лишь немногие сообщения указывают на удовлетворительные результаты. В основном это отчеты о случаях с низкой эффективностью замораживания клеток.

– Первые сообщения об успешной криоконсервации ооцитов появились еще в 1986 году, после того как мир узнал об успешном замораживании эмбриона. Вполне вероятно, что успех в криоконсервации эмбрионов, достигнутый с помощью методики умеренного замораживания, побудил к ее применению по отношению к яйцеклеткам. В то время считали, что использованный вариант криоконсервации эмбрионов и яйцеклеток получит распространение в мире, однако этого не произошло. Рассматривая публикации по этому вопросу за прошедшие 20 лет, не трудно заметить, что лишь немногие сообщения указывают на удовлетворительные результаты. В основном это отчеты о случаях с низкой эффективностью замораживания клеток.



Вместе с тем надо отметить, что сегодня существует более 2 тыс. опубликованных исследований, которые позволяют говорить о достаточно высоком уровне криоконсервирования – от 50 до 90% эмбрионов выживают, а 20-50% таких эмбриотрансферов завершаются беременностью. В целом история эффективности криоконсервирования демонстрирует динамику от одной беременности на 100-150 замороженных яйцеклеток до одной беременности на пять таких клеток. Такой положительной динамики эффективности достигнуто благодаря переходу от медленного замораживания до витрификации.

Позвольте кратко напомнить эволюцию развития криоконсервирования. Известно, что вода во время замораживания превращается в лед, кристаллы которого разрушают клеточную структуру. Во избежание этого пагубного

процесса ученые сначала разработали специальные программы, при которых снижение температуры происходит постепенно по особому графику, что позволило избежать образования кристаллизации. Этот способ требует специально оборудованного и компьютерного обеспечения. Он получил название программируемого медленного замораживания. Уменьшение температуры при этом способе происходит со скоростью 0,3 градуса в минуту. Однако не совсем удовлетворительные результаты такого замораживания стимулировали эмбриологов к поиску новых методов криоконсервирования. В ходе исследований были созданы специальные растворы-криопротекторы, также препятствующие образованию льда. В этом случае замораживание может быть выполнено без оборудования со скоростью 20 тыс. градусов в минуту. Метод получил название витрификация. Криозащитная составляющая витрификации имеет две группы и состоит из проникающего и непроникающего криопротекторов, что предотвращает потерю воды в клетке. Независимо от скорости замораживания, на практике используют одинаковые криопротекторы. Ускорение темпов охлаждения достигается путем повышения их концентрации. Темпы охлаждения зависят от метода витрификации.

Таким образом, витрификацией называют метод сверхбыстрого замораживания клеток с помощью криопротекторов, обеспечивающих переход жидкости в стекловидное состояние и таким образом сохраняющих жизнеспособность клеток.

Значительным стимулом к совершенствованию методов криоконсервации яйцеклеток и внедрению витрифика-

ци должно быть направлено на безопасность заморозки, потому что яйцеклетка наиболее чувствительна из всех видов клеток, а самым чувствительным ее участком является митотическое веретено. В случае медленного замораживания ооцитов исчезают кортикальные гранулы и митотическое веретено, чего не происходит при витрификации. Существует множество научных исследований, в которых изучали разницу между медленным замораживанием и витрификацией в разные временные отрезки процесса охлаждения и при размораживании. Согласно результатам этих исследований развитие blastocyst происходит значительно успешнее в случае витрификации яйцеклетки. Также проводились исследования, во время которых сравнивали свежие ооциты с яйцеклетками после витрификации. Их результаты показали, что фертилизация и раннее развитие эмбриона были одинаковыми.

Аналогичные исследования также проводились на базе нашей клиники и банка яйцеклеток. Клиническим материалом послужили 305 циклов, для которых предусмотрено более 6 тыс. витрифицированных яйцеклеток, то есть 21 яйцеклетка на донора. Всего 646 реципиентов пользовались этим банком. Каждый донор мог обеспечить трех реципиентов.

По данным исследования выяснилось, что выживание после размораживания составило 89%, фертилизация – 86%, образования blastocyst – 63%, уровень имплантации – 42%, клиническая беременность – 56%.

Поскольку мы видим высокий уровень успешности процедуры с использованием витрифицированных ооцитов, возникает вопрос о возможности использования только одного эмбриона для переноса его в полость матки. Необходимо признать, что этот вопрос настоятельно подталкивает большинство репродуктологов, поскольку несмотря на перечисленные преимущества витрификация пока не гарантирует 100% восстановление эмбрионов после размораживания, а также к этому психологически не готовы сами врачи, по крайней мере в США.

Продолжая тему витрификации, необходимо указать на весьма интересные показатели выживаемости эмбрионов, фертильности и клинической беременности у пациенток с использованием витрифицированных эмбрионов, полученных от ранее витрифицированных ооцитов. То есть речь идет о двойной витрификации. Выяснилось, что эти показатели были незначительно ниже по сравнению с таковыми у эмбрионов, которые не подвергались витрификации.

Таким образом, мы пришли к выводу о необходимости изменения программы по замораживанию эмбрионов и яйцеклеток в пользу витрификации.

В завершение хотелось бы отметить, что витрификация пригодится в случае необходимости биопсии эмбриона. Дело в том, что биопсия эмбриона ухудшает все показатели нашей деятельности, особенно если после биопсии приходится прибегать к замораживанию, тогда как витрификация почти не ухудшает результаты работы репродуктологов в случае использования постбиопсийных эмбрионов.

Подготовила **Наталья Карпенко**

3