

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ 563 ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОТОКОЛОВ КРИОЦИКЛОВ: ВЛИЯНИЕ КОМПЕТЕНЦИИ ООЦИТОВ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА НА РЕЗУЛЬТАТЫ ВИТРИФИКАЦИИ

^{1,2}Шурыгина О.В., ¹Иванова О.В., ³Юхимец С.Н., ⁴Юлдашева С.З., ^{1,2}Русаков Д.Ю., ¹Кулакова О.В.

¹Самарский государственный медицинский университет, ²Медицинская компания ИДК, ³Медицинский университет РЕАВИЗ, Самара, Россия; ⁴Ташкентский педиатрический медицинский институт, Ташкент, Республика Узбекистан, e-mail: oks-shurygina@yandex.ru

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF 536 EMBRYOLOGICAL PROTOCOLS OF CRYOCYCLES: THE INFLUENCE OF OOCYTE COMPETENCE AND GENETIC SCREENING OF HUMAN EMBRYOS ON VITRIFICATION RESULTS

^{1,2}Shurygina OV, ¹Ivanova OV, ³Yukhimets SN, ⁴Yuldasheva SZ, ^{1,2}Rusakov DYU, ¹Kulakova OV

¹Samara State Medical University, ²IDK Medical Company, ³Private Medical University REAVIZ, Samara, Russia, ⁴Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent, Republic of Uzbekistan; e-mail: oks-shurygina@yandex.ru

Для цитирования:

Шурыгина О.В., Иванова О.В., Юхимец С.Н., Юлдашева С.З., Русаков Д.Ю., Кулакова О.В. Ретроспективный анализ 563 эмбриологических протоколов криоциклов: влияние компетенции ооцитов и генетического скрининга эмбрионов человека на результаты витрификации. Морфологические ведомости. 2020;28(1):51-56. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28\(1\):51-56](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(1):51-56)

For the citation:

Shurygina OV, Ivanova OV, Yukhimets SN, Yuldasheva SZ, Rusakov DYU, Kulakova OV. Retrospective analysis of 536 embryological protocols of cryocycles: the influence of oocyte competence and genetic screening of human embryos on vitrification results. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter. 2020;28(1):51-56. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28\(1\):51-56](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(1):51-56)

Резюме. Достижения фундаментальной науки в последнее время получили наиболее широкое распространение в области репродуктивной медицины. Биология развития человека во многом стала понятной и управляемой благодаря новым технологиям. Часть раннего эмбриогенеза человека совершенно предсказуемо воспроизводится в лабораториях вспомогательных репродуктивных технологий. Тем не менее, несмотря на все достижения, успех рождения здорового ребенка не превышает 30% от начатых циклов. Именно поэтому идет постоянный поиск новых методик, их комбинаций для достижения лучших результатов и отработки стандартных протоколов ведения пациентов с бесплодием. Целью работы является анализ целесообразности выполнения генетического скрининга эмбрионов «Next generation sequencing» (далее - NGS) и сравнительный анализ эффективности использования донорских и собственных ооцитов при переносе одного эмбриона в криоциклах. Нами проанализировано 536 криоциклов. Было выделено 4 группы пациентов с переносом одного эмбриона (SET – single embryo transfer): 1-я группа - циклы с проведением NGS тестирования, в которых для отбора на перенос были взяты эмбрионы с генетически эуплоидным статусом с использованием собственных ооцитов (n=20); 2-я группа - циклы с переносом одного эмбриона без применения NGS и использованием собственных ооцитов (n=446); 3-я группа - циклы без применения NGS, с использованием донорских ооцитов (n=8). Группы 1, 2 и 3 имели сопоставимый возраст (34,1 - 34,3 - 34,6 лет соответственно). В связи с малочисленностью 3-й группы была взята еще одна (4-я) группа наблюдения (циклы без применения NGS, с использованием донорских ооцитов, n=62), но без возрастных ограничений, в которой средний возраст пациентов составил 42,3 года. При анализе частоты выживаемости она была значимо ниже в группе с использованием донорских клеток (3 группы), чем в группах 1 и 2 с собственными клетками (84,62% против 100%, p=0,060 и 91,96%, p<0,0001, соответственно). Разница в возрасте в группах с донорскими клетками (3 и 4) на частоту выживаемости значимо не влияла (84,82% и 92,94%, p=0,443). Различия в частоте с обнаружением хорионического гонадотропина «ХГЧ(+)» были обнаружены между группами с использованием донорских ооцитов (3 и 4 группы) и собственных ооцитов без генетического скрининга (2-я группа), в которых показатель был значимо ниже (62,5% и 62,98% против 41,03%, p<0,0001 в обоих случаях). Одинаковые значимые различия в частоте наступления беременности (ЧНБ) и частоты имплантации (ЧИ) были выявлены между 2-й группой (собственные ооциты без скрининга) и всеми остальными группами (1, 3 и 4). В последних, показатели были значимо выше, ЧНБ - 35,2% против 60%, 62,5% и 58,06% соответственно, и ЧИ - 36,36% против 60%, 62,5% и 56,45%, соответственно. Полученные результаты подтверждают определяющую роль компетенции ооцитов, демонстрируют отсутствие негативного влияния витрификации на эмбрионы после биопсии трофобласта и убедительно доказывают целесообразность и значительное положительное влияние генетического скрининга эмбрионов на клинические результаты.

Ключевые слова: ооциты, витрификация эмбрионов, генетический скрининг

Summary. The achievements of fundamental science have recently become the most widespread in the field of reproductive medicine. The biology of human development has mostly become understandable and manageable, thanks to

new technologies. Some stages of the early human embryogenesis are predictably reproduced in the laboratories of assisted reproductive technologies (ART). Nevertheless, despite all the achievements, the success (birth of a healthy child) does not exceed 30% of the started cycles. That is why there is a continual search for new methods and their combinations to achieve better results and develop standard protocols for managing patients with infertility. The purpose of this work is to analyze the feasibility of genetic screening of embryos (NGS) and to compare the effectiveness of using donor and own oocytes when transferring a single embryo in cryocycles. We have analyzed the 536 cryocycles. There were four groups of patients with single embryo transfer (SET): group 1 - cycles with NGS, embryos with genetically euploid status taken for selection for transfer with used own oocytes (NSd, n=20); group 2 - cycles with single embryo transfer without NGS and using own oocytes (nSd, n=446); group 3 - cycles without NGS, using donor oocytes (nSD, n=8). All groups 1, 2, and 3 were near the same with an average age (34,1 - 34,3 - 34,6 years, respectively). Due to the small size of group 3, another (4th) observation group was taken (cycles without NGS, using donor oocytes, nSD, n=62), but without age restrictions, where the average age of patients was 42.3 years. Analyze of the survival rate shows significant decreasing in the group used donor cells (3 groups) than in groups (1 and 2) used own cells (84.62% vs 100%, $p=0.060$ and 91.96%, $p<0.0001$, respectively). The age difference in the groups with donor cells (3 and 4) did not significantly affect the survival rate (84.82% and 92.94%, $p=0.443$). We found differences in the rate of HCG(+) between groups using donor oocytes (groups 3 and 4) and own oocytes without genetic screening (group 2), where the indicator was significantly lower (62.5% and 62.98% vs 41.03%, $p<0.0001$ in both cases). The same significant differences in the pregnancy rate (PR) and implantation rate (IR) we found between group 2 (own oocytes without screening) and all other groups (1, 3 and 4). In the last groups, the indicators were significantly higher (PR - 35.2% against 60%, 62.5% and 58.06%, respectively, and IR - 36.36% against 60%, 62.5% and 56.45%, respectively). The results we obtained confirm the definitive role of oocyte competencies, demonstrate the absence of an adverse effect of vitrification on embryos after trophoblast biopsy, and convincingly prove the feasibility and significant positive impact of genetic screening of embryos on clinical results.

Key words: *oocytes, vitrification of embryos, genetic screening*

Введение. Вспомогательные репродуктивные технологии (далее - ВРТ) наиболее убедительно демонстрируют успехи фундаментальной науки в практической медицине. Современные технологии отбора гамет и эмбрионов, оплодотворение *in vitro*, продленное культивирование, *time-lapse* технология, криоконсервация биологического материала позволяют при наличии разных форм бесплодия у пациентов достигать наступления беременности и приводят к рождению здоровых детей [1-5]. В настоящее время по разным данным, в мире насчитывается от 8 до 10 миллионов рожденных детей [2, 4, 6]. Но, несмотря на все успехи, только 30% начатых циклов ВРТ заканчиваются рождением ребенка. Именно поэтому идет постоянный поиск новых инвазивных и не инвазивных методов отбора наиболее перспективных к имплантации эмбрионов. Современная технология NGS – Next Generation Sequencing – метод прямого анализа генома эмбриона, позволяет проводить скрининг всех 46 хромосом на структурные перестройки и количественные изменения, исключив эмбрионы с генетическими нарушениями для последующего переноса. Многочисленные исследования последних лет приводят убедительные данные преимущества генетического скрининга эмбрионов на анеуплоидии при отборе эмбрионов для переноса в полость матки, особенно у пациентов старше 35 лет [7-9]. По данным литературы в ооцитах женщины после 35 лет возрастает уровень структурных и количественных аномалий хромосомного аппарата. Именно по этой причине частота наступления беременности в этой возрастной группе крайне низкая [8, 10]. В связи с этим рекомендуется использование донорских ооцитов в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 30 августа 2012 г. N 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» [11].

Цель исследования: анализ целесообразности выполнения генетического скрининга эмбрионов (Next Generation Sequencing - NGS) и сравнительный анализ эффективности использования донорских и собственных ооцитов при переносе одного эмбриона в криоциклах.

Материалы и методы исследования. Проведен ретроспективный анализ криопротоколов циклов, проведенных в ЗАО «Медицинская компания ИДК». Для исследования были выбраны 4 группы пациентов с переносом одного эмбриона (SET – single embryo transfer): циклы с проведением NGS тестирования, в которых для отбора на перенос были взяты эмбрионы с генетически эуплоидным статусом с использованием собственных ооцитов (1 группа, n=20); циклы с переносом одного эмбриона без применения

NGS и использованием собственных ооцитов (2 группа, n=446); циклы без применения NGS, с использованием донорских ооцитов (3 группа, n=8). 1, 2 и 3 группы имели сопоставимый возраст (34,1 - 34,3 - 34,6 лет). 4 группа наблюдения (циклы без применения NGS, с использованием донорских ооцитов, n=62) была выделена дополнительно, в связи с малочисленностью 3-й группы, средний возраст пациентов составил 42,3 года. Всего проанализировано 536 криоциклов.

В работе были использованы эмбрионы человека, исследование которых было проведено с соблюдением международных этических и правовых норм обращения с эмбрионами человека [ст. 18 Конвенции Совета Европы о защите прав человека и достоинства человеческого существа при использовании достижений биологии и медицины, 1997]. Использование в научных исследованиях эмбрионов человека было разрешено Комитетом по биоэтике при Самарском государственном медицинском университете (выписка из протокола № 116 от 3.10.2018 г.).

Для оценки структуры ооцитов и эмбрионов был использован морфологический метод оценки качества эмбрионов с применением инвертированного микроскопа Olympus IX-73 (Япония) и стереомикроскоп Nikon SMZ-1000 (Япония). Витрификация эмбрионов осуществлялась в соответствии с протоколом замораживания/оттаивания завода-производителя (Irvine Scientific, USA). Для оценки жизнеспособности эмбриона проводили его морфологическую оценку сразу после размораживания (рис. 1) и через 2 часа после размораживания (рис. 2). На перенос были взяты эмбрионы, у которых количество не поврежденных клеток составляло более 50%.



Рис. 1. Эмбрион человека 5-х суток развития, стадия сколлапсированной бластоцисты человека, сразу после размораживания. Ув.: x200.



Рис. 2. Эмбрион человека 5-х суток развития, стадия бластоцисты человека через 2 часа после размораживания. Ув.: x200.

Биопсию эмбрионов проводили на 5-6 сутки доимплантационного развития эмбрионов. Для биопсии клеток трофобласта были отобраны бластоцисты категории не менее 3BV в соответствии с оценкой по системе Gardner et Schoolcraft [12].

Статистическую обработку результатов выполняли на компьютере в среде статистических вычислений R (Rv.3.5.3, Studio v.1.1.463), первичный ввод данных производили с помощью электронных таблиц MS Excel. Использовали методы описательной статистики, тесты для сравнения пропорций, в том числе точный биномиальный для малых выборок и одновыборочный тест пропорций с коррекцией непрерывности для больших выборок. Контрольными точками были определены: частота выживаемости эмбрионов после витрификации, частота положительного выявления хорионического

гонадотропина человека ХГЧ(+) в крови, частота наступления беременности (ЧНБ) и частота имплантации (ЧИ) у пациентов во всех исследованных группах.

Результаты и обсуждение. В предыдущих публикациях нами были описаны результаты витрификации эмбрионов в зависимости от уровня их организации, корреляция между стадией развития бластоцисты и уровнем выживаемости, а также ЧНБ и ЧИ [1]. Для оценки влияния витрификации на развивающиеся эмбрионы, подвергающиеся предварительной биопсии эмбриона с забором 3-5 клеток трофобласта, проанализированы результаты выживаемости бластоцист. Биопсия эмбрионов сама по себе является инвазивной процедурой, имеющей риски его повреждения и остановки их в развитии. Полученные в ходе исследования данные приведены в таблице 1.

Таблица 1
Показатели выживаемости эмбрионов и клинической эффективности программ ВРТ

Группа	n	Сред- ний возраст	Выжива- емость	Разли- чия	ХГЧ(+)	Разли- чия	ЧНБ	Разли- чия	ЧИ	Разли- чия
1	20	34,10	100,00	* 3 (p=0,060)	60,00		60,00	* 2 (p=0,032)	60,00	* 2 (p=0,049)
2	446	34,34	91,96	** 3 (p<0,001)	41,03		35,20		36,36	
3	8	34,62	84,62		62,50	** 2 (p<0,001)	62,50	** 2 (p<0,001)	62,50	** 2 (p<0,001)
4	62	42,27	92,94		62,90	** 2 (p<0,001)	58,06	** 2 (p<0,001)	56,45	** 2 (p<0,001)

Примечание: * - в столбце различия указан номер группы, с которой имеются статистически значимые различия

Как видно из таблицы, частота выживаемости эмбрионов в 1 группе составила 100%. Это свидетельствует о том, что витрификация не ухудшает качество и жизнеспособность эмбриона после биопсии. Максимальная выживаемость может быть также связана с предварительной селекцией и корректным отбором эмбрионов для биопсии. При сопоставлении данных по выживаемости эмбрионов мы получили статистически значимые отличия между 1-й и 3-й группами, а также между 2-й и 3-й группами. Таким образом, выживаемость в группе с использованием донорских клеток (3) была значимо ниже, чем в группах с собственными клетками (1 и 2). Возраст реципиентов в группах (3 и 4) с донорскими клетками на частоту выживаемости не влиял. По результатам ХГЧ(+) – наиболее низкие показатели были получены во 2-й группе (с использованием собственного генетического материала без проведения генетического скрининга). Значимо различаются данные между 2-й и 3-й, 2-й и 4-й группами.

По показателям ЧНБ и ЧИ обнаружены сопоставимые показатели в 1-й, 3-й и 4-й группах. Это свидетельствует о том, что генетический скрининг позволяет получить при использовании собственных ооцитов сопоставимые клинические результаты с группами, в которых были использованы донорские ооциты (вне зависимости от возраста реципиентов). Кроме того, этот факт является дополнительным доказательством определяющей роли компетенции ооцита в реализации репродуктивного потенциала.

Статистически значимые отличия по ЧНБ и ЧИ демонстрируют данные между 1-й и 2-й группами (почти в 2 раза), что дополнительно показывает преимущества генетического скрининга и эффективность переноса зуплоидного эмбриона в полость матки при использовании собственного генетического материала. Статистически значимая разница клинических показателей 2-й и 3-й групп позволяет сделать очевидный вывод о преимуществе применения донорского материала по сравнению с использованием

собственного, без сопутствующего генетического тестирования на анеуплоидии в одной и той же возрастной группе. Клинические показатели эффективности криопротоколов (частота ХГЧ (+), ЧНБ, ЧИ) показывают преимущества переносов после NGS и в группах с использованием донорских ооцитов.

Заключение. Таким образом, комплексный анализ влияния компетенции ооцитов, генетического скрининга и витрификации на частоту выживаемости эмбрионов, клинические показатели у пациентов, позволяет сделать следующие выводы. Процесс витрификации не оказывает негативного влияния на качество и жизнеспособность эмбрионов, в том числе и после проведенной биопсии эмбрионов, а качество ооцитов, их уровень плоидности являются определяющими прогностическими факторами наступления беременности. Генетический скрининг на анеуплоидии значительно улучшает клинические показатели и результаты, делая их сопоставимыми с аналогичными у пациентов с использованием донорских ооцитов.

Авторы сообщают об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования.

Литература

References

1. Ivanova OV, Shurygina OV, Rusakov DYU, Bykova TV, Petrova AA, Yukhimets SN, Kulakova OV, Yuldasheva SZ. Kriokonservatsiya biologicheskogo materiala cheloveka v praktike embriologicheskoy laboratorii. *Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter*. 2019;27(3):46-50.
2. Makarova NP. Avtoreferat diss... *Morfologicheskie i molekulyarno- biologicheskie osobennosti postovulyatornykh ootsitov i ikh rol' v preimplantatsionnom razvitii embrionov cheloveka*. 2019:46.
3. Ciepiela P, Duleba AJ, Kario A, Chetstowski K, Branecka-Woźniak D, Kurzawa R. Oocyte matched follicular fluid anti-Müllerian hormone is an excellent predictor of live birth after fresh single embryo transfer *Hum Reprod*. 2019;34(11):2244–2253.
4. Ernstad EG, Spangmose AL, Opdahl S, Romundstad LB, Tiitinen A, Gissler M, Wennerholm U, Pinborg A, Bergh T, Malchau SS. Perinatal and maternal outcome after vitrification of blastocysts: a Nordic study in singletons from the CoNARTaS group *Hum Reprod*. 2019;34(11):2282–2289.
5. Hwang SS, Dukhovny D, Gopal D, Cabral H, Diop H, Coddington CC, Stern JE. Health outcomes for Massachusetts infants after fresh versus frozen embryo transfer *Fertil Steril*. 2019;112(5):900–907.
6. Scaravelli G, Levi-Setti PE, Livi C, La Sala G, Ubaldi FM, Greco E, Coccia ME., Borini A, Revelli A, Ricci G, Vigilano V, De Luca R, Bolli S, Rienzi L. Contribution of cryopreservation to the cumulative live birth rate: a large multicentric cycle-based data analysis from the Italian National Registry *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(11):2287–2295. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-019-01566-y>.
7. Paulson RJ. Outcome of in vitro fertilization cycles with preimplantation genetic testing for aneuploidies: let's be honest with one another *Fertil Steril*. 2019;112(6):1013–1014 [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(19\)32541-5/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(19)32541-5/fulltext).
8. Sacchi M, Albani E, Cesana A, Smeraldi A, Parini V, Fabiani M, Poli M, Capalbo A, Levi-Setti PE. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy Improves Clinical, Gestational, and Neonatal Outcomes in Advanced Maternal Age Patients Without Compromising Cumulative Live-Birth Rate *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(12):2493–2504. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-019-01609-4>.
9. He H, Jing S, Fu Lu C, Qiu TanY, Li LuoK, Ping Zhang S, Gong F, Xiu Lu G, LinG. Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1,721 children *FertilSteril*. 2019;112(1):82–88. [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(19\)30249-3/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(19)30249-3/fulltext).
10. Zhang WY, Versen-Höynck F, Kapphahn KI, Fleischmann RR, Zhao Q, Baker VL. Maternal and neonatal outcomes associated with trophoctoderm biopsy *FertilSteril*. 2019;112(2):283–290. [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(19\)30316-4/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(19)30316-4/fulltext).

11. Carrasquillo RJ, Kohn TP, Cinnioglu C, Rubio C, Simon C, Ramasamy R, Al-Asmar N. *Advanced paternal age does not affect embryo aneuploidy following blastocyst biopsy in egg donor cycles* J Assist Reprod Genet. 2019;36(3):2039–2045. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-019-01549-z>.
12. Gardner DK, Schoolcraft WB. *In vitro culture of human blastocysts. Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond*. 1999;(11):378–388.

Авторская справка

Шурыгина Оксана Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией вспомогательных репродуктивных технологий, Медицинская компания ИДК; профессор кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Российская Федерация; e-mail: **oks-shurygina@yandex.ru**

Иванова Ольга Викторовна, аспирант кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; e-mail: **pathologywinkie@gmail.com**

Юхимец Сергей Николаевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры морфологии и патологии, Медицинский университет РЕАВИЗ, Самара, Россия; e-mail: **y_s_n@reaviz.ru**

Юлдашева Сурая Зарифовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии, Ташкентский педиатрический медицинский институт, Ташкент, Республика Узбекистан; e-mail: **maxfira@mail.ru**

Русаков Дмитрий Юрьевич, кандидат медицинских наук, врач-уролог, Медицинская компания ИДК; старший преподаватель кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; e-mail: **maison55@rambler.ru**

Кулакова Олеся Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; e-mail: **olesvk@mail.ru**