

# ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯЦИИ ОВУЛЯЦИИ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ НА ИСХОД ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ЖЕНЩИН РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

**А.В. Нефедова, Т.И. Пестова, М.Д. Русакова, Г.В. Брюхин\***

ООО «Центр лечения бесплодия»;

\*ЧелГМА, г. Челябинск

Проведен анализ влияния стимуляции овуляции и условий культивирования на исход экстракорпорального оплодотворения у женщин разных возрастных групп. Показано, что наступление беременности зависит, прежде всего, от возраста и здоровья женщины, от качества эмбрионов, которое определяется этими факторами, а не от проведения эмбриологического этапа цикла ЭКО.

*Ключевые слова:* экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит (ИКСИ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), человеческий менопаузальный гормон (ЧМГ).

Появление ребенка, зарождение новой жизни – это великое таинство, данное нам природой. Но порой жизнь вносит свои коррективы, и необходимый для наступления беременности процесс слияния двух клеток – процесс оплодотворения – становится невозможным.

В настоящее время бесплодие по вине как мужа, так и жены остается актуальной проблемой и встречается у 8–10 % супружеских пар, помочь которым зачастую можно только методом экстракорпорального оплодотворения.

Важно заметить, что на фертильность пар влияет ряд общих эпидемиологических факторов, например возраст, который является основной детерминантой женской фертильности, в том числе огромную роль играет курение и образ жизни обоих партнеров [2].

Уровень современной науки позволяет достаточно быстро выявить причину бесплодия, но устранить ее бывает чрезвычайно сложно.

Последнее время методы стимуляции генеративной функции яичников, забора ооцитов и культивирования эмбрионов *in vitro* подвергались существенному усовершенствованию. Однако на сегодняшний день показатель успешных исходов, критерием которого является частота рождения живых детей, остается достаточно низким и колеблется в пределах 20–25 %. Невысокие показатели конечного исхода искусственного оплодотворения обусловлены, прежде всего, тем, что еще многое остается неизвестно о факторах, влияющих на процесс искусственно индуцированного зачатия [3, 5].

Еще в начале 1970-х годов основоположники ЭКО R.G. Edwards и P.C. Steptoe стали использовать стимуляцию яичников для получения ооцитов и оплодотворения их вне организма человека.

Первая беременность наступила в естественном цикле, а последующие беременности – уже в стимулированных циклах. Абсолютным показанием для стимуляции функции яичников являются ановуляторные нарушения, при которых стимуляция фолликулогенеза и овуляции патогенетически обоснована для достижения беременности [3].

В настоящее время стимуляция яичников гонадотропинами в программах ЭКО является обязательным компонентом, цель которого получить большое число ооцитов для того, чтобы выбрать лучшие, компенсировать потери ооцитов при оплодотворении и эмбрионов при их культивировании и оставить генетический материал для криоконсервации.

История стимуляции яичников гонадотропинами имеет два значительных этапа: использование мочевых и менопаузальных гонадотропинов (60–90-е годы XX века) и применение рекомбинантных препаратов (в настоящее время). Не утихают дебаты о сравнительной эффективности и безопасности мочевых и рекомбинантных препаратов. Нет достоверных данных о преимущественной эффективности той или иной группы препаратов [1, 3, 4]. В нашей работе мы решили проанализировать влияние стимуляции овуляции и условий культивирования на исход ЭКО в разных по возрасту группах женщин.

**Материалы и методы исследования.** В настоящем исследовании проведен ретроспективный анализ протоколов лаборатории «Вспомогательных репродуктивных технологий» (ВРТ) ООО «Центр лечения бесплодия» за 2009 год, в зависимости от препаратов, которыми стимулировали суперовуляцию. За 2009 год было проанализировано 65 циклов, в которых для стимуляции овуляции применялись препараты чистого фолликулостимули-

рующего гормона (ФСГ): «Пурегон» (фирма «Органон», Голландия) и «Гонал-Ф» (фирма «Сероно», Италия); препараты человеческого менопаузального гормона (ЧМГ) «Менопур» (фирма «Ферринг», Германия) и «Луверис» – препарат, содержащий рекомбинантный лютеинизирующий гормон (INDUSTRIA FARMACEUTICA SERONO, S.p.A. Италия).

В настоящее время существуют показания для выбора препаратов стимуляции, которые будут наиболее эффективными и безопасными для каждой пациентки.

Циклы были разделены на три группы. В первую группу вошли женщины, в возрасте до 34 лет. В этой группе стимуляция суперовуляции проводилась препаратами, содержащими чистый фолликулостимулирующий гормон (ФСГ). Вторую группу составили пациентки старшего репродуктивного возраста (36–43 года), их стимулировали препаратом, содержащим человеческий менопаузальный гормон (ЧМГ) (17 человек). Третью группу составили пациентки разного репродуктивного возраста, у которых в процессе стимуляции изменялся прокол использования препаратов, так как был получен неожиданный бедный ответ, либо пациентки с резецированными яичниками и эндометриозом в анамнезе (14 человек). В данном случае для стимуляции суперовуляции применялись препараты, содержащие ФСГ и ЧМГ или ФСГ и рекомбинантный ЛГ.

Культивирование эмбрионов проводилось на средах фирмы “MediCult” (Дания) по одной схеме: с момента пункции до 22–24 ч культивировали в Universal IVF media, с 24–52 ч в ISM1 media, с 52–120 ч в Blast Assist media.

Среды являются секвенциальными, то есть имеют различный состав, отвечающий метаболическим потребностям эмбрионов на конкретных стадиях развития, и позволяют культивировать эмбрионы до преимплантационной стадии – бластоцисты. Условия в инкубаторе: 5,5 % CO<sub>2</sub>, влажность камеры 88 %, температура в инкубаторе 37,0–37,2 °С.

Для инсеминации при ЭКО использовали сперму, в которой концентрация активно-подвижных сперматозоидов была не менее  $10 \times 10^6$ /мл и процент морфологически нормальных форм более 5 %. В том случае, если концентрация активно-подвижных сперматозоидов была менее  $10 \times 10^6$ /мл и процент морфологически нормальных форм менее 5 %, то оплодотворение делали методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ).

Подготавливали сперму при помощи центрифугирования в градиенте плотностей 40 и 80 % Supra Sperm «MediCult», затем в буферном солевом растворе Flushing media той же фирмы [5].

В тех случаях, когда в результате экстракорпорального оплодотворения было получено менее 5 эмбрионов, перенос делали через 72 ч (на 3 сутки)

на стадии 6–10 бластомеров, чтобы исключить риск остановки дальнейшего развития. Если развивалось более пяти эмбрионов, культивирование продляли. Перенос таких эмбрионов осуществлялся на стадии морулы или бластоцисты (96–120 ч).

Для определения качества 2–3-суточных эмбрионов использовали 4-балльную шкалу:

эмбрионы отличного качества (4) – AA, AB, BA;

эмбрионы хорошего качества (3) – BB;

эмбрионы удовлетворительного качества (2) – BC, CC;

эмбрионы, ушедшие в дегенерацию (1) – D.

Критерии оценки эмбрионов, которые переносили на 3 сутки (72 ч):

AA – эмбрионы, у которых на вторые сутки имеется 2–4 бластомера, на третьи сутки 8–10 бластомеров регулярной формы с ровными краями;

AB – эмбрионы, у которых на вторые сутки имеется 2–4 бластомера, на третьи сутки – 8–10 бластомеров регулярной формы с неровными краями и фрагментацией не более 10 %;

BA – эмбрионы, у которых на вторые сутки имеется 2–4 бластомера, на третьи сутки – 8–10 бластомеров нерегулярной формы с ровными краями;

BB – эмбрионы, у которых на вторые сутки имеется 2–4–6 бластомеров, на третьи сутки – 8–10 бластомеров нерегулярной формы с неровными краями и цитоплазматической фрагментацией не более 30 %;

BC – эмбрионы, у которых на вторые сутки имеется 2–4–6 бластомеров, на третьи сутки – 8–10 бластомеров нерегулярной формы с неровными краями, вакуолизированной цитоплазмой и с фрагментацией не более 50 %;

CC – эмбрионы, у которых на вторые сутки имеется 2–4–6 бластомеров, на третьи сутки – 2–4–6–8–10 бластомеров нерегулярной формы с неровными краями, вакуолизированной цитоплазмой и с фрагментацией более 50 %;

D – эмбрионы, остановившиеся в развитии, у которых начались видимые процессы дегенерации.

Оценка качества морул и бластоцист осуществлялась по классификации Гарднера.

Статистический анализ проводился с использованием программы SPSS Statistics 17.0.

Характеристика трех групп обследованных групп женщин представлена в табл. 1–4.

**Результаты собственных исследований.** В ходе проведения эксперимента были выявлены следующие закономерности.

Первые две группы отличаются по возрасту, за исключением третьей группы, куда вошли женщины разного репродуктивного возраста, у которых в процессе стимуляции изменялся прокол использования препаратов, так как был получен неожиданный бедный ответ, либо пациентки с резецированными яичниками и эндометриозом в анамнезе.

Как видно из табл. 2, средняя продолжительность стимуляции суперовуляции у женщин всех групп составила в среднем 13 дней.

Ко дню пункции у женщин, принимавших только ФСГ, получено большее количество зрелых фолликулов (диаметром 16 мм и более) ( $10,23 \pm 0,78$ ), чем у женщин других групп, получавших ЧМГ и комбинацию ЧМГ+ФСГ и ЧМГ+ЛГ ( $4,0 \pm 0,51$  и  $3,9 \pm 0,67$  фолликула), что характерно для состава групп по возрастному и репродуктивному анамнезу (см. табл. 2).

После проведения пункции у женщин второй и третьей группы было получено примерно одинаковое число ооцитов ( $4,35 \pm 0,93$  и  $4,35 \pm 0,91$ ), что значительно меньше, чем в первой группе, где число ооцитов составило ( $11,5 \pm 1,29$ ). Данные показатели соответствуют предыдущему критерию.

Несмотря на большое количество полученных ооцитов в первой группе по сравнению с остальными двумя, процент оплодотворения в группах не намного отличается, это связано с получением в первой группе большого числа незрелых клеток. Доля правильно оплодотворившихся ооцитов в группах соответствует современным данным.

Процент оплодотворения в ЭКО был самым высоким у женщин третьей группы. Процент оплодотворения в ИКСИ был самым высоким во второй группе, это связано с тем, что в данной группе пациентов ИКСИ было проведено из-за «женского фактора», то есть в этих циклах было получено менее трех клеток, в таких ситуациях, чтобы повысить процент правильно оплодотворившихся ооцитов (2PN), рекомендуется делать ИКСИ.

Изначально ИКСИ дает больше шансов к правильному оплодотворению, так как способствует преодолению таких факторов, как: низкая (недостаточная для оплодотворения) концентрация активно-подвижных сперматозоидов, низкий процент морфологически правильных клеток, а значит способных к оплодотворению, повышенный уровень антиспермальных антител и т. п., каждый из которых может повлиять на процесс самостоятельного оплодотворения сперматозоидами.

Средний процент эмбрионов, продолжающих свое развитие на день переноса, от числа полученных 2PN зигот был максимальным в третьей группе, но качество эмбрионов в этой группе отличалось в худшую сторону от двух других. Это связано с тем, что перенос эмбрионов в этой группе чаще производили на третьи сутки, так как количество эмбрионов было менее 5. Обычно на этой стадии развития еще невозможно отличить потенциал жизнеспособности у каждого из эмбрионов, так как они еще не успели миновать стадию 8 клеток, когда включается в работу их личный геном. К пятым суткам, как правило, число развивающихся эмбрионов уменьшается и появляется возможность выбрать лучшие из них для переноса и витрификации.

Перенос эмбрионов в матку женщины проводился на третий или пятый день после пункции. В зависимости от сопутствующих факторов (качества полученных эмбрионов, возраста женщины, уровня готовности эндометрия для имплантации эмбриона) осуществлялся перенос 1,2 или 3 эмбрионов. Как видно из табл. 4, среднее количество

Таблица 1

Общая характеристика обследованных групп женщин

Исследуемый показатель	Чистый ФСГ (1-я группа)	Чистый ЧМГ (2-я группа)	ФСГ+ЧМГ, ФСГ+ЛГ (3-я группа)
Численность группы	34	17	14
Возраст, лет	$29,08 \pm 0,6$ * (22–35)	$39,11 \pm 0,55$ ** (36–43)	$33,07 \pm 1,38$ (27–42)
Вес, кг	$67,85 \pm 4,14$ (47–167)	$72,82 \pm 5,71$ (50–152)	$82,0 \pm 9,10$ (42–152)

Здесь и в табл. 2–4: \* ( $p < 0,05$ ) – по сравнению со 2-й группой; \*\* ( $p < 0,05$ ) – по сравнению с 3-й группой.

Таблица 2

Характеристика процесса и исхода стимуляции суперовуляции

Исследуемый показатель	Чистый ФСГ	Чистый ЧМГ	ФСГ+ЧМГ ФСГ+ЛГ
Средняя продолжительность стимуляции овуляции	$12,55 \pm 0,17$ *,**	$13,47 \pm 0,36$	$13,85 \pm 0,46$
Среднее количество фолликулов ( $\geq 16$ мм) на день пункции	$10,23 \pm 0,78$ *	$4,0 \pm 0,51$	$3,9 \pm 0,67$
Среднее количество полученных ооцитов	$11,5 \pm 1,29$ *,**	$4,35 \pm 0,93$	$4,35 \pm 0,91$
Средний процент полученных ооцитов от предварительного числа возможных фолликулов	$109,5 \pm 7,7$ %	$97 \pm 15$ %	$129 \pm 32$ %

Анализ эмбриологического протокола, %

Исследуемый показатель	Чистый ФСГ	ФСГ+ЧМГ, ФСГ+ЛГ	ФСГ+ЧМГ, ФСГ+ЛГ
Средний процент правильно оплодотворившихся ооцитов ЭКО и ИКСИ	70,98 ± 3,76	74,26 ± 6,85	69,52 ± 7,39
Средний процент оплодотворения в ЭКО	74,35 ± 4,88	71,41 ± 7,84	85,24 ± 7,01
Средний процент оплодотворения в ИКСИ	67,40 ± 5,78	85,66 ± 14,33	53,80 ± 10,26
Средний процент эмбрионов, продолжающих свое развитие на день переноса, от числа полученных 2PN зигот	95,57 ± 3,17	74,26 ± 6,84	100 ± 0,00

Таблица 4

Характеристика перенесенных эмбрионов и результаты проведенных циклов ЭКО

Исследуемый показатель	Чистый ФСГ	Чистый ЧМГ	ФСГ+ЧМГ ФСГ+ЛГ
Среднее количество перенесенных эмбрионов, шт.	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,2
Качество перенесенных эмбрионов	3,4 ± 0,1 **	3,35 ± 0,15	2,85 ± 0,17
Толщина эндометрия на день переноса, мм	10,57 ± 0,41 (7–21)	10,2 ± 0,44 (7,7–14,1)	10,3 ± 0,37 (8,5–13)
Процент наступления беременности	68,75 % *	13,33 %	38,46 %
Процент рождения живых детей	50 % *	0 %	30,7 %

перенесенных эмбрионов не отличалось, но видно, что в 3-й группе имеется тенденция к снижению числа перенесенных эмбрионов  $1,9 \pm 0,2$ , в то время как у женщин других групп данный показатель был примерно одинаков. Уменьшение числа перенесенных эмбрионов в 3-й группе может быть обусловлено снижением их качества, а также риском многоплодной беременности в связи с хорошей готовностью эндометрия. Средний показатель толщины эндометрия у всех трех групп был примерно одинаковый, однако частота наступления беременности после переноса эмбрионов оказалась выше у женщин, принимавших фолликулостимулирующий гормон (68,75 %), по сравнению с двумя другими группами. Во второй группе женщин, где для стимуляции суперовуляции применялся человеческий менопаузальный гормон, процент беременностей крайне низкий, что вероятнее всего связано с возрастом и наличием многих других заболеваний в анамнезе.

Таким образом, анализ данных позволяет предположить, что наступление беременности в большей степени зависит от возраста и здоровья женщины, от качества эмбрионов, которое определяется этими факторами, а также от взаимодействия

эмбриона со слизистой оболочкой матки, нежели чем от проведения эмбриологического этапа цикла ЭКО. Кроме того, качество эмбрионов может быть обусловлено и непрогнозируемыми факторами, такими как хромосомные или органические нарушения в половых клетках как мужчины, так и женщины.

### Литература

1. Доказательная эндокринология: пер. с англ. – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медия, 2008. – 640 с.
2. Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит: современное состояние / под ред. В.И. Кулакова, Л.Н. Кузьмичева, Ю.Е. Мосесовой. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 344 с.
3. Назаренко, Т.А. Стимуляция функции яичников / Т.А. Назаренко. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 272 с.
4. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. Вводный курс: пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 656 с.
5. Элдер, К. Экстракорпоральное оплодотворение: пер. с англ. / Кэй Элдер, Брайан Дэйл. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 304 с.

Поступила в редакцию 10 января 2011 г.