



ЗАМОРАЖИВАНИЕ ГАМЕТ КАК ВОЗМОЖНОСТЬ СОХРАНЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОГО СТАТУСА МУЖЧИНЫ И ЖЕНЩИНЫ

Шурыгина О.В., Беляева Л.А., Миронов С.Ю., Шурыгин С.А., Кулакова О.В.

Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Россия, Самара

✓ Резюме

Замораживание биологических объектов является эффективным инструментом сохранения их компетенций. Современный способ криоконсервации – витрификация - позволяет замораживать объекты без образования кристаллов льда и развития осмотического шока. Именно поэтому эта технология так активно используется в репродуктивной медицине. Женщины со сниженным овариальным резервом, системными заболеваниями имеют более высокие шансы на наступление собственной беременности при использовании стратегии накопления собственных ооцитов при минимальной стимуляции. Витрификация ооцитов и возможность их длительного хранения является наиболее предпочтительной молодых женщин, откладывающих рождение ребенка на более поздний срок.

Замораживание спермы является золотым стандартом сохранения репродуктивного статуса мужчины, в том числе при планировании гонадотоксичной лучевой или химиотерапии, а также при оперативном вмешательстве.

Ключевые слова: ооцит, сперматозоид, замораживание, витрификация, человек

FREEZING OF GAMETES AS AN OPPORTUNITY TO PRESERVE THE REPRODUCTIVE STATUS OF MEN AND WOMEN

Shurygina O.V., Belyaeva L.A., Mironov S.Y., Shurygin S.A., Kulakova O.V.

Samara State Medical University, Russia, Samara

✓ Resume

The freezing of biological objects is an effective tool for preserving their competencies. The modern method of cryopreservation is the vitrification, which allows you to freeze objects without the formation of ice crystals and the development of osmotic shock. That is why this technology is so actively used in reproductive medicine. The women with reduced ovarian reserve and systemic diseases have a higher chance of their own pregnancy with a strategy of accumulating their own oocytes with minimal stimulation. Vitrification of oocytes and the possibility of their long-term storage is the most preferable for young women postponing the birth of a child at a later date. Sperm freezing is the gold standard for preserving a man's reproductive status, including when planning gonadotoxic radiation or chemotherapy, as well as during surgery.

Key words: oocyte, spermatozoa, freezing, vitrification, human

GAMETALARNI MUZLATISH ERKAK VA AYOLNING REPRODUKTIV HOLATINI SAQLAB QOLISH IMKONIYATI SIFATIDA

Shurygina O. V., Belyaeva L. A., Mironov S. Yu., Shurygin S. A., Kulakova O. V.

Rossiya federatsiyasi Sog'liqni saqlash vazirligining " Samara davlat tibbiyot universiteti " federal davlat byudjeti oliy ta'lim muassasasi, Rossiya, Samara

✓ *Rezyume*

Ovaryan zahirasi, tizimli kasalliklari kamaygan ayollar o'zlarining oositlarini minimal stimulyatsiya bilan to'plash strategiyasidan foydalangan holda o'z homiladorligini boshlash ehtimoli ko'proq. Oositlarning vitrifikatsiyasi va ularni uzoq muddatli saqlash imkoniyati, keyinchalik bola tug'ilishini kechiktiradigan yosh ayollar uchun eng maqbuldir. Spermani muzlatish-bu erkakning reproduktiv holatini saqlab qolish uchun oltin standart, shu jumladan gonadotoksik radiatsiya yoki kimyoterapiya, shuningdek jarrohlik usullar yordamida.

Kalit so'zlar: oosit, sperma, muzlatish, vitrifikatsiya, odam

Актуальность

Криоконсервация гамет и эмбрионов, тканей является одним из наиболее перспективных направлений развития репродуктивных технологий. Технология современного замораживания позволяет «поставить на паузу» физиологические процессы, которые протекают в биологических объектах и затем их снова «запустить» при необходимости [1, 2, 3, 4, 5, 6]. В настоящее время данная необходимость может быть продиктована совершенно разными причинами. Прежде всего это медицинские показания. Так замораживание эмбрионов осуществляется при возникновении риска развития синдрома гиперстимуляции яичников, подъеме прогестерона, недостаточной толщине эндометрия, то есть при проведении лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), а также при других экстренных внештатных ситуациях, когда перенос эмбриона невозможен (например, ОРВИ). Или же в случае, когда после стимуляции овуляции, после состоявшегося переноса эмбриона/ов в цикле ЭКО, остаются лишние, которые могут быть перенесены в полость матки в будущем [7, 8]. Таким образом при однократной стимуляции яичников, создается возможность для рождения второго и третьего ребенка.

Криоконсервация ооцитов дает больше преимуществ по сравнению с замораживанием эмбрионов: (1) сохранение фертильности у женщин с риском ее потери из-за онкологического лечения, преждевременной недостаточности яичников или хронического заболевания; (2) это может помочь облегчить религиозные и/или другие этические, правовые и моральные проблемы хранения эмбрионов; (3) это помогает преодолеть такие проблемы, когда муж не может получить жизнеспособный образец спермы, или когда сперматозоиды не могут быть обнаружены в яичке в данный момент в случае необструктивной азооспермии; (4) он делает возможными «банки яйцеклеток и/или донорство яйцеклеток» за счет устранения проблем синхронизации донор-получатель; и (5) она позволяет женщинам откладывать роды до более позднего времени/возраста (например, после установления карьеры и т. д.) [9]. Последнее называется социальным замораживанием, когда ооциты криоконсервируются в немедицинских целях. В течение примерно 10 лет, параллельно с техническим улучшением процесса замораживания яйцеклеток, возможность хранения яйцеклеток в немедицинских целях обсуждается и принимается широкими популяционными и экспертными комитетами в США и Европе. Цель социального замораживания состоит в том, чтобы предотвратить возрастное снижение рождаемости, чему широко способствуют центры рождаемости. Наиболее благоприятным репродуктивным возрастом считается период 25–30 лет. После 35 лет показатели наступления беременности снижаются относительно быстро, а показатели выкидышей растут в геометрической прогрессии. После 43 лет шансы забеременеть очень малы [9]. Тем не менее, во всем мире наблюдается тенденция к тому, что женщины решают рожать в старшем возрасте по сравнению с более ранним (20–30 лет назад); средний возраст увеличился с 31,8 до 35,4 за последние 10 лет.

Необходимость сохранения мужской фертильности неуклонно растет в течение последних двух десятилетий. Значительные улучшения были достигнуты в методах лечения рака и других тяжелых хронических заболеваний, что привело к увеличению выживаемости пациентов и, как следствие, потребности в будущем отцовстве. Криоконсервация спермы считается золотым стандартом сохранения фертильности.

Ауто трансплантация ткани яичника, яичка и сперматогониальных стволовых клеток после криоконсервации еще считается экспериментальной и представляет собой многообещающую альтернативу для пациентов препубертатного возраста.

Целью работы является оценка эффективности использования криоконсервированных (замороженных) гамет в программах ВРТ.

Материал и методы

Криоконсервация гамет в рамках данного исследования осуществлялась с помощью витрификации (растворов, содержащих криопротекторы). Витрификация – это процесс сверхбыстрого охлаждения, когда кристаллов льда не образуется. Благодаря такой технологии во время замораживания клетки не травмируются.

Морфологическую оценку яйцеклеток проводили для выявления присутствия/отсутствия цитоплазматических и экстрацитоплазматических аномалий. Гаметы и эмбрионы были идентифицированы под контролем стереомикроскопа (Nicon, Япония). Для инкубации в условиях 5% O₂ использованы инкубаторы COOK (Австралия). Для культивирования эмбрионов до 5-6-х суток эмбрионального развития были использованы среды Vitrolife (Швеция).

Для витрификации ооцитов использованы среды и протоколы Kitozato (Япония), открытые виды носителей CryoTop (Япония). Для витрификации сперматозоидов использованы среды FertiPro (Франция), носители закрытого типа - соломины 0,25 (Франция).

Обработку спермы проводили методом центрифугирования в градиенте плотностей (концентраций 40% и 80% в HEPES-буферном растворе) по стандартной методике производителей культуральных сред FertiPro (Франция). Бластоцисты 5-6-х суток культивирования оценивали по собственной системе оценки развивающихся эмбрионов, принятой в лаборатории ВРТ Клинического госпиталя ИДК, «Мать-и-дитя, Самара».

Для оценки эффективности витрификации (быстрого замораживания) ооцитов было проведено ретроспективное исследование 112 эмбриологических протоколов на базе лаборатории ВРТ Центра лечения бесплодия ЗАО «Медицинская компания ИДК», Россия, Самара, являющейся клинической базой кафедры репродуктивной медицины, клинической эмбриологии и генетики за период 2019-2021 гг. I группу исследования составили пациентки, для лечения бесплодия которых были использованы донорские замороженные ооциты, II группу составили женщины с собственными замороженными ооцитами, которые были накоплены в результате 3-х кратной минимальной стимуляции. Группу контроля составили женщины, где были использованы нативные (свежие) донорские ооциты. Все яйцеклетки оплодотворялись методом ИКСИ. Для анализа эффективности программ ВРТ оценивались следующие ключевые показатели: % оплодотворения, % дорастания до бластоцисты, % дробления % выживаемости; количество и качество (степень зрелости) полученных ооцитов, частота наступления беременности (ЧНБ) и частота имплантации (ЧИ).

Для оценки программы криоконсервации в практике эмбриологических лабораторий используются: процент оплодотворения, процент дробления, процент развития до бластоцисты были рассчитываются в соответствии с The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART Laboratory performance indicators, ESHRE Special Interest Group of embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine (2017):

% оплодотворения = отношение количества ооцитов с 2PN, 2PB/общее количество инъецированных ооцитов $\times 100\%$

% дробления = отношение количества дробящихся эмбрионов 2 дня/общее количество ооцитов с 2PN, 2PB $\times 100\%$

% дорастания до бластоцисты = отношение количества бластоцист/общее количество ооцитов с 2PN, 2PB $\times 100\%$

Статистическую обработку результатов выполняли на компьютере в среде статистических вычислений R (R v.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 одно выборочный тест пропорций с коррекцией непрерывности для больших выборок.

Результат и обсуждение

Криоконсервация женских гамет большинства видов млекопитающих, в отличие от замораживания сперматозоидов и эмбрионов, до сих пор связана с большими сложностями. Поэтому генетические ресурсы чаще сохраняют именно в виде замороженных эмбрионов или сперматозоидов, чем в виде ооцитов (Glenister, Thornton, 2000; Landel, 2005; Agca, 2012).

Одна из основных проблем, возникающих при замораживании женских гамет, – затвердевание прозрачной оболочки (zona pellucida). Эта эластичная гликопротеиновая оболочка окружает яйцеклетку, отделяя ее от окружающей среды, и выполняет ряд жизненно важных функций (Рожкова и др., 2012). После проникновения сперматозоида в ооците запускается каскад биохимических реакций, который вызывает выброс наружу содержимого кортикальных гранул. Эти реакции модифицируют прозрачную оболочку, которая преобразуется в так называемую оболочку оплодотворения, препятствующую полиспермии – проникновению в яйцеклетку более одного сперматозоида. Процессы замораживания-оттаивания приводят к опорожнению кортикальных гранул, затрудняя или делая вовсе невозможным последующее оплодотворение таких ооцитов (Matson et al., 1997).

Другая не менее серьезная проблема заключается в том, что овулировавшие (вышедшие из фолликулов в фаллопиевы трубы) яйцеклетки большинства млекопитающих находятся в состоянии незавершенного мейоза, тонкие механизмы которого часто повреждаются процедурами криоконсервации, что также препятствует дальнейшему оплодотворению. В силу этих причин, методы замораживания ооцитов пока не стали рутинной процедурой даже для таких лабораторных животных, как мыши и крысы [12]. Технологии замораживания и криоконсервации яйцеклеток млекопитающих интенсивно разрабатываются, и, в последнее десятилетие, достигнут существенный прогресс.

Ооцит метафазы II имеет особую структуру (большой размер, очень чувствительный к низкой температуре, чрезвычайно хрупкий, высокое содержание воды, низкое отношение поверхности к объему, присутствие веретена и других клеточных органелл, неоптимальная плазматическая мембрана и т. д.), что приводит к сложным трудностям, связанным с ее криоконсервацией. Решающее значение для событий после оплодотворения в завершении мейоза – формирования второго полярного тела, перемещение пронуклеусов и формирования первого митотического веретена. Демполимеризация и/или отсутствие веретена деления ставят под угрозу способность ооцита оплодотвориться и претерпевать нормальное преимплантационное развитие.

При анализе эффективности витрификации ооцитов в программах лечения бесплодия методами ВРТ мы получили следующие эмбриологические показатели (см. таблица №1, 2).

Судя по полученным данным, показатели дробления и дорастания до бластоцисты выше в группе с использованием свежих ооцитов, что может быть связано с неполным восстановлением веретена деления в ооците после криоконсервации и ограничением физиологических компетенций ооцита. Однако, полученные эмбриологические показатели в группе накопления собственных ооцитов являются удовлетворительными и соответствуют общепринятым стандартам эмбриологической практики. Клинические показатели ХГЧ, ЧНБ, УЗИ не отличаются от мировых показателей для пациентов со сниженным овариальным резервом (АМГ в данной группе $1,1 \pm 0,2$ ng/ml).

Дальнейшее исследование и сравнение показателей в группах пациентов с использованием замороженных донорских и замороженных собственных ооцитов показало преимущество использования донорского материала (таблица №2).

Это может быть связано с тем, что пациенты с использованием донорских ооцитов составляют группу с хорошим прогнозом и более высокой компетенцией ооцитов (доноры <35 лет, имеют ребенка).

Тем не менее, криоконсервация позволяет женщинам накапливать ооциты путем витрификации, позволяя в будущем у лиц с низким ответом иметь собственного здорового ребенка.

Таблица №1. Эмбриологические показатели в группе пациентов с использованием накопленных собственных замороженных ооцитов и нативных ооцитов

Показатели	Группа с накоплением собственных ооцитов	Нативные ооциты (свежие)
Количество случаев	23	36
Средний возраст пациентов, лет	37,8	36,8
АМН (ng/ml)	1,1±0,2	2,1±0,2
Среднее количество ооцитов	6,7	8,6
% выживаемости	81,6%	-
% оплодотворения	75,8%	75,2%
% дробления	85,9%	98,4%
% дорастания до бластоцисты	45,4%	61,9%
Среднее количество эмбрионов на перенос	1,2	1,5
ХГЧ, %	37,5%	46,6%
ЧНБ, %	35,2%	42,7%
ЧИ, %	32,6%	41,2%

Таблица №2. Эмбриологические показатели в группе пациентов с использованием замороженных донорских ооцитов и накопленных собственных замороженных ооцитов

Показатели	Группа с замороженными донорскими ооцитами	Группа с накоплением собственных ооцитов
Количество случаев	53	23
Средний возраст пациентов, лет	39,2	37,8
Среднее количество ооцитов	5,6	6,7
% выживаемости	92%	81,6%
% оплодотворения	89,8%	75,8%
% дробления	98,1%	85,9%
% дорастания до бластоцисты	77%	45,4%
Среднее количество эмбрионов на перенос	1,2	1,2
ХГЧ+	57,6%	37,5%
ЧНБ (частота наступление беременности)	47,8%	35,2%
ЧИ (частота имплантации)	45,3%	32,6%

В последнее время значительный прогресс был достигнут в технологии криоконсервации спермы. Теперь можно добиться более стабильных показателей оплодотворения, используя экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) криоконсервированной спермой. Тем не менее, процедуры замораживания-оттаивания могут сильно ухудшить функцию и выживаемость сперматозоидов и, таким образом, снизить репродуктивную функцию. Кроме того, устойчивость

сперматозоидов к стойкости к криоконсервации, характеризуется высокой индивидуальной изменчивостью.

Замороженная сперма может храниться достаточно долго, но точный период сохранения жизнеспособности сперматозоидов еще не выяснен. Самый долгий срок криоконсервации сперматозоидов, использование которых при оплодотворении привело к здоровой беременности, составляет на сегодняшний день 21 год. Все эти аспекты являются особенно востребованными для пациентов онкологического профиля. Благодаря современным методам лечения, в том числе таргетной медицине, продолжительность жизни увеличивается и, соответственно, потребность в отцовстве.

Всего в лабораторию ВРТ КГ ИДК за 2018-2022 год для криоконсервации обратилось 226 пациентов, из них пациентов онкологического профиля – 13 человек (5,8%). 3 пациентам после замораживания было проведено пробное размораживание. Во всех трех случаях криотолерантность исследованных образцов составила более 30%. В одном случае размороженный материал был использован в программе ИКСИ, получено 3 эмбриона отличного качества. Два эмбриона было перенесено, однако беременности не было получено, от замораживания эмбриона пациенты категорически отказались. Во втором случае пациенты забрали биологический материал и перевезли в др. клинику по месту жительства. В третьем случае материал остался на хранении.

Выживаемость сперматозоидов у пациентов онкологического профиля в рамках проведенного исследования была сопоставима с таковой у пациентов, получающих лечение методами ВРТ (за исключением пациентов с тяжелым мужским фактором). Несмотря на имеющееся тяжелое основное заболевание, которое может быть одной из причин ухудшения качества спермы, криоконсервация позволяет сохранить полученные образцы до начала проведения любого вида гонадотоксичной терапии, оперативного вмешательства и использовать их в будущем для реализации репродуктивной функции.

Заключение

Таким образом, криоконсервация гамет человека может быть использована как для лечения бесплодия, так и для длительного хранения с целью реализации отложенного материнства и отцовства. В связи с чем, следует более активно проводить просветительскую работу среди молодых девушек и юношей, пациентов онкологического профиля, медицинских работников о возможности сохранения биологического материала и его использования в будущем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Sztejn JM, Takeo T, Nakagata N. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. // *Cryobiology* 2018; 82: 57–63. [PubMed]
2. Leibo SP, Sztejn JM. Cryopreservation of mammalian embryos: Derivation of a method. // *Cryobiology*. 2019 Feb; 86:1-9. [PubMed]
3. Mazur P. Principles of cryobiology. In: Fuller B, Lane N, Benson E, editors. // *Life in Frozen State*. New York, NY, USA: CRC Press; 2004. pp. 3–67.
4. Saragusty J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification 2011 Jan; 141(1):1-19. Epub 2010 Oct 25.
5. Kasai M., Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification // *Reprod. Biomed. Online*. 2004. V. 9. № 2. P. 164–170.
6. Mullen S.F., Critser J.K. The science of cryobiology // *Cancer Treat Res*. 2007. V. 138. P. 83–109.
7. Шурыгина, О.В. Ретроспективный анализ 563 эмбриологических протоколов криоциклов: влияние компетенции ооцитов и генетического скрининга эмбрионов человека на результаты витрификации / О.В. Шурыгина, О.В. Иванова, С.Н. Юхимец, С.З. Юлдашева, Д.Ю. Русаков, О.В. Кулакова // *Морфологические ведомости – Morphological Newsletter.* – 2020, Том 28 Выпуск 1.– С. 51-56.
8. Иванова О.В. Оценка эффективности криоконсервации гамет и эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий /О.В. Иванова, О.В. Шурыгина, Д.Ю. Русаков, Т.В. Быкова, А.А. Петрова, С.Н. Юхимец, О.В. Кулакова, С.З. Юлдашев // *Морфологические ведомости – Morphological Newsletter.* – 2019, Том 27 Выпуск 3. – С. 46-50.
9. Cobo A, Kuwayama M, Perez S. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil. Steril.* 2008; 89: 1657-1664

Поступила 19.07.2022