

На правах рукописи

ЛАПИНА
Вера Сергеевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОГРАММ
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ООЦИТОВ ДОНОРА**

3.1.4. Акушерство и гинекология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2023

Диссертация выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Гависова Алла Анатольевна

Официальные оппоненты:

Рудакова Елена Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, научный консультант отделения вспомогательных репродуктивных технологий ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр».

Гзгзян Александр Мкртчичевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения вспомогательных репродуктивных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» Минобрнауки России.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

Защита диссертации состоится 30 января 2024 г. на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова Минздрава России

<https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Lapina%20VS-disser..pdf?2036029551>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Первый ребенок после программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) появился на свет в 1978г, всего через 6 лет Lutjen и коллеги сообщили о рождении первого ребенка с использованием ооцитов донора (Lutjen et al., 1984). На сегодняшний день 10% программ ЭКО проходят с использованием донорского генетического материала и частотой живорождения более 50% (Melnick et al., 2018). С момента начала использования донорских гамет, данные технологии стали неотъемлемым методом лечения в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), что дало возможность реализации репродуктивной функции пациенткам, которые ранее оставались бесплодны. Такие проблемы, как снижение овариального резерва, плохое качество ооцитов, наследственные заболевания, которые не могли найти своего клинического решения, дали начало новому направлению научной и клинической деятельности. Решение этих проблем не только позволило создать успешные программы с использованием донорских яйцеклеток, но также дало возможность получить новые знания для многих направлений ВРТ. Знания о процедуре витрификации эмбрионов и ооцитов, сохранении фертильности, возможности применения овариальной стимуляции в разные фазы менструального цикла, были получены благодаря накоплению клинического опыта и проведению целенаправленных исследований циклов донор-реципиент. Использование гамет донора является не только медицинской проблемой, решаемой в рамках ВРТ, но и имеет значимые морально – этические и юридические аспекты. Не случайно, в ряде стран мира донорские программы не разрешены или значительно ограничены.

Эхографические методы оценки овариального резерва и фолликулогенеза при проведении программ ВРТ являются в настоящее время наиболее часто используемыми и в сочетании с гормональными

исследованиями обеспечивают эффективное и безопасное проведение овариальной стимуляции (Nelson et al., 2014). Дальнейшее повышение эффективности и безопасности в программах ЭКО ассоциируется с внедрением для оценки функции яичников, основанных на 3D – эхографических методах диагностики.

Традиционно овариальная стимуляция при применении ВРТ начинается с первых дней фолликулярной фазы менструального цикла. Но при проведении исследований у потенциально здоровых женщин было выявлено появление двух или трех волн антральных фолликулов диаметром ≥ 4 -6 мм с возможностью проведения овариальной стимуляции в разные фазы менструального цикла (Baerwald et al., 2003).

Тем не менее, до настоящего времени не в полной мере определены протоколы стимуляции, выбор гонадотропинов, методы предотвращения спонтанного пика ЛГ и лютеинизации фолликулов при овариальной стимуляции в лютеиновой фазе. Вместе с этим продолжается поиск наиболее информативных маркеров (гормональных и ультразвуковых) овариального резерва для последующего выбора протокола стимуляции при проведении программ ЭКО в разные фазы менструального цикла, нет данных о плоидности эмбрионов, развившихся из ооцитов, полученных при проведении овариальной стимуляции во вторую фазу менструального цикла, а также о влиянии стимуляции в лютеиновую фазу на эмбриологический этап в циклах донор-реципиент. Также важным и нерешенным вопросом в протоколах ЭКО с применением донорского генетического материала является рациональность выбора между нативными и витрифицированными ооцитами (Pellestor et al., 2003).

В связи с вышесказанным представляется актуальным и перспективным проведение данного исследования.

Цель исследования

Повышение эффективности программ ЭКО с применением донорского генетического материала путем проведения овариальной стимуляции в разные фазы менструального цикла и оценки эффективности лечения при применении витрифицированных и нативных ооцитов.

Задачи исследования

1. Определить частоту использования донорского биологического материала в программах вспомогательных репродуктивных технологий по данным 1-го гинекологического отделения НМИЦ АГП им В.И. Кулакова.

2. Исследовать параметры фолликулогенеза, оогенеза у доноров и раннего эмбриогенеза у реципиентов в зависимости от фазы проведения овариальной стимуляции.

3. Проанализировать динамику концентраций половых гормонов в сыворотке крови при проведении овариальной стимуляции в фолликулярной и лютеиновой фазах менструального цикла у доноров ооцитов.

4. Провести сравнительный анализ использования 2D-эхографии и 3D-объемного сканирования в программах экстракорпорального оплодотворения у доноров ооцитов.

5. Произвести анализ ploидности полученных эмбрионов в зависимости от фазы получения ооцитов при проведении стимуляции яичников в фолликулярной или лютеиновой фазе менструального цикла у донора ооцитов.

6. Осуществить сравнительную оценку частоты наступления беременности у реципиентов в зависимости от фазы получения ооцитов при проведении овариальной стимуляции в фолликулярной или лютеиновой фазе менструального цикла у донора ооцитов с последующим переносом эмбрионов реципиентам в «криоциклах».

7. Провести сравнительную оценку программ донор – реципиент при использовании нативных и витрифицированных ооцитов.

Научная новизна

В данной работе представлена клинико-лабораторная характеристика доноров ооцитов, прошедших овариальную стимуляцию в разные фазы менструального цикла. Изучен гормональный профиль и ультразвуковые аспекты овариальной стимуляции, проведено сравнение информативности 2D и 3D-эхографии на разных этапах стимуляции. Впервые проведена оценка плоидности эмбрионов, культивированных из ооцитов, полученных в разные фазы менструального цикла у доноров ооцитов. Проанализирована эффективность использования витрифицированных и нативных ооцитов при проведении овариальной стимуляции дважды у одного и того же донора.

Практическая значимость

Доказана возможность старта овариальной стимуляции вне зависимости от фазы менструального цикла при необходимости отложенного старта программы с целью синхронизации с реципиентами. Определены условия и период для начала овариальной стимуляции в программе ЭКО в разные фазы менструального цикла. Определены оптимальные протоколы стимуляции, схемы профилактики преждевременного пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) для стимуляции в различные фазы менструального цикла. Определены роль и место 3D-эхографии в протоколе ЭКО в различные фазы менструального цикла. Доказано увеличение эффективности программы донор-реципиент при использовании нативных ооцитов.

Материал и методы исследования

В соответствии с целью исследования и поставленными для ее достижения задачами, на базе 1-го гинекологического отделения

(руководитель – д.м.н. А.А. Гависова) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН Сухих Г.Т.), в период с 2014 г. по 2017 г. были обследованы 152 женщины. 30 доноров ооцитов, прошедших овариальную стимуляцию дважды, 36 реципиентов, использующих ооциты, полученные от доноров при их стимуляции в фолликулярную фазу менструального цикла, и 48 реципиентов, использующих ооциты, полученные в лютеиновую фазу менструального цикла. На первом этапе в данной работе было проанализировано 60 программ овариальной стимуляции у доноров ооцитов и 84 цикла ЭКО/ИКСИ у реципиентов (Рисунок 1).

Таким образом, одному и тому же донору была проведена овариальная стимуляция дважды. Первый раз – в фолликулярную фазу, повторно – через 3-6 месяцев в лютеиновую фазу с последующим оплодотворением и переносом криоконсервированных эмбрионов реципиентам.

В исследовании у части пациентов после овариальной стимуляции в фолликулярную и лютеиновую фазу цикла было проведено ПГТ-А для оценки качества полученных эмбрионов с точки зрения генетического состава и анализа перспективы применения протоколов стимуляции в разные фазы цикла у доноров ооцитов. С этой целью на 5-7 день культивирования эмбрионов производилось рассечение зоны пеллюцида лазерным аппаратом Octax и биопсия трофэктодермы микрохирургическими инструментами TRC. Микропипетки Cook применялись при получении клеток трофэктодермы. При помощи аппаратуры «Agilent» было произведено ПГТ-А методом сравнительной геномной гибридизации на чипе aCGH. Амплификация клеточной ДНК была выполнена методом WGA-PCR (Whole Genome Amplification–Polymerase Chain Reaction) с применением набора PicoPlex SingleCell WGA Kit ("Rubicon Genomics"). Оценка количества и качества ДНК осуществлялась с использованием электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле. Затем меченые ампликоны наносили на биочип Sure Print G3 8x60 aCGH Agilent, гибридизировали в течение 16 часов и производили их анализ с

помощью сканера биологических чипов SureScan Microarray Scanner. Интерпретация полученных данных была реализована благодаря программе Agilent CytoGenomics.

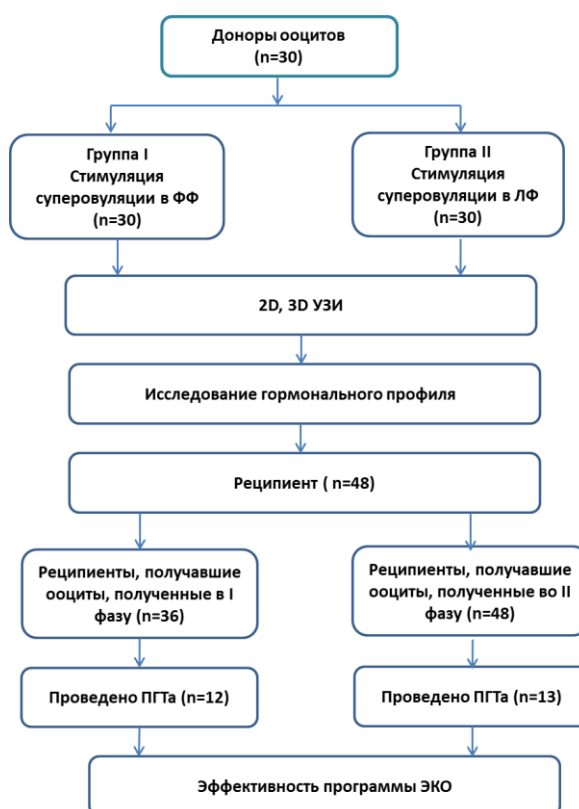


Рисунок 1. Дизайн исследования овариальной стимуляции у доноров ооцитов на первом этапе

На следующем этапе исследования, с целью сравнения эффективности программы ЭКО при использовании витрифицированных и нативных яйцеклеток, было произведено сравнение между I группой (n=30) доноров ооцитов, прошедших овариальную стимуляцию в фолликулярную фазу цикла (Рисунок 1а) и той же группой доноров 1а (n=30), но прошедших овариальную стимуляцию в третий раз через 3-6 месяцев также в фолликулярную фазу цикла с последующей криоконсервацией ооцитов (Рисунок 1б).

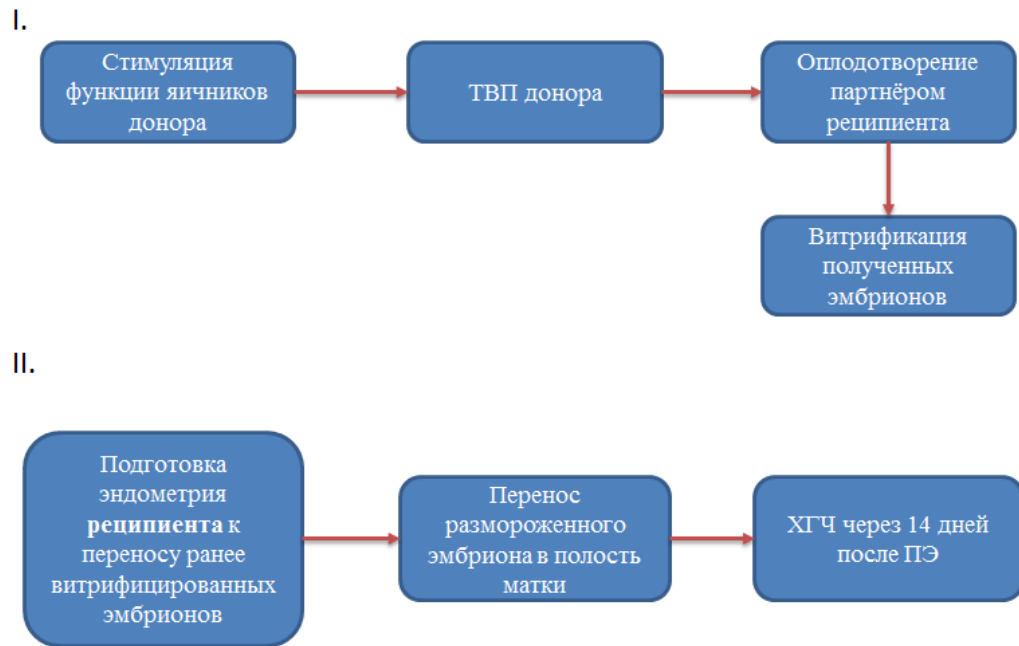


Рисунок 1а. Схема проведения программы ЭКО с нативными ооцитами и предварительной витрификацией эмбрионов (N=30)

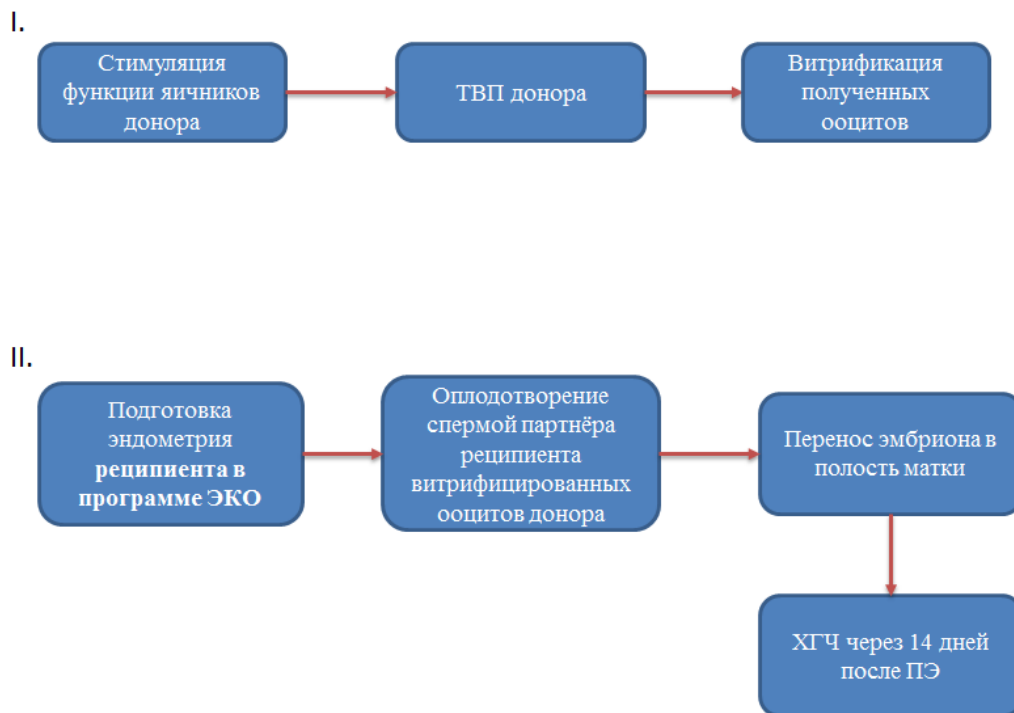


Рисунок 1б. Схема проведения программы ЭКО с витрифицированными ооцитами (N=30)

УЗ-диагностика методом 2D и 3D-эхографии была произведена всем донорам ооцитов на протяжении 60 циклов с целью анализа и сравнения эффективности методик при принятии решения о дне введения триггера овуляции у пациенток с мультифолликулярными яичниками. Для объективности исследования доноров ооцитов поделили на 2 группы в зависимости от метода УЗИ диагностики (2D или 3D) произведенного в день введения триггера овуляции.

В группе А УЗ-мониторинг и принятие решения о дне введения триггера овуляции осуществлялись на основании 2D-эхографии. Данная группа включает в себя 30 доноров ооцитов, из них 15 доноров прошли овариальную стимуляцию в фолликулярную фазу цикла и 15 доноров прошли овариальную стимуляцию в лютеиновую фазу цикла.

В группе В УЗ-мониторинг и принятие решения о дне введения триггера овуляции осуществлялись на основании 3D - эхографии, представленная группа так же включает в себя 30 доноров ооцитов, из них 15 доноров прошли овариальную стимуляцию в фолликулярную фазу цикла и 15 доноров прошли овариальную стимуляцию в лютеиновую фазу цикла:

- 2D-эхография выполнена на аппарате «BK-modical» flexFocus 400 с применением трансвагинального высокоразрешающего датчика с частотой 3,5 и 6,5 МГц;
- 3D-эхография выполнена на аппарате «Voluson E8» с функцией Sono AVC, которая автоматически рассчитывает количество, размер и объем анэхогенных структур и образований на основании объемного изображения.

Все женщины, вошедшие в исследование, соответствовали критериям включения и невключения.

Критериями включения в исследование для доноров ооцитов явились: наличие информированного согласия о готовности участвовать в исследовании, возраст от 18 до 35 лет, концентрация ФСГ <10 мМЕ/мл, значение индекса массы тела (ИМТ) от 18 до 26 (включительно), визуализация

по данным УЗИ более 10 антральных фолликулов в день начала овариальной стимуляции.

Критериями невключения для доноров ооцитов были: соматические и психические заболевания, являющиеся противопоказаниями для вынашивания беременности и родов; острые воспалительные заболевания любой локализации; хронические заболевания любой локализации в стадии обострения; пороки развития органов малого таза, объемные образования органов малого таза.

Критериями включения в исследование для реципиентов явились: возраст от 25 до 49 лет включительно; наличие в анамнезе безуспешных циклов ЭКО/ИКСИ; значение ИМТ от 18 до 29 включительно; информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями невключения для реципиентов были: тубоовариальные образования по данным УЗИ; миоматозные узлы диаметром >5см и/или их центрипетальный рост; выраженные деформации полости матки; пороки развития органов малого таза, в том числе после состояния их хирургической коррекции; выраженная патозооспермия (III-IV степени); психические и соматические заболевания; период обострения хронических заболеваний; острые воспалительные заболевания; злокачественные новообразования.

Методами исследования явились: сбор анамнестических данных и общеклинические методы исследования; оценка овариального резерва; дополнительно в периферической крови определяли концентрации ЛГ, эстрадиола и прогестерона в день начала овариальной стимуляции, на 6 день стимуляции, в день введения триггера овуляции, день ТВП у доноров. На 14-е сутки после ТВП определяли концентрацию бета-ХГЧ у реципиентов; спермограмма супруга (партнера); ультразвуковое исследование органов малого таза методом 2D и 3D – эхографии, овариальная стимуляция, преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии. Все пациенты прошли полное клинико-лабораторное и инструментальное обследование в соответствии с действующими клиническими

рекомендациями «Женское бесплодие» (2021) и Приказом Минздрава России от 31.07.2020 №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Положения, выносимые на защиту

1. Увеличение доли циклов ЭКО с использованием ооцитов донора в структуре программ ВРТ ассоциировано с ростом количества пациенток старшего репродуктивного возраста, вследствие отложенного материнства, а также молодых женщин с оперативными вмешательствами на яичниках в анамнезе и синдромом преждевременной недостаточности яичников.

2. Высокие концентрации прогестерона в сыворотке крови, сопровождающие овариальную стимуляцию в лютеиновой фазе менструального цикла, не оказывают негативного влияния на параметры оогенеза у доноров, а также раннего эмбриогенеза и плоидности бластоцист у реципиентов, что подтверждено одинаковой частотой наступления клинической беременности, прогрессирующей беременности и частотой живорождения.

3. В условиях мультифолликулярного роста, использование 3D-объемной эхографии обладает более высокой диагностической точностью и объективностью при проведении фолликулометрии, что позволяет получить большее количество зрелых ооцитов.

4. Наибольшая эффективность программ донор-реципиент имеет место при оплодотворении нативных ооцитов донора спермой партнера реципиента и витрификацией полученных эмбрионов, с последующим переносом эмбриона в криоцикле.

Личный вклад автора

Автором данной работы была проведена систематизация литературы согласно теме диссертации, произведен сбор и анализ клинико-анамнестических и лабораторных данных 152 пациентов, которые включены

в исследование. Автором лично осуществлялось приглашение женщин для проведения программы ВРТ в качестве доноров ооцитов, с последующим их обследованием, оценкой потенциала фертильности и проведением овариальной стимуляции. Консультирование и сбор анамнеза у супружеских пар, нуждающихся в донорском генетическом материале с последующим подбором фенотипических данных и проведением подготовки эндометрия для переноса эмбриона в полость матки. Лично автором произведен анализ полученных данных с обработкой и интерпретацией для подготовки публикаций.

Апробация работы

Работа обсуждена на межклинической конференции сотрудников 1-го гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 26 августа 2022 г. и на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 19 декабря 2022 г.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты данной работы были внедрены в практическую деятельность 1-го гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 3 научных труда, из которых 3 статьи – в рецензируемых научных журналах.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология. Данные, полученные в настоящем исследовании соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3, 4 и 5 паспорта специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность выполненного исследования определяется достаточным количеством пациенток, включенных в исследование, применением современных методов обследования и статистической обработки данных.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 99 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, содержит 13 рисунков, 14 таблиц. Список литературы включает 78 источников, среди них 3 отечественных и 75 работы зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В 1-м гинекологическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в рамках исследования проведено 152 программы ЭКО.

Донорам ооцитов проведена овариальная стимуляция по протоколу с анТГнРГ дважды в фолликулярную фазу цикла и однократно в лютеиновую фазу цикла. В группе I со 2 дня менструального цикла и до дня введения триггера овуляции донорам ооцитов вводили индивидуально подобранную дозу рекомбинантного ФСГ (Гонал Ф) от 150 до 300 МЕ в сутки и/или человеческого менопаузального гонадотропина (Менопур). В процессе стимуляции дозу корректировали в зависимости от ответа яичников. В фолликулярную фазу при достижении фолликулами диаметра 14 мм для предотвращения преждевременного пика ЛГ донорам ооцитов был введен антагонист ГнРГ (цетрореликс 0,25 мг) до дня введения триггера овуляции включительно. Триггер овуляции (трипторелин 0,3 мг) вводили при наличии в яичниках ≥ 5 фолликулов диаметром ≥ 18 мм (Рисунок 2а). ТВП выполняли спустя 36 часов. Через 3-6 циклов тем же донорам ооцитов после визуализации

признаков произошедшей овуляции по данным гормонального и УЗИ-исследования начинали овариальную стимуляцию в лютеиновую фазу цикла (II группа). Критерием начала стимуляции было наличие в каждом яичнике более 10 антральных фолликулов 3-8 мм в диаметре. Пациенткам вводили индивидуально подобранную дозу рекомбинантного ФСГ (Гонал Ф) от 150 до 300 МЕ в сутки и/или человеческого менопаузального гонадотропина (Менопур) от 150 до 300 МЕ в сутки. Препараты антагониста ГнРГ не применялись. Для предотвращения менструальноподобной реакции назначали норэтистерон (Норколут) в дозе 10 мг с момента достижения доминантными фолликулами 14 мм и до дня введения триггера овуляции. Триггер овуляции (трипторелин 0,3 мг) вводили при наличии в яичниках по данным УЗИ ≥ 5 фолликулов диаметром ≥ 18 мм. ТВП выполнялась через 36 часов после введения триггера овуляции (Рисунок 2б).

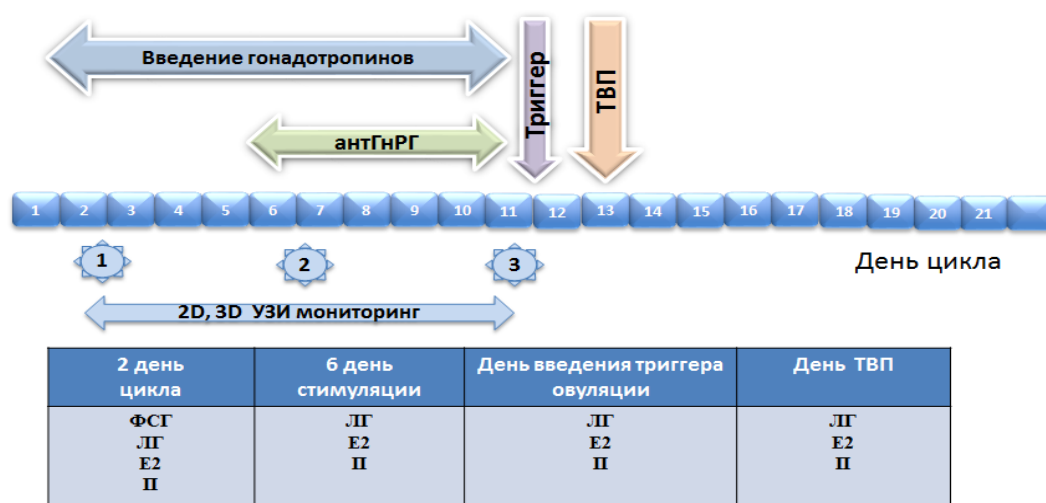


Рисунок 2а. Схема проведения овариальной стимуляции у доноров ооцитов в фолликулярную фазу.



Рисунок 2б. Схема проведения овариальной стимуляции у доноров ооцитов в лютеиновую фазу.

Возраст доноров ооцитов составил 27,7 (4,2) лет, средний индекс массы тела - 21,1 (3,1) кг/м².

Большая часть доноров ооцитов перенесла детские инфекции. Все доноры соматически неотягощены по заключению профильного специалиста. У 3 доноров в анамнезе была произведена лапароскопия по поводу аппендэктомии.

Все доноры имели регулярный менструальный цикл. Средний возраст менархе составил 12,5 (0,5) лет.

Средний возраст реципиентов в I группе составил 38,54 (6,5) лет (фолликулярная фаза), во II группе - 39,53 (5,5) лет (лютеиновая фаза), в Ia группе - 38,78 (6,53) лет (фолликулярная фаза); ИМТ в I группе составил - 24,3 (4,1), во II группе - 23,9 (3,8), в Ia группе - 24,6 (2,9).

При сравнении реципиентов обеих групп статистически значимых различий выявлено не было.

Статистически значимых отличий в продолжительности бесплодия у представленных групп найдено не было, составив 6,3 (3,4) года в I группе, 5,7 (4,1) во II группе, 5,9 (3,8) в Ia группе ($p > 0,05$).

При сравнении параметров проведения овариальной стимуляции в разные фазы менструального цикла не было обнаружено статистически

значимых различий ($p>0,05$): в стартовой дозе гонадотропинов, которая составила в I группе 271,2 (37,2) МЕ, во II группе - 283,7 (32,2) МЕ, ($p>0,05$); суммарной дозе гонадотропинов: в I группе 2556,0 (399,8) МЕ, во II группе 2898,8 (511,5) МЕ ($p>0,05$). При анализе длительности стимуляции – в I группе - 10,1 (0,8) дней, во II группе - 10,8 (1,4) дней ($p>0,05$) также не было выявлено статистически значимых различий; базальная концентрация ФСГ в I группе составила 4,6 (3,2) МЕ/мл, во II группе - 3,8 (2,9) МЕ/мл ($p>0,05$).

В Таблице 1 представлены концентрации гормонов: ЛГ, эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови доноров ооцитов, проходивших овариальную стимуляцию в разные фазы цикла.

Таблица 1 - Концентрации гормонов в сыворотке крови исследуемых групп доноров ооцитов

Гормоны	Группы	День начала стимуляции	бй день стимуляции	День триггера	День ТВП
ЛГ, МЕ/л	I	4,2 (2,6; 5,7)	1,7 (1,2; 2,3)	0,5 (0,2; 1)	2,1 (1; 2,9)
	II	6,3 (5,1; 13,6)	0,8 (0,3; 1,8)	0,3 (0,2; 0,5)	4,9 (2,5; 6,1)
	<i>p</i>	0,01*	0,06	0,48	0,03*
Эстрадиол, пмоль/л	I	99,2 (78,4; 147,5)	3201 (2137; 4310)	9175,5 (6332; 12478)	3850 (3036; 4680,5)
	II	282,5 (211,9; 445,2)	4666 (2026; 5668)	9136 (7309; 14567)	5710 (3302; 6200,5)
	<i>p</i>	<0,001*	0,31	0,48	0,26
Прогестерон, нмоль/л	I	1,7 (1,4; 2,1)	1,7 (1,3; 2,5)	3,5 (2; 5,4)	31,4 (17,7; 47,9)
	II	12,7 (3,9; 23,9)	7,8 (5; 13)	4,5 (3,7; 6,8)	28,6 (12,1; 49,9)
	<i>p</i>	<0,001*	<0,001*	0,05	0,83

Примечание: **p* – значение статистически значимо при сравнении I и II группы

На 1-й день овариальной стимуляции были выявлены статистически значимые отличия для концентраций ЛГ (рис.10), эстрадиола (рис.11) и

прогестерона (Рисунок 12), что обусловлено началом стимуляции в лютеиновую фазу цикла при ультразвуковой диагностике произошедшей овуляции ($p < 0,05$). При анализе тех же значений в последующих точках (на 6-й день стимуляции, день триггера, день ТВП яичников) выявлено постепенное, однако статистически незначимое ($p > 0,05$), увеличение сывороточного эстрадиола между группами, сопровождающее рост фолликулов (Рисунок 11). Концентрация прогестерона (Рисунок 12) была статистически значимо выше в день начала стимуляции ($p < 0,001$) и на 6-й день ($p < 0,001$) во II группе (лютеиновая фаза), что можно объяснить продолжающейся гормональной активностью желтых тел. Однако концентрации прогестерона в исследуемых группах выравниваются в день триггера овуляции, вероятно, в связи с угасанием активности желтых тел. В день ТВП уровни прогестерона также сопоставимы, независимо от фазы менструального цикла, в которую была проведена овариальная стимуляция.

В процессе проведения овариальной стимуляции было выявлено, что диаметр преовуляторных фолликулов методом 3D - эхографии был меньше на 1,1 мм по сравнению с 2D. На основании полученных данных принималось решение о времени завершения введения гонадотропинов у доноров ооцитов. Таким образом длительность стимуляции в группе 3D - эхографии была длиннее на 1 день и сопровождалась статистически значимым увеличением количества зрелых (MII) ооцитов, полученных в день ТВП. Это говорит о более высокой информативности данных при трехмерном измерении фолликулов (Таблица 2).

Полученные данные продемонстрировали, что использование 3D – сканирования обладает большей информативностью для выбора дня введения триггера овуляции, что отражается в большем числе зрелых ооцитов (MII) в день ТВП, а это в свою очередь свидетельствует о приоритетном использовании данного метода исследования в программах донор-реципиент.

Таблица 2 - Параметры фолликулометрии доноров ооцитов

Критерии оценки	А группа (2D) (15 доноров- стимуляция в ФФ; 15 доноров- стимуляция в ЛФ) (n=30)	В группа (3D) (15 доноров- стимуляция в ФФ; 15 доноров- стимуляция в ЛФ) (n=30)	p
Диаметр доминантного фолликула в день введения триггера овуляции	18,4 (6,9)	18,82 (7,7)	0,16
Количество преовуляторных фолликулов в день введения триггера овуляции	16,3 (6,7)	16,9 (7,1)	0,78
Количество зрелых ооцитов МП, полученных в день трансвагинальной пункции	12,5 (4,9)	15,4 (5,2)	0,04*
Длительность стимуляции	9,8 (0,9)	10,9 (1,3)	0,03*

Примечание: * – различия статистически значимы

Особенности визуализации при 2 D и 3 D – эхографии представлены на Рисунке 3а и Рисунке 3б.

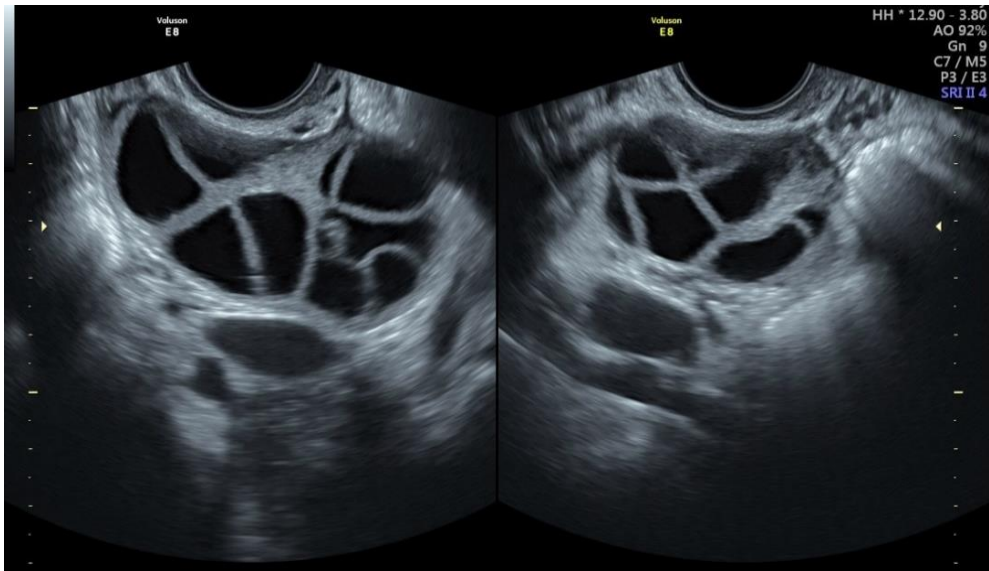


Рисунок 3а. Визуальная иллюстрация 2D - эхографии

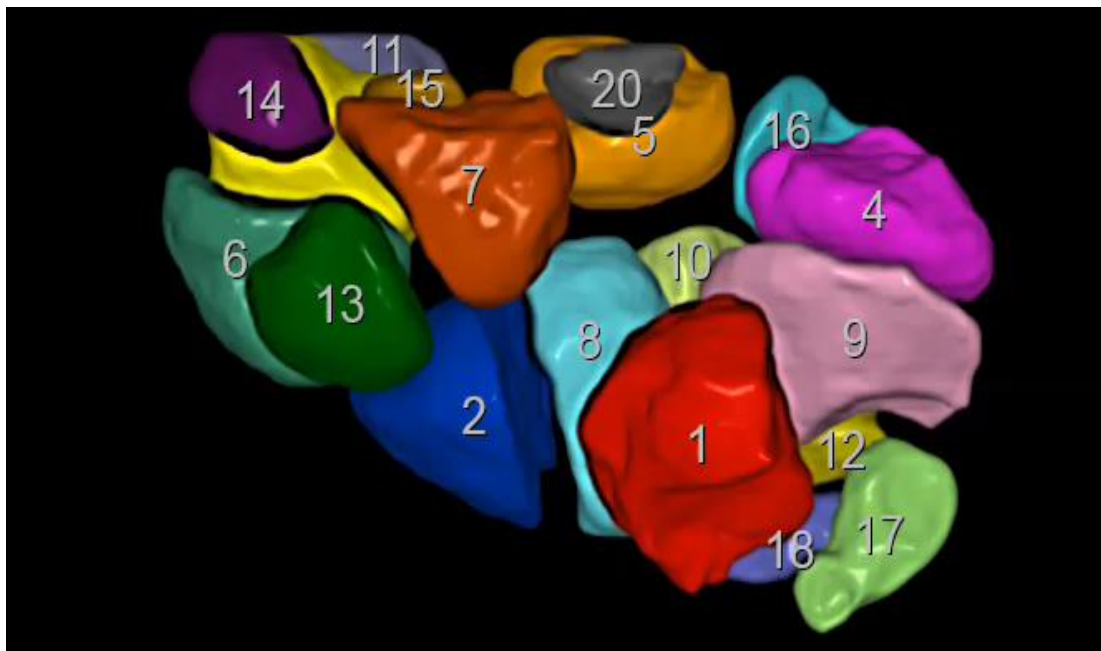


Рисунок 3б. Визуальная иллюстрация 3D – эхографии

При анализе эмбриологического этапа программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) исследуемых групп не было выявлено статистически значимых различий в числе полученных и зрелых ооцитов, числе донированных ооцитов, количестве нормально оплодотворившихся ооцитов и, соответственно, количестве blastocyst, и blastocyst отличного качества, что представлено в Таблице 3.

Таблица 3 - Эмбриологические характеристики программ ВРТ
(ЭКО/ИКСИ)

Параметры	А группа Фолликулярная фаза (n=30)	В группа Лютеиновая фаза (n=30)	Уровень значимости различий между группами, Р I и II
Общее количество ооцитов	15,9 (6,4)	18,5 (7,6)	0,17
Количество зрелых ооцитов (M II)	13,0 (5,6)	14,2 (6,8)	0,51
Среднее число донированных ооцитов на 1 реципиента	6,17 (2,3)	5,7 (2,01)	0,57
Количество нормально оплодотворившихся ооцитов (2PN)	11,0 (4,4)	12,2 (5,3)	0,44
Частота оплодотворения (%)	84,6	85,9	0,08
Количество бластоцист	8,7 (3,7)	9,0 (4,3)	0,84
Количество бластоцист отличного качества	5,3 (2,9)	5,8 (3,1)	0,60
Количество криоконсервированных эмбрионов	6,5 (3,9)	7,5 (3,4)	0,39

Примечание: * – различия статистически значимы

В проведенном исследовании эмбрионам, полученным от 25 доноров ооцитов, было выполнено генетическое тестирование на анеуплоидии методом ПГТ-А за счет личных средств реципиентов, таким образом было проведено ПГТ-А для 152 эмбрионов. Подробная характеристика эмбриологического этапа и оценки плоидности эмбрионов приведена в Таблице 4.

Таблица 4 - Характеристика эмбриологического этапа с оценкой ploидности эмбрионов

Показатель	Эмбрионы, Культивированные из ооцитов, полученных в фолликулярную фазу (n=78)	Эмбрионы, Культивированные из ооцитов, полученных в лютеиновую фазу (n=74)	P
Среднее число эуплоидных бластоцист	1,9 (1,3)	1,7 (1,2)	0,78
Доля эуплоидных бластоцист/ донированный ооцит (%)	30,4	31,8	1,0
Доля эуплоидных бластоцист/зиготу (2PN) (%)	31,8	38	0,56
Доля эуплоидных бластоцист/сбиопсированную бластоцисту (%)	63,6	70	0,78
Частота наступления беременности на перенос эуплоидного эмбриона (%)	66,7 (8/12)	61,5 (8/13)	1,0

Примечание: * – различия статистически значимы

Не было выявлено статистически значимых различий в количестве полученных бластоцист, числе эуплоидных бластоцист, числе эуплоидных бластоцист на донированный ооцит, числе эуплоидных бластоцист на полученную зиготу (2PN), доле эуплоидных бластоцист на сбиопсированную бластоцисту. Таким образом, ооциты, полученные как в фолликулярную, так и в лютеиновую фазы, приводят к сопоставимой частоте получения эуплоидных бластоцист, что свидетельствует о сопоставимой компетенции ооцитов независимо от фазы.

При использовании витрифицированных ооцитов производилась разморозка яйцеклеток и их оплодотворение за 6 дней до переноса эмбриона.

Сравнение эффективности программ ЭКО в циклах донор-реципиент с использованием нативных и витрифицированных ооцитов показало, что применение нативных яйцеклеток является более эффективным, чем

витрифицированных. Частота оплодотворения, количество полученных бластоцист и бластоцист высокого качества была статистически значима выше при использовании нативных ооцитов (Таблица 5).

Наибольшая эффективность программ донор-реципиент имеет место при оплодотворении нативных ооцитов донора спермой партнера реципиента и витрификацией полученных эмбрионов, с последующим переносом эмбриона в криоцикле.

Таблица 5 - Сравнительная оценка эффективности программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) донор-реципиент с использованием нативных и витрифицированных ооцитов

Параметры	I группа (Нативные ооциты) (n=30)	Ia группа (Витрифициро ванные ооциты) (n=30)	P
Общее количество ооцитов, полученных у донора	15,9 (6,4)	16,3 (4,3)	0,17
Среднее число донированных ооцитов на реципиента	6,17 (2,3)	6,8 (3,17)	0,57
Частота оплодотворения (%)	84,6%	55,9%	0,04*
Общее количество бластоцист	8,7 (3,7)	2,9 (1,3)	0,02*
Количество бластоцист высокого качества	5,3 (2,9)	2,1 (0,7)	0,03*

Примечание: * – различия статистически значимы

Таким образом, при размораживании витрифицированных ооцитов частота оплодотворения размороженных ооцитов снижена на 30% по сравнению с оплодотворением нативных ооцитов, в 3 раза меньше количество бластоцист и бластоцист хорошего качества. Полученные данные

свидетельствуют о более низкой эффективности использования витрифицированных ооцитов по сравнению с нативными.

Таблица 6 - Исходы программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) у женщин исследуемых групп при переносе эмбрионов, полученных при оплодотворении нативных ооцитов донора и при оплодотворении витрифицированных ооцитов

Исходы циклов донор-реципиент	Нативные ооциты (n=30)	Витрифицированные ооциты (n=30)	P
Частота наступления беременности на перенос эмбриона, %	52,9 (n=19/36)	31,5 (n=12/38)	0,04*
Частота наступления клинической беременности, %	52,9 (n= 19)	28,9 (n= 11)	0,02*
Частота репродуктивных потерь до 12 недель, %	10,5 (n=2/19)	9 (n=1/11)	0,86
Частота живорождения, %	44,4 (n= 16)	26,3 (n= 10)	0,01*

Примечание: * – различия статистически значимы

При анализе исходов программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) у женщин исследуемых групп были выявлены статистически значимые различия в частоте наступления беременности, частоте прогрессирующей беременности и частоте живорождения при переносе эмбрионов, полученных при оплодотворении нативных ооцитов донора и витрифицированных ооцитов (Таблица 6).

Таким образом, методика оплодотворения нативных ооцитов донора спермой партнера реципиента с последующей криоконсервацией эмбриона и переносом размороженного эмбриона в криоцикле является более эффективной. При использовании витрифицированных ооцитов частота наступления беременности и живорождения значительно снижается.

ВЫВОДЫ

1. Тенденция увеличения числа пациентов позднего репродуктивного возраста с 23% до 38,8% в течение трех лет в программах вспомогательных репродуктивных технологий, обуславливает повышение востребованности в применении ооцитов донора.
2. Стимуляция яичников у доноров ооцитов в фолликулярную и лютеиновую фазы менструального цикла характеризуется сопоставимыми результатами: количеству полученных ооцитов в I группе 15,9 (6,4) во II группе- 18,5(7,6) ($p>0,05$), зрелых ооцитов 13,0 (5,6) и 14,2 (6,8) соответственно ($p>0,05$), количеству нормально оплодотворенных ооцитов 11,0 (4,4) и 12,2 (5,3) ($p>0,05$) соответственно, числу криоконсервированных эмбрионов в I группе 6,5 (3,9), во II группе- 7,5 (3,4) ($p>0,05$).
3. При овариальной стимуляции в лютеиновой фазе менструального цикла не происходит преждевременного пика лютеинизирующего гормона: в I группе - 0,5 (0,2; 1) МЕ/л, во II группе-0,3 (0,2; 0,5) МЕ/л, что может быть связано с протективным влиянием прогестерона, продуцируемого желтым телом, в то же время высокие уровни прогестерона в сыворотке крови при стимуляции в лютеиновую фазу цикла не оказывают негативного влияния на качество получаемых ооцитов.
4. Донорские ооциты, полученные как в фолликулярную, так и в лютеиновую фазы, приводят к сопоставимой частоте получения эуплоидных blastocyst у реципиентов: доля эуплоидных blastocyst/донированный ооцит I группе составила 30,4 %, во II группе - 31,8 % ($p >0,05$).
5. Использование 3D-объемной эхографии обладает более высокой диагностической точностью и объективностью при проведении фолликулометрии, длительность стимуляции в группе 3D-эхографии была длиннее на 1 день и сопровождалась статистически значимым увеличением количества зрелых (MII) ооцитов, полученных в день ТВП (в А группе 12,5 (4,9), во В группе - 15,4 (5,2) ($p=0,04$).

6. Эффективность проведения овариальной стимуляции в разные фазы менструального цикла в рамках программы донор-реципиент сопоставима и не зависит от фазы, в которой были получены донированные ооциты: так частота наступления беременности в I группе составила 52,9%, во II группе - 51% ($p>0,05$); частота клинической беременности (52,9% по сравнению с 51%, $p>0,05$), частота ранних репродуктивных потерь (10,5 % по сравнению с 4,2 %, $p>0,05$), частота живорождения - 44,4 % и 48,9 % соответственно ($p>0,05$).

7. При оценке эффективности проведения программ ВРТ с использованием витрифицированных и нативных ооцитов было выявлено, что частота наступления беременности, частота клинической беременности и частота живорождения статистически значимо выше в группе с нативными ооцитами. Так, частота наступления беременности в I группе составила 52,9%, против Ia группы - 31,5% ($p<0,05$); частота клинической беременности 52,9% по сравнению с 28,9%, ($p<0,05$), частота живорождения 44,4 % и 26,3 % соответственно ($p<0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Донорам ооцитов возможно проведение овариальной стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла.
2. При проведении овариальной стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла следует назначать гестагены при достижении доминантных фолликулов 13-14 мм для блокирования менструальноподобной реакции, что способствует комфорту пациентки.
3. В условиях мультифолликулярного роста, использование 3D-объемной эхографии обладает более высокой диагностической точностью и объективностью при проведении фолликулометрии, что позволяет получить большее количество зрелых ооцитов.
4. При проведении программ ВРТ донор-реципиент, использование ооцитов, полученных в нативном цикле, является приоритетным по сравнению с витрифицированными ооцитами.

5. Для клинического применения определенным преимуществом обладает протокол оплодотворения нативных ооцитов донора с последующей криоконсервацией полученных эмбрионов и переносом в полость матки женщине – реципиенту.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оценка эффективности эхографических методов диагностики в программах экстракорпорального оплодотворения / **Лапина В.С.**, Абубакиров А.Н., Мишиева Н.Г., Богатырева Х.А., Мартазанова Б.А., Гус А.И. // **Акушерство и гинекология.** -2017. -№ 3. - С. 19-24.
2. Гормональный профиль доноров ооцитов при стимуляции яичников в разные фазы менструального цикла / **Лапина В.С.**, Мартазанова Б.А., Дуринян Э.Р., Амян Т.С., Королькова И.А., Гависова А.А. // **Акушерство и Гинекология.** – 2023. - №8. – С.96-102.
3. Эффективность программ донор-реципиент при овариальной стимуляции яичников у доноров ооцитов в разные фазы менструального цикла / **Лапина В.С.**, Мартазанова Б.А., Дуринян Э.Р., Амян Т.С., Королькова И.А., Гависова А.А. // **Акушерство и Гинекология.** – 2023. - №9. – С.107-114.