

**АСФАРОВА**

Гунай Раисовна

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММ  
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ С  
ПОМОЩЬЮ АУТОЛОГИЧНОГО СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
ЭМБРИОНОВ С КЛЕТКАМИ КУМУЛЮСА**

**3.1.4. Акушерство и гинекология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

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:**

**Смольникова Вероника Юрьевна** – доктор медицинских наук, доцент, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова Института репродуктивной медицины, ведущий научный сотрудник

**Официальные оппоненты:**

**Краснопольская Ксения Владиславовна** — член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», отделение репродуктологии, руководитель

**Рудакова Елена Борисовна** — доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр», отделение вспомогательных репродуктивных технологий, научный консультант

**Ведущая организация:**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» Минобрнауки России;

Защита диссертации состоится «19» декабря 2023 г. в 13:00 на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 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/Asfarova%20GR-disser..pdf?629991831>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
д.м.н., профессор**

**Е.А. Калинина**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Как известно, частота наступления беременности после проведения программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в среднем не превышает 30%, несмотря на стремительное развитие и совершенствование методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [Рудакова Е.Б. и др., 2020; Tian et al., 2023].

Нарушение имплантации эмбриона является одной из причин неэффективности лечения бесплодия в программах ВРТ [Borghet M. et al., 2018]. Основными причинами нарушения имплантации, помимо качества самого эмбриона, могут быть снижение рецептивности эндометрия или несостоятельность диалога между эндометрием и эмбрионом. Несмотря на последовательный сложный процесс имплантации, который контролируется различными молекулярными факторами, такими, как сигнальные цитокины, факторы роста, молекулы адгезии [Richani D. et al., 2021], было отмечено, что в процессе разработки различных сред и при культивировании эмбрионов наблюдается разница между развитием в условиях *in vitro* и естественной средой развития эмбрионов. Культивирование эмбрионов в стандартной для них среде происходит при полном отсутствии ростовых факторов и цитокинов, которые содержатся в репродуктивном тракте, что может привести к снижению их жизнеспособности и имплантационного потенциала.

Клетки кумулюса — специализированные клетки, которые окружают и питают ооцит в процессе роста и развития. Кумулюсные клетки играют основную роль в двусторонней передаче сигналов к ооциту, важность данных сигнальных путей для производства жизнеспособных гамет не может быть переоценена [Gao E. et al., 2022]. По данным научных исследований, сокультивирование эмбриона именно с клетками кумулюса может быть особенно эффективно у пациенток с множественными неудачными попытками ВРТ в анамнезе [Cihangir N. et al., 2010]. В проведенных исследованиях была показана более высокая частота имплантации при сокультивировании

эмбриона на слое кумулюсных клеток по сравнению с контрольной группой [Cihangir N. et al., 2010]. Сокультивирование эмбриона с аутологичными клетками кумулюса повышает результативность программ ВРТ за счет положительного влияния кумулюсных клеток на процессы раннего эмбриогенеза и имплантации эмбриона [Kattal N. et al., 2008].

В связи с вышесказанным, представляется актуальным, современным и перспективным исследование по изучению эффективности программ ВРТ с использованием аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса в рамках программы лечения бесплодия пациенток с множественными неудачными попытками ВРТ в анамнезе.

### **Цель исследования**

Изучить эффективность программ лечения бесплодия у пациентов с множественными неудачными попытками ВРТ в анамнезе при использовании технологии аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса и выявление метаболических путей в культуральных средах, обеспечивающих успех имплантации.

### **Задачи исследования**

1. Оценить данные анамнеза, параметры клинического, соматического и гормонального статуса у супружеских пар с множественными неудачными попытками программ ВРТ в анамнезе.
2. Изучить особенности фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза у обследуемых пациенток.
3. Сравнить эмбриологические и клинические результаты при культивировании эмбрионов в двух системах: культивирование эмбрионов в однокомпонентной среде с бикарбонатным буфером без добавления клеток кумулюса и с применением сокультивирования с аутологичными клетками кумулюса при переносе нативного и криоконсервированного/размороженного эмбриона.
4. Определить профиль и уровень метаболитов в средах при культивировании клеток кумулюса и метаболический профиль самих клеток

кумулюса, полученных от женщин с множественными неудачными попытками лечения бесплодия методами ВРТ.

5. Оценить эффективность метода сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса и разработать алгоритм ведения пациенток в программах ВРТ с использованием технологии сокультивирования эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса с учетом полученных результатов.

### **Научная новизна**

В результате проведенного исследования представлены данные об особенностях развития и имплантации эмбрионов при их сокультивировании с аутологичными клетками кумулюса. Показано достоверное увеличение частоты наступления беременности при переносе размороженного эмбриона у женщин моложе 35 лет при сокультивировании. У женщин позднего репродуктивного возраста технология аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса неэффективна. На основании выявленных профилей метаболитов клеток кумулюса в средах культивирования изучены молекулярные пути изменения условий *in vitro* как у молодых женщин, так и у возрастных.

### **Практическая значимость**

Разработан и предложен для клинической практики алгоритм проведения программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с повторными неудачами имплантации в зависимости от возраста женщины и метода культивирования, а именно классическое культивирование и аутологичное сокультивирование с клетками кумулюса как в цикле овариальной стимуляции, так и при переносе криоконсервированного/размороженного эмбриона. При возможности выбора эмбриона для селективного переноса для женщин младше 35 лет предпочтительным является перенос эмбриона после аутологичного сокультивирования с клетками кумулюса, а у женщин старше 35 лет — после классического культивирования.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. У пациентов с двумя и более неудачными попытками лечения бесплодия методами ВРТ в анамнезе, метод сокультивирования с аутологичными клетками кумулюса значительно улучшает качество эмбрионов на 5-е сутки культивирования. Доля бластоцист отличного качества (AA) увеличивается с 24,9% до 36,9% ( $p=0,01$ ).
2. Метод аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса не позволил повысить частоту наступления беременности при переносе нативного эмбриона у молодых женщин, тогда как при переносе криоконсервированного/размороженного эмбриона частота наступления беременности увеличилась почти в два раза (с 26,3% до 48,2 %). У пациенток позднего репродуктивного возраста сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса оказалось неэффективным как при переносе нативного, так и криоконсервированного/размороженного эмбриона.
3. При добавлении в культуральную среду клеток кумулюса достоверно изменяются метаболические пути фруктозы, кофеина, пурина, метионина и цистеина. Оценка метаболомного профиля отработанных культуральных сред от клеток кумулюса женщин старше 35 лет выявила снижение концентрации аминокислот (лейцин, валин, серин) и дипептидов на их основе ( $p=0,046$ ), что может объяснить подавление раннего эмбриогенеза у таких пациенток в программах лечения бесплодия методами ВРТ при использовании технологии аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса.

### **Личный вклад автора**

Автор участвовал в выборе научной темы, разработке цели и задач для ее достижения. Автор принимал участие в обследовании и ведении супружеских пар на всех этапах лечения бесплодия методом ВРТ, сборе материала,

участвовал в выполнении лабораторной части исследования, анализе, а также обобщении и статистической обработке полученных данных.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология.

### **Апробация работы**

Основные положения настоящей диссертационной работы доложены на межклинической конференции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 23 июня 2022 г., апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 05 июля 2023 г.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования внедрены и используются в клинической практике отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Леонова Б.В. (руководитель отделения — доктор медицинских наук, профессор Калинина Е.А.) Института репродуктивной медицины (директор — доктор медицинских наук, профессор Назаренко Татьяна Алексеевна) ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России (директор — академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Сухих Г.Т.). По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, все входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа написана по традиционному академическому плану и изложена на 121 страницах печатного текста. Состоит из обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицами и 6 рисунками.

Библиографический указатель включает 204 литературных источника, из них - 8 русскоязычных и 196 - иностранных.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В настоящее научное исследование было включено 303 супружеские пары, обратившихся по поводу лечения бесплодия в отделение вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель — профессор, д.м.н. Калинина Е.А.), из которых 105 пациенток — с переносом эмбриона в цикле овариальной стимуляции и 198 — с переносом эмбриона в криоцикле. В исследование включали женщин в возрасте до 40 лет с сохранённым овариальным резервом по данным УЗИ и гормонального профиля, а также с отсутствием противопоказаний в соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30 августа 2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Перед началом программы от каждой супружеской пары было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Все пациенты прошли полное обследование перед проведением программы ВРТ.

Для решения поставленных задач пациентки были разделены на 2 группы по типу культивирования эмбриона как в нативных, так и в циклах переноса криоконсервированных/размороженных эмбрионов, а затем стратифицированы по возрасту: 1 группу - женщины, у которых проведено культивирование эмбриона по методике сокультивирования с аутологичными клетками кумулюса с последующим переносом эмбриона в полость матки, 2 группу - женщины, у которых проведено культивирование эмбриона без применения сокультивирования с аутологичными клетками кумулюса с последующим переносом эмбриона в полость матки.

Первый этап работы представлял из себя анализ клинико-лабораторных данных пациентов, которые влияют на результативность программ ВРТ. На втором этапе проводили оценку и сравнение эмбриологических и клинических

параметров. На третьем этапе исследования были изучены метаболомные профили в средах при культивировании клеток кумулюса, полученных от женщин с множественными неудачными попытками лечения бесплодия методами ВРТ.

Овариальная стимуляция у всех пациенток проводилась по протоколу с использованием препаратов гонадотропинов и антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ), стартовая доза гонадотропинов назначалась индивидуально в зависимости от возраста пациентки, ИМТ, параметров гормонального статуса и овариального резерва.

На 5-е сутки в день переноса эмбриона оценивали морфологию эмбриона согласно критериям, рекомендованным РАРЧ. Полученные бластоцисты для дальнейшей оценки и анализа особенностей эмбриологического этапа разделили на группы по морфологическим критериям, которые указаны в таблице 1.

**Таблица 1. Классификация эмбрионов по морфологическим характеристикам**

Качество эмбрионов на 5-е сутки культивирования
1. Отличное (АА)
2. Хорошее (АВ, ВА)
3. Удовлетворительное (ВВ, ВС, СВ)
4. Неудовлетворительное (СС, остановка на стадии дробления)

Из специальных методов обследования в работе использованы:

- оценка качества ооцитов и эмбрионов при помощи световой микроскопии (Nikon TE 300, общее увеличение x400).
- оценка метаболомного профиля отработанных культуральных сред методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС).

Для статистического анализа данных на клиническом этапе исследования использовали возможности программ LibreOffice Calc и SPSS.

Для проверки статистической значимости использовались критерии Стьюдента и Хи-квадрат.

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



**Рис. 1.** Дизайн исследования для решения задачи 2

Для оценки клинических исходов программ лечения бесплодия методами ВРТ при переносе нативного эмбриона в полость матки был разработан дизайн, указанный на рисунке 2.

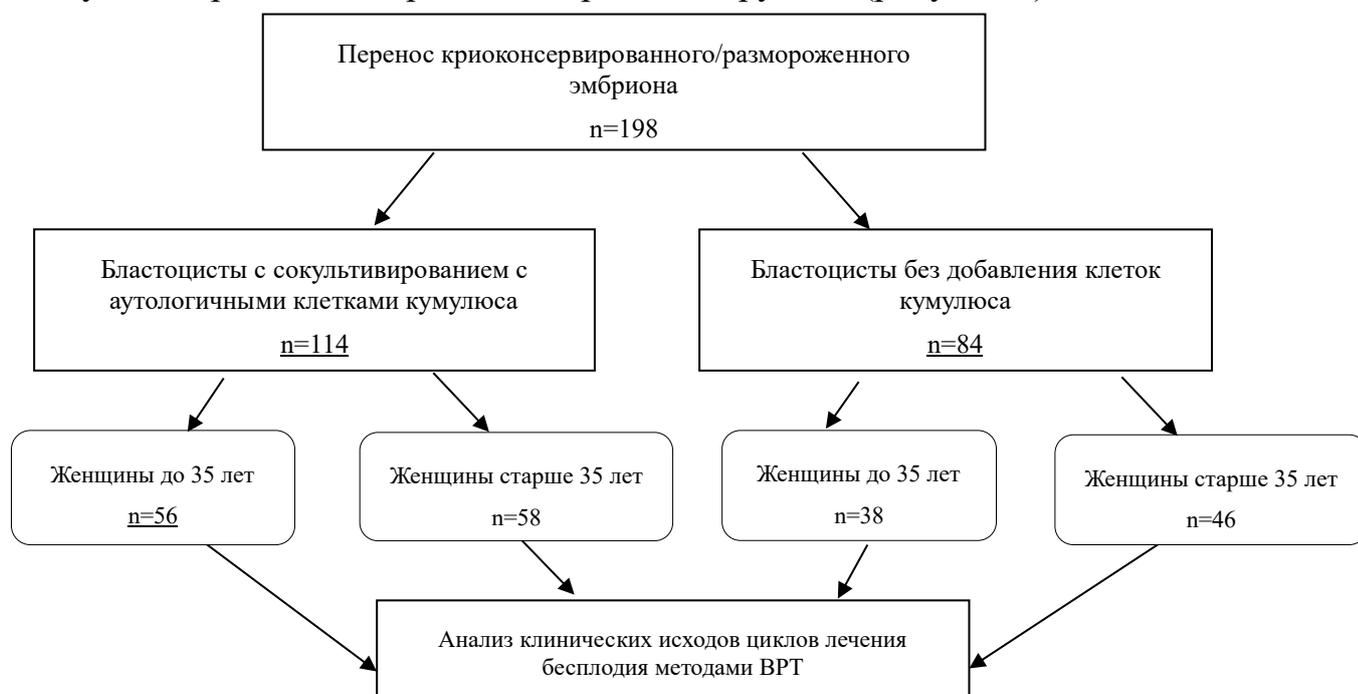
105 пациенткам из 127 супружеских пар был произведен перенос 1 эмбриона в полость матки: 58 - женщинам после сокультивирования в аутологичными клетками кумулюса, 47 - при культивировании без добавления клеток кумулюса. У 22 женщин эмбрионы были криоконсервированы по причине неготовности эндометрия.

Культивирование в обеих группах проводилось в одинаковых сертифицированных средах.



**Рис. 2.** Дизайн исследования для оценки клинической эффективности при переносе нативного эмбриона

Дополнительно были проанализированы исходы переносов криоконсервированных/размороженных эмбрионов при различных типах культивирования и в разных возрастных группах (рисунок 3).



**Рис. 3.** Дизайн исследования для оценки клинической эффективности при переносе криоконсервированного/размороженного эмбриона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования были проанализированы клинико-анамнестические данные пациенток к моменту вступления в программу ЭКО/ИКСИ (таблица 2). Все женщины, включенные в исследование, были сопоставимы по возрасту и индексу массы тела. Средний возраст женщин составил 33 года (30–37 лет), а проведенная оценка антропометрических данных не выявила значимых различий в средних показателях роста и веса пациенток. Рост женщин составил 167 см (160–170 см), вес 60 кг (55–70 кг), индекс массы тела — 21,0 (20–24 кг/м<sup>2</sup>).

Супружеские пары, включенные в исследование, имели в среднем 3 неудачных попытки ЭКО в анамнезе. Факторы бесплодия указаны в таблице 3. Проанализированные данные о менструальной функции (возраст менархе, продолжительность менструального цикла и менструальных кровотечений, а также возраст начала половой жизни) представлены в таблице 4. Все значения представлены в виде медианы и 1-3 квартилей

Таблица 2. **Возрастная и антропометрическая характеристика женщин, включенных в настоящее исследование**

Параметр	n=127	
Возраст женщины, лет*	33 [30; 36,5]	
Рост, см*	168 [164; 170]	
Вес, кг*	60,0 [55; 68]	
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> *	21,0 [20; 23,6]	
Преобладание типа бесплодия, %	I — 52,8% (67/127)	II — 47,2% (60/127)
Количество попыток ЭКО	3 [3; 4]	
Курение, %	1,6% (2/127)	

Примечание: Me [Q25-Q75]

Таблица 3. **Факторы бесплодия у супружеских пар в исследовании**

<b>Параметр</b>	<b>n=127</b>
<b>Факторы бесплодия</b>	
Трубно-перитонеальный фактор бесплодия, %	48,0% (61/127)
НГЭ, %	7,1% (9/127)
Неясный генез, %	3,2% (4/127)
Фактор мужского бесплодия, %	41,7% (53/127)

Примечание: Me [Q25-Q75]

Таблица 4. **Характеристика менструальной функции женщин, включенных в исследование**

<b>Параметр</b>	<b>Включенные в исследование пациентки n=127</b>
Менархе	13 [12,5; 14]
Длительность менструального цикла, дней	28 [28; 30]
Продолжительность менструации, дней	5 [4; 6]
Возраст начала половой жизни	18 [17; 20]

Примечание: Me [Q25-Q75]

Параметры гормонального статуса, полученные в результате предварительного обследования пациенток, включенных в исследование представлены в таблице 5. Полученные данные указывают на наличие у женщин нормального овариального резерва.

**Таблица 5. Гормональные характеристики женщин, включенных в исследование**

<b>Параметр</b>	<b>n=127</b>
ФСГ, МЕ/л*	6,96 (1,92)
ЛГ, МЕ/л	4,86 [3,8; 6,5]
АМГ, нг/мл	1,87 [1,13; 3,31]
Е2, пмоль/л	110 [56,5; 181,0]
Пролактин, мМЕ/л	244 [30;366]
Кортизол, нмоль/л	236,5 [52,4; 398,0]
Тестостерон св., нмоль/л	0,8 [0,4;1,4]
ДГЭА-С, мкмоль/л	5,9 [3,8; 8,5]
ТТГ, мМЕ/л	1,61[1,29;2,37]
Т <sub>4</sub> св, пмоль/л	13,2 [10,8; 14,4]
СТГ, мМЕ/л	1,13 [0,3; 3,1]
17-ОП, нмоль/л	1,7 [0,8;2,4]
Прогестерон, нмоль/л	20,3 [8,8; 40,2]

Примечание: Me [Q25-Q75]; \*M (SD)

Текущая программа лечения бесплодия методами ВРТ у 52,8% пациенток с первичным бесплодием и 47,2% женщин с вторичным бесплодием оказалась третьей по счету; лечение в третьем протоколе ВРТ начали 19,4% и 22,3% женщин, в четвертом — 8,3% и 5,2%, соответственно ( $p>0,05$ ) (таблица 6). Медианное количество неэффективных попыток ВРТ не имело значимых межгрупповых различий и составило в группе первичного бесплодия — 2 [2; 2], в группе вторичного бесплодия — 2 [2;3] ( $p>0,05$ ).

Таким образом, включенные в исследование женщины соответствовали обозначенным критериям включения/исключения, большинство без вредных привычек, распространенность фактора мужского бесплодия — 41,7%, трубно-перитонеального фактора — 48,0%. Женщины были преимущественно молодого репродуктивного возраста с нормальным овариальным резервом. Длительность овариальной стимуляции составила 9 (8; 10) дней, суммарная средняя доза препарата — 1575 МЕ (1262; 2025). Показатели эмбриологического этапа показаны в таблице 7.

Таблица 6. Анамнез бесплодия у пациенток, включенных в исследование

Показатель	Первичное бесплодие n=67	Вторичное бесплодие n=60	p-уровень значимости*
Продолжительность бесплодия, лет	6 [4;9]	5 [3;6]	0,11
Среднее число циклов ВРТ в анамнезе	2 [2;2]	2 [2;3]	0,16
Количество попыток ВРТ в анамнезе (абсолютные значения)			
Две попытки	57	38	p=0,07
Три попытки	7	15	
Четыре попытки	5	2	
Более 4 попыток	1	2	

\* Хи-квадрат

Все нормально оплодотворенные зиготы одной пациентки были поделены на две группы в зависимости от дальнейшего культивирования: группа 1 — сокультивирование с аутологичными клетками кумулюса до 5 суток развития, группа 2 сравнения — классическое культивирование, согласно дизайну исследования, представленного в главе «Материалы и методы». На 5-е сутки культивирования были оценены эмбрионы на стадии бластоцисты в обеих группах (таблица 8).

Таблица 7. Клинические и эмбриологические показатели программ лечения бесплодия у супружеских пар в исследовании

Параметр	n=127
Количество ооцит-кумулюсных комплексов	6 [3; 10]
Кол-во зрелых ооцитов, МП	5 [3; 7]
% получения зрелых ооцитов (МП/всего ооцитов)	82,3 [79,1; 97,4]
Общая концентрация сперматозоидов в 1 мл в день ТВП, млн/мл	72,1 [20, 96]
% прогрессивно подвижных сперматозоидов	38 [29; 74]
% морфологически нормальных сперматозоидов	2 [2; 3]
Количество зигот (2PN2PB)	4 [2; 6]
Количество бластоцист на 5-е сутки культивирования	2 [1; 2]

Примечание: Me [Q25-Q75]

Всего было получено 236 бластоцист в группе сокультивирования и 389 в группе сравнения. При сравнении долей эмбрионов разного качества в зависимости от условий культивирования были получены статистически значимые различия ( $p=0,01$ ). Выявленные различия были обусловлены более высоким процентом эмбрионов «отличного» качества 36,9% (87/236) против 24,9% (97/389) ( $p=0,002$ ) и более низким процентом эмбрионов неудовлетворительного качества 43,2% (102/236) против 50,6% (197/389) при сокультивировании ( $p=0,07$ ) с клетками кумулюса по сравнению с классическими условиями культивирования.

**Таблица 8. Оценка качества клеток трофобласта и внутренней клеточной массы в бластоцистах на 5 сутки культивирования согласно морфологическим критериям при различных вариантах культивирования ( $p < 0,01$ )**

<b>Качество эмбрионов на 5-е сутки культивирования</b>	<b>Группа 1 Сокультивирование с клетками кумулюса n=236</b>	<b>Группа 2 Классическое культивирование n=389</b>	<b>p*</b>
1. Отличное (AA)	36,9% (87/236)	24,9% (97/389)	0,01
2. Хорошее (AB, BA)	11,0% (26/236)	11,8% (46/389)	$p > 0,05$
3. Удовлетворительное (BB, BC, CB)	8,9% (21/236)	12,6% (49/389)	$p > 0,05$
4. Неудовлетворительное (CC, остановка на стадии дробления)	43,2% (102/236)	50,6% (197/389)	$p > 0,05$

Примечание: \*Хи-квадрат

Как показали результаты сравнения, сокультивирование эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса значительно улучшало качество получаемых на 5-е сутки бластоцист, что предоставляло возможность не только проводить селективный перенос одного эмбриона в полость матки, но и повысить количество замороженных эмбрионов для последующих переносов криоконсервированных/размороженных эмбрионов.

Всего было выполнено 105 переносов эмбрионов, из них - 47 после классического культивирования и 58 из группы сокультивирования с клетками кумулюса. Клинические результаты показаны в таблице 9.

**Таблица 9. Частота имплантации/наступления клинической беременности и родов при различных вариантах культивирования эмбрионов**

	<b>Сокультивирование с клетками кумулюса</b>	<b>Классическое культивирование</b>	<b>p</b>	<b>ОР, ДИ</b>
Всего переносов	58	47		
Частота наступления клинической беременности, %	34,5% (20/58)	36,2% (17/47)	0,86	0,97 (95% ДИ 0,67; 1,39)
Частота родов в расчете на беременность, %	80% (16/20)	82,4% (14/17)	0,60	0,93 (95% ДИ 0,45; 1,92)

\* Хи-квадрат и критерий Фишера

Как показывают клинические данные, процедура сокультивирования эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса не показала своей эффективности на общей когорте пациенток. Именно поэтому на следующем этапе женщины были стратифицированы по возрасту. Были выделены следующие подгруппы:  $\leq 35$  лет и  $> 35$  лет (таблица 10).

Как видно из представленных данных, присутствует только тенденция к снижению частоты наступления беременности у пациенток позднего репродуктивного возраста при сокультивировании эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса.

Таблица 10. Частота имплантации/наступления клинической беременности и родов в различных возрастных подгруппах пациенток при различных вариантах культивирования эмбрионов

Возраст женщины	Сокультивирование с клетками кумулюса	Классическое культивирование	p*	ОШ, ДИ
≤35 лет (n=71)				
Частота наступления клинической беременности, %	34,2% (13/38)	33,3% (11/33)	0,94	1,02 (95% ДИ 0,65; 1,61)
Частота родов в расчете на беременность, %	69,2% (9/13)	90,9% (10/11)	0,33	0,59 (95% ДИ 0,31; 1,13)
>35 лет (n=34)				
Частота наступления клинической беременности, %	35,0% (7/20)	42,9% (6/14)	0,73	0,87 (95% ДИ 0,48; 1,59)
Частота родов в расчете на беременность, %	100% (7/7)	66,7% (4/6)	0,10	- (не вычисляется при частоте признака в группе 0 или 100%)

\*Хи-квадрат и критерий Фишера

В виду невозможности расчета кумулятивной частоты наступления беременности у выделенной группы пациенток по причине стратификации зигот на эмбриологическом этапе программы ВРТ, был проведен расчет частоты наступления беременности в программах переноса криоконсервированного/размороженного эмбриона.

Для реализации репродуктивной функции на программу обратились пациентки после неудачной попытки или отмены переноса нативного

эмбриона в цикле ЭКО/ИКСИ. Для получения достоверных результатов и оценки эффективности переноса в естественном цикле или на фоне циклической гормональной терапии было выполнено 198 криопереносов, из них 114 — бластоцисты с сокультивированием с клетками кумулюса, 84 — без сокультивирования.

На первом этапе исследования были проанализированы клиническо-анамнестические параметры супружеских пар в программах переноса криоконсервированных/размороженных эмбрионов. По данным, представленным в таблице 11, группы были сравнимы между собой. Обращает на себя внимание только преобладание сочетанного фактора бесплодия у пациентов с повторными неудачами имплантации в обеих группах (43,8% при аутологичном сокультивировании с клетками кумулюса и 42,9% — в группе классического культивирования).

На следующем этапе работы были проанализированы исходы программ переноса размороженного эмбриона при различных методах его культивирования. Всем пациенткам переносили строго один эмбрион 5-х суток культивирования на стадии бластоцисты. Клинические исходы показаны в таблице 12.

Как видно из представленных данных, частота наступления беременности в циклах переноса криоконсервированного/размороженного эмбриона статистически значимо не различалась между группами и составляла 34,2% для группы сокультивирования и 36,9% для классического культивирования. Сравнение частоты родов также не показало значимой разницы (89,0% и 80,6%,  $p=0,27$ ).

Таблица 11. Клинико-anamнестические параметры супружеских пар в программах переноса криоконсервированных/размороженных эмбрионов.

Параметры	Группа с переносом эмбриона после сокультивирования с аутологичными КК (n=114)	Группа классического культивирования (n=84)	p-уровень значимости
Возраст пациенток, лет*	34 [25;38]	33 [32;37]	0,56
Возраст партнеров, лет*	37 [33;42]	35 [32;40]	0,69
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> *	22 [21;25]	21,6 [20,5;23]	0,75
Продолжительность бесплодия, лет*	4 [2;5]	3 [2;5]	0,09
Попытка*	3 [3;4]	3 [3;4]	0,07
Возраст менархе, лет*	13 [12;14]	14 (13;14)	0,45
Продолжительность менструального цикла, дни *	28 [27;29]	28 [27;29]	0,64
Трубно-перитонеальный фактор (ТПФ)**	20/114 (17,7%)	18/84 (21,4%)	0,49
НГЭ**	3/114 (2,6%)	4/84 (4,8%)	0,42
Мужской фактор (МФ)**	41/114 (35,9%)	26/84 (30,9%)	0,46
Сочетанный фактор**	50/114 (43,8%)	36/84 (42,9%)	0,88
День менструального цикла в день криопереноса*	20 [19;20]	20 [18;20]	0,07
Толщина эндометрия в день переноса эмбрионов, мм*	8,5 [8;9,5]	9 [8;10]	0,09

Примечание: \*данные представлены как медианы с интерквартильным размахом в виде Me [Q25;Q75] с указанием статистической значимости отличий (p) при проведении теста Хи-квадрат, \*\*данные представлены как абсолютные значения и %

**Таблица 12. Частота имплантации/наступления беременности и родов в программах переноса размороженного эмбриона при различных вариантах культивирования**

	<b>Сокультивирование с клетками кумулюса</b>	<b>Классическое культивирование</b>	<b>p</b>	<b>ОР, ДИ</b>
Всего переносов	114	84		
Частота наступления клинической беременности, %	34,2% (39/114)	36,9% (31/84)	0,11	1,307 (95% ДИ 0,93; 1,83)
Частота родов в расчете на беременность, %	89,0% (35/39)	80,6% (25/31)	0,27	1,10 (95% ДИ 0,90; 1,34)

\* *Хи-квадрат и критерий Фишера*

На последнем этапе исследования была выполнена стратификация пациентов по возрасту, выделены группы женщин  $\leq 35$  лет и  $> 35$  лет и проведен расчет тех же параметров исходов программ лечения бесплодия. Результаты указаны в таблице 13.

В группе молодых женщин до 35 лет было выполнено 56 переносов в группе сокультивирования и 38 — без сокультивирования с аутологичными клетками кумулюса. Имплантация эмбриона в полости матки произошла в 39,3% случаев (37/94), из них при аутологичном сокультивировании с клетками кумулюса — у 48,2% женщин данной подгруппы (27/56), и у 26,3% (10/38) в группе без сокультивирования. Данные являются статистически значимыми,  $p=0,03$  (ОР=1,83, 95%ДИ 1,00;3,32). Можно говорить о том, что аутологичное сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса у пациенток молодого возраста ( $\leq 35$  лет) с повторными неудачами имплантации способствует наступлению беременности и может быть использовано как

технология повышения эффективности программ лечения бесплодия методами ВРТ. При этом частота родов статистически значимо не изменилась у таких пациенток и составила 70,3% в группе аутологичного сокультивирования и 90,0% без такового ( $p=0,21$ ).

Анализ данных исходов программ криопереносов в позднем репродуктивном возрасте женщин показал обратную динамику. Всего у женщин старше 35 лет было проведено 104 криопереноса, из них 58 после аутологичного сокультивирования и 46 без такового. Частота наступления беременности при переносе эмбриона после сокультивирования составила 20,6%, без сокультивирования — 41,3% ( $p=0,02$ ; ОР 0,50 95%ДИ 0,27; 0,92). Как видно из представленных данных, частота имплантации в группе возрастных женщин с ПНИ зависит от метода культивирования эмбриона, а аутологичное сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса значительно ухудшает результативность лечения. Частота родов в расчете на беременность при этом статистически значимо не изменилась (таблица 14).

Полученные данные показывают, что достоверно увеличивается частота наступления беременности при сокультивировании аутологичных клеток кумулюса с эмбрионами у молодых пациенток, при этом значимо снижается данный показатель у женщин старшего репродуктивного возраста в программах криопереноса.

Таблица 13. Частота имплантации/наступления клинической беременности и родов в возрастных подгруппах пациенток при различных вариантах культивирования эмбрионов в криопереносах

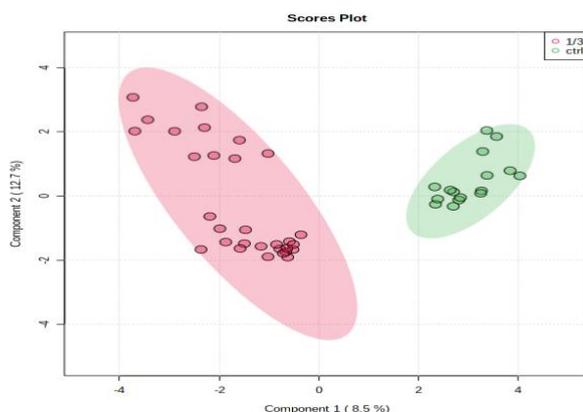
Возраст женщины	Сокультивирование с клетками кумулюса	Классическое культивирование	P*	ОШ, ДИ
≤35 лет (n=94)				
Всего переносов эмбрионов	n=56	n=38		
Частота наступления клинической беременности, %	48,2% (27/56)	26,3% (10/38)	0,04	1,83 (95% ДИ 1,00; 3,32)
Частота родов в расчете на беременность, %	70,3% (19/27)	90,0% (9/10)	0,21	0,26 (95% ДИ 0,29; 2,44)
>35 лет (n=104)				
Всего переносов	n=58	n=46		
Частота наступления клинической беременности, %	20,6% (12/58)	41,3% (19/46)	0,02	0,37 (95% ДИ 0,15; 0,88)
Частота родов в расчете на беременность, %	83,3% (10/12)	89,4% (17/19)	0,62	0,58 (95% ДИ 0,07; 4,85)

\*Хи-квадрат и критерий Фишера

Для исследования особенностей метаболизма клеток кумулюса и их возможного влияния на развитие эмбриона и его способности к имплантации мы исследовали метаболом как самих клеток кумулюса, так и питательных сред в течение 5 дней культивирования. Всего было исследовано 100 образцов,

их них 90 — отработанные культуральные среды от клеток кумулюса и 10 - контрольные образцы среды. Для выявления кластеризации образцов использовался метод многомерной статистики (OPLS-DA), который выявил четкую кластеризацию образцов при сравнении отработанных культуральных сред от клеток кумулюса и контрольных сред (рисунок 4).

Одномерный статистический анализ выявил 65 молекулярных ионов, концентрация которых значительно изменилась в 2 или более раз между группами сред. Для этих ионов была произведена первичная идентификация с помощью базы данных HMDB. Результаты идентификации выявили 32 потенциальных биомаркеров. Обнаружен ряд аминокислот (таких как лейцин, валин, серин) и дипептидов на их основе, концентрация которых в среде с кумулюсными клетками повышена в несколько раз. В то же время для большинства липидов и их производных, обнаруженных в среде, было зафиксировано снижение концентрации.



**Рис. 4.** Многомерный статистический анализ методом OPLS-DA для сравнения группы культуральных сред, содержащих кумулюсные клетки, с контрольными средами без клеток

Далее, молекулярные ионы были использованы для анализа представленности метаболических путей, которые определяют различия между группами. Список наиболее важных метаболических путей представлен в таблице 15.

Обращает внимание высокая представленность метаболизма пуринов, что может указывать на важность этого пути для функционирования клеток

кумуляса. На это также указывает и путь метаболизма кофеина — данный путь, помимо кофеина, включает целый ряд других производных пурина. Кроме того, следует отметить большое количество путей, определяющих метаболизм аминокислот и сахаров, что согласуется с физиологическими функциями кумулюсных клеток.

**Таблица 15. Метаболические пути, наиболее представленные в средах культивирования клеток кумулюса**

	<b>Пересечений</b>	<b>P-value</b>
Fructose and mannose metabolism	6	<b>0.02</b>
Caffeine metabolism	3	<b>0.03</b>
Purine metabolism	11	<b>0.04</b>

Отдельно исследованы возможные различия метаболомного профиля у пациенток возрастных групп до 35 лет и старше 35 лет. Многомерная статистика показала хорошее разделение групп, а одномерная статистика (t-критерий) выявила 57 молекулярных ионов с статистически значимой разницей в концентрациях в 1,5 и более раз между группами. С помощью HMDB был выявлен ряд биомаркеров (таблица 16). Можно отметить, что с возрастом происходят значительные изменения в концентрации важных классов липидов, таких как Фосфатидилхолины, диглицериды, а также N-ацилтаурины, выполняющие роль мессенджеров в различных процессах.

**Таблица 16. Список потенциальных биомаркеров, концентрация которых статистически значимо различается в возрастных группах**

<b>m/z</b>	<b>Название</b>	<b>Кратность изменений</b>	<b>Аддукт</b>	<b>ppm</b>
315,232	7-Дегидропрегненолон	-1,9	M+H	0
455,316	1-альфа,23(S),25-тригидрокси- витамин D3	-2,12	M+Na	5
505,230	Лизофосфатидная кислота(22:6)	-4,46	M+Na	4
520,345	N-ацилтаурин (28:6)	-1,78	M+H	0
568,347	Лизофосфатидилхолин(O-22:6)	-2,5	M+H	12
665,581	Холестериновый эфир((18:2)-O)	-8,23	M+H	8
669,544	Диацилглицерол(38:1)	-4,62	M+Na	1
704,525	Фосфатидилхолин(30:1)	-1,81	M+H	4
780,455	Фосфатидилэтаноламин(38:9)	1,75	M+Na	3

## ВЫВОДЫ

1. Предиктором повторных неудач имплантации являются отсутствие беременностей и родов в анамнезе, возраст пациенток старше 35 лет, наличие сочетанного фактора бесплодия (трубно-перитонеальный фактор, мужской фактор).
2. У супружеских пар с двумя и более неудачными попытками лечения бесплодия методами ВРТ в анамнезе в 41,7% случаев причиной нарушения фертильности является недостаточный сперматогенез у мужчин, что выражается в снижении концентрации, подвижности и морфологического качества сперматозоидов. Среди патологий сперматогенеза у мужчин в супружеских парах с множественными неудачными попытками ВРТ в анамнезе преобладает нарушение подвижности и морфологии мужских гамет (астенотератозооспермия в 37,8%).
3. Аутологичное сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса в программах лечения бесплодия методами ВРТ у пациентов с множественными неудачными попытками позволяет повысить количество blastocyst отличного и хорошего качества, что в свою очередь, способствует выбору эмбриона с максимальным имплантационным потенциалом.
4. В общей когорте пациентов частота наступления беременности при использовании технологии сокультивирования эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса статистически значимо не повышается (34,5% - в группе сокультивирования, 36,2% - при классическом культивировании) при переносе нативного эмбриона в цикле овариальной стимуляции.
5. Аутологичное сокультивирование клеток кумулюса с эмбрионами в программах ВРТ у женщин моложе 35 лет приводит к повышению частоты наступления беременности в криопереносах (48,2%- в группе сокультивирования, 26,3%- при классическом культивировании).

Выявлено достоверное снижение частоты наступления беременности у пациенток позднего репродуктивного возраста (>35 лет) при сокультивировании эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса в криоциклах (20,6% - в группе сокультивирования, 41,3% - при классическом культивировании).

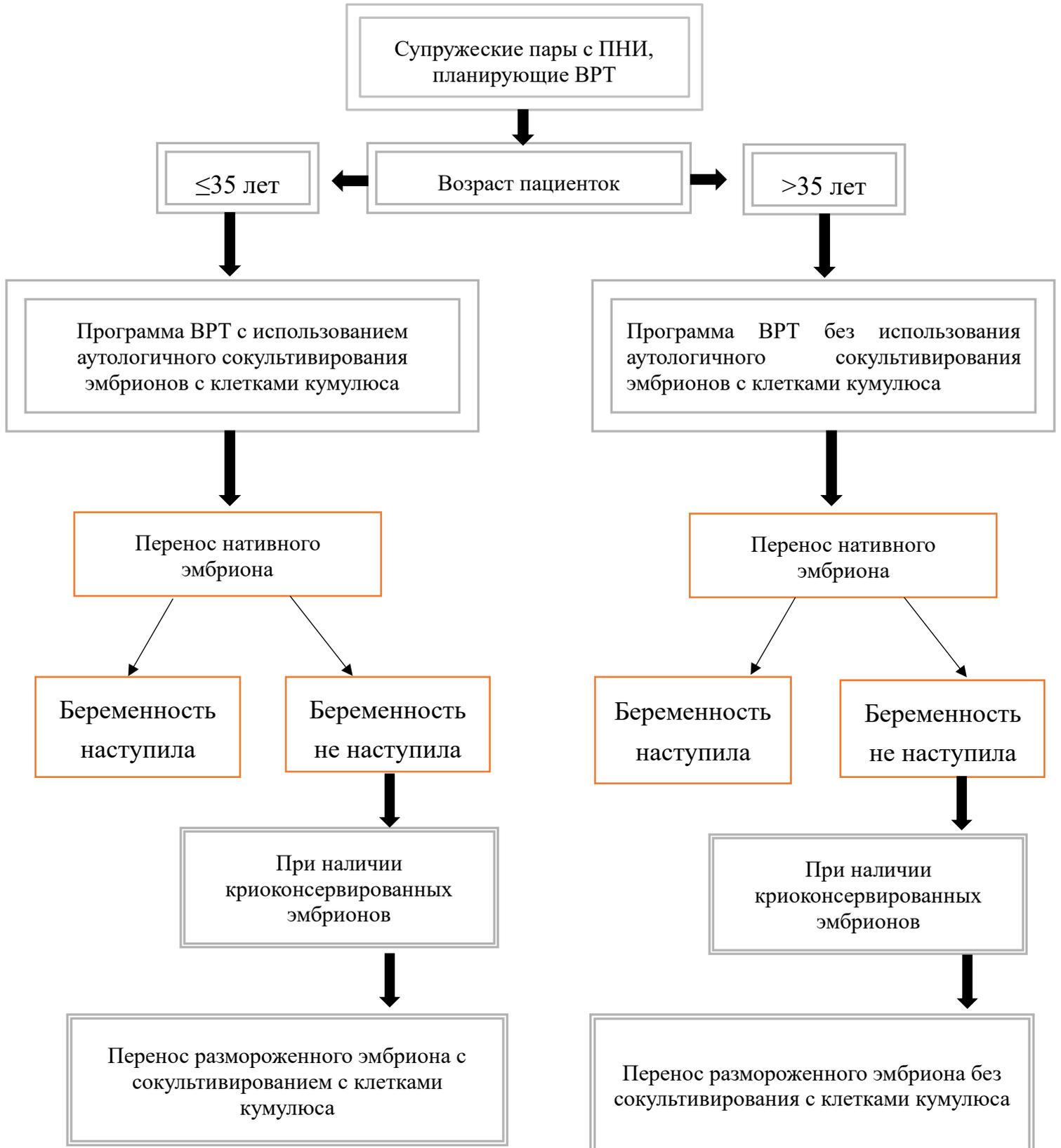
6. При оценке профилей метаболитов отработанных культуральных сред клеток кумулюса выявлены достоверные изменения содержания фруктозы, манозы, пуринов, что свидетельствует об улучшении условий культивирования эмбрионов молодых пациенток и приводит к достоверному увеличению числа бластоцист хорошего и отличного качества.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Применение технологии сокультивирования эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса в программах лечения бесплодия методами ВРТ требует стратификации по возрасту женщин; в общей популяции супружеских пар с множественными неудачными попытками ЭКО в анамнезе применение данной технологии нецелесообразно.
2. Женщинам с повторными неудачами имплантации моложе 35 лет целесообразно рекомендовать технологию сокультивирования эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса для улучшения параметров раннего эмбриогенеза: улучшение качества получаемых на 5-е сутки бластоцист повышения частоты наступления беременности в криоциклах.
3. Пациенткам позднего репродуктивного возраста не рекомендовано проведение сокультивирования эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса в программах лечения бесплодия методами ВРТ, поскольку это не только не приводит к значимым улучшениям параметров программы ВРТ, но и достоверно снижает частоту наступления беременности в криопереносах.

# ПРИЛОЖЕНИЕ 1

## Алгоритм персонафицированного подхода к ведению пациенток с повторными неудачами имплантации



## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Аутологичное сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса в программах ВРТ. / **Асфарова Г.Р.**, Смольникова В.Ю., Макарова Н.П., Бобров М.Ю., Калинина Е.А., Романов Е.А. // **Акушерство и гинекология.** 2018. № 11. С. 10-14.
2. Рождение здорового ребенка в программе вспомогательных репродуктивных технологий после аутологичного сокультивирования эмбриона с клетками кумулюса и новой технологии переноса САТ. Клинический случай. / **Асфарова Г.Р.**, Смольникова В.Ю., Макарова Н.П., Драпкина Ю.С., Сысоева А.П., Лобанова Н.Н., Калинина Е.А. // **Гинекология.** 2021; 23(3); С. 270-274.
3. Клинические и молекулярные аспекты аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса в программах экстракорпорального оплодотворения. / **Асфарова Г.Р.**, Смольникова В.Ю., Макарова Н.П., Бобров М.Ю., Эльдаров Ч.М., Зингеренко Б.В., Калинина Е.А. // **Акушерство и гинекология.** 2023. № 4. С. 97-110.
4. Эффективность лечения бесплодия при переносе криоэмбрионов, полученных при аутологичном сокультивировании с клетками кумулюса у женщин с повторными неудачами имплантации. / **Асфарова Г.Р.**, Смольникова В.Ю., Макарова Н.П., Зингеренко Б.В., Калинина Е.А. // **Акушерство и гинекология.** 2023. № 9. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2023.204>