

Чистякова

Алина Викторовна

**НОВЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ БЕСПЛОДИЯ
МЕТОДАМИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ
РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ С ПОМОЩЬЮ
СЕЛЕКЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ НА КЛЕТКАХ
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:

доктор медицинских наук, доцент **Смольникова Вероника Юрьевна**

Официальные оппоненты:

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

Варганян Эмма Врамовна — доктор медицинских наук, доцент, ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета, профессор кафедры.

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится «21» мая 2024 г. 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/Chistyakova%20AV-disser.pdf?1749547312>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, доктор
медицинских наук, профессор

Е.А. Калинина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Селекция сперматозоидов в женских половых путях крайне сложна и чрезвычайно важна для процессов оплодотворения и развития эмбриона. В настоящее время у человека до конца не изучен молекулярно-биологический механизм дистантного и контактного взаимодействия гамет в силу недоступности материала по этическим причинам. Однако развитие вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) позволяет многие процессы *in vivo* имитировать в чашке Петри, соблюдая морально-этические принципы и, тем самым, способствует пониманию причин бесплодия, особенно на клеточном уровне.

Разработка технологии интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ) позволила многим супружеским парам с нарушениями сперматогенеза у мужчин иметь генетически родного, здорового ребенка. При таком методе оплодотворения выбранная мужская гамета не является физиологически отобранной, так как ИКСИ обходит множественные барьеры, предусмотренные в женских половых путях. Именно поэтому в настоящее время ведутся активные поиски возможности имитировать отбор мужских гамет для ИКСИ, максимально приближенный к условиям в женском репродуктивном тракте. Это позволит улучшить развитие эмбриона *in vitro* и повысить эффективность лечения [Назаренко Т.А. с соавт. 2023].

Показано, что мужские половые клетки отличного качества при дистантном взаимодействии гамет должны реагировать на хемоаттрактанты, выделяемые клетками кумулюса, которые окружают ооцит. Во время естественного оплодотворения только те сперматозоиды, которые пересекают ооцит-кумулюсный комплекс (ОКК), получают возможность достичь яйцеклетки, проникнуть через блестящую оболочку и оплодотворить ее. Если овулировавший ооцит полностью лишен клеток кумулюса, он остается неоплодотворенным. Научные исследования показали, что

сперматозоиды, которые проходят через ОКК, имеют лучшую морфологию и в большей степени осуществляют акросомную реакцию [R. West, A. Coomarasamy, L. Frew et al. 2022]. Кроме того, сперматозоиды имеют более высокую способность к связыванию с блестящей оболочкой и, с большей степенью вероятности, целостную ДНК. Именно поэтому несколькими группами ученых недавно было предложено использовать ОКК для селекции сперматозоидов для ИКСИ [C. Wang, G. Feng, J. Shu et al. 2018, JG. Hamze, M, Jiménez-Movilla, R. Romar 2020]. Авторами показано улучшение эмбриологических показателей программ лечения бесплодия при нарушениях сперматогенеза, однако в работах используются разные дизайны чашек Петри и разные модификации использования клеток кумулюса для селекции мужских гамет, поэтому результаты трудно сопоставить между собой.

В связи с вышесказанным, представляется актуальным, современным и перспективным изучение клинической эффективности метода селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса (КК) на популяции российских супружеских пар, проходящих лечение методами ВРТ.

Степень разработанности темы исследования

Изучение движения сперматозоидов в женских половых путях позволило приблизиться к пониманию механизмов дистантного и контактного взаимодействия половых клеток и тем самым улучшило методы вспомогательных репродуктивных технологий. Убедительно показано, что важным этапом выбора сперматозоидов при естественном оплодотворении является их взаимодействие с окружающими ооцит клетками кумулюса. Данный этап достаточно просто имитировать в условиях *in vitro*, что позволило разработать новые методы выбора сперматозоида в программах лечения бесплодия методами ВРТ. Вместе с этим до сих пор нет доказанных данных, касающихся применения метода селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса на определенных группах супружеских пар с бесплодием. Не определены показания к выбору данной технологии в рамках

программы ВРТ. Дискуссии о преимуществах одного метода выбора сперматозоидов при оплодотворении ИКСИ перед другими до сих пор ведутся. Именно поэтому перспективность изучения взаимодействия гамет в условиях *in vitro*, а также разработка показаний к новым методам ВРТ являются крайне актуальными и востребованными.

Цель исследования

Оптимизация программ лечения мужского и женского бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий с помощью физиологического отбора сперматозоидов на аутологичных клетках кумулюса при оплодотворении методом ИКСИ.

Задачи исследования

1. Провести анализ клинико-anamнестических данных у мужчин и женщин, проходящих лечение бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий.
2. Проанализировать показатели эмбриологического этапа программ вспомогательных репродуктивных технологий с использованием физиологического отбора сперматозоидов на аутологичных клетках кумулюса.
3. Провести оценку клинической эффективности технологии отбора сперматозоидов на ооцит-кумулюсных комплексах у супружеских пар с ИКСИ и отбором сперматозоидов на клетках кумулюса.
4. Выявить группы пациентов, для которых физиологическая селекция сперматозоидов на аутологичных клетках кумулюса клинически наиболее эффективна.
5. Разработать практические рекомендации по применению нового подхода к лечению бесплодия методами ВРТ с помощью технологии отбора сперматозоидов на клетках кумулюса.

Научная новизна

Впервые показана клиническая эффективность технологии селекции сперматозоидов на клетках кумулюса у супружеских пар с выраженной тератозооспермией (0–1% морфологически нормальных мужских гамет в эякуляте) в программах лечения бесплодия методами ВРТ. Установлено, что данная технология позволяет достоверно получить большее число blastocysts, пригодных для переноса в полость матки и криоконсервации, у супружеских пар с таким диагнозом.

Показана и научно подтверждена значимость лекарственных препаратов, используемых для стимуляции функции яичников, при селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса у женщин старшего репродуктивного возраста в программах лечения бесплодия методами ВРТ. В проведенной диссертационной работе научно обосновано повышение частоты имплантации с 17,9% до 44,9% ($p=0,001$) в группе женщин старше 35 лет с использованием в качестве триггера финального созревания ооцитов препарата хорионического гонадотропина человека при селекции сперматозоидов на клетках кумулюса.

На основании полученных клинических и эмбриологических данных показана возможность оптимизации эмбриологического этапа путем отбора сперматозоидов при оплодотворении методом ИКСИ у определенных категорий пациентов с бесплодием.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в результате проведения диссертационного исследования данные позволяют оптимизировать протоколы лечения бесплодия методами ВРТ у супружеских пар с выраженной тератозооспермией (0–1% морфологически нормальных сперматозоидов), повысив частоту оплодотворения и частоту бластуляции при селекции мужских гамет с помощью клеток кумулюса.

Разработаны практические рекомендации по выбору метода селекции сперматозоидов в зависимости от типа используемого триггера финального созревания ооцитов. Женщинам старше 35 лет при назначении препарата хорионического гонадотропина человека для финального созревания ооцитов целесообразно использовать селекцию сперматозоидов на клетках кумулюса для повышения частоты бластуляции.

Полученные в диссертационном исследовании данные позволяют персонифицировать подход к ведению супружеских пар с тератозооспермией (0–1% морфологически нормальных сперматозоидов) в программах лечения бесплодия методами ВРТ.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методология исследования заключалась в системном подходе и комплексном анализе результатов лечения бесплодия пар с фактором мужского бесплодия с применением новой эмбриологической технологии.

В рамках диссертации был проведен критический анализ отечественных и зарубежных работ в области применения различных методов селекции мужских половых клеток при лечении бесплодия методами ВРТ. На основании анализа были сформулированы цель и задачи исследования. В работе научно и клинически обоснованы новые подходы к более совершенным технологиям лечения бесплодия методами ВРТ.

Положения, выносимые на защиту

1. Кумулятивная частота наступления беременности в расчете на один цикл овариальной стимуляции в общей когорте пациентов с бесплодием в программах ВРТ в 1,4 раза выше при переносе эмбриона, полученного при оплодотворении сперматозоидами, отобранными на аутологичных клетках кумулюса, по сравнению со стандартным методом ИКСИ (OR=1,46, 95%ДИ 1,23; 1,73).
2. Возраст женщины в программе лечения бесплодия методами ВРТ является значимым фактором при использовании технологии селекции сперматозоидов с помощью аутологичных клеток кумулюса. Статистически значимо повышается частота бластуляции у пациенток старше 35 лет: с 50% до 55% ($p < 0,05$) при использовании селекции сперматозоидов на аутологичных клетках кумулюса. У молодых женщин данный показатель статистически значимо не различается при сравнении с группой классического ИКСИ.
3. У супружеских пар с выраженной тератозооспермией в программах лечения бесплодия методами ВРТ селекция сперматозоидов с помощью аутологичных клеток кумулюса позволяет достоверно повысить частоту оплодотворения (Me: 100,0% в группе селекции на клетках кумулюса и 77,8% в группе классического ИКСИ, $p = 0,001$) и частоту формирования бластоцист отличного и хорошего качества (Me: 60,0% в группе селекции на клетках кумулюса и 50,0% в группе классического ИКСИ, $p = 0,004$), что позволяет рекомендовать использовать селекцию мужских половых клеток на клетках кумулюса при выраженном факторе мужского бесплодия для повышения эффективности лечения.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в разработке темы диссертационного исследования, постановке цели и формулировке задач. Проводил отбор супружеских пар и клинические этапы лечения бесплодия методами ВРТ, активно участвовал в обследовании и подготовке пациентов к циклу ВРТ. Интерпретировал полученные данные, проводил статистическую и научную обработку, формулировал клиническую и научную значимость результатов исследования. Осуществлял написание научных публикаций по изучаемой проблеме.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Апробация работы

Материалы диссертационной работы доложены на межклинической конференции института репродуктивной медицины (19.10.2023) и апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (25.12.2023).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационной работы используются в практической деятельности отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России на эмбриологическом этапе программ лечения бесплодия методами ВРТ. Полученные материалы также использованы для формирования учебно-методических пособий для репродуктологов и эмбриологов в учебных курсах, проводимых на базе Научно-образовательного центра вспомогательных репродуктивных технологий

имени Фредерика Паулсен-старшего ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. По теме диссертации опубликовано 4 работы в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена в традиционном виде. Состоит из оглавления, списка принятых сокращений, введения, обзора литературы, собственных результатов, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа представлена на 101 странице текста, иллюстрирована 7 рисунками, 18 таблицами. Библиографический указатель включает 92 научные работы, из них 20 отечественные публикации и 72 зарубежные.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 267 супружеских пар, проходивших лечение в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель — профессор, д.м.н. Калинина Е.А.) с января 2020 г. по декабрь 2022 г. Перед началом программы от каждой супружеской пары было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Для решения поставленных задач все супружеские пары были разделены на 2 группы : анализируемую группу составили 130 пациентов (группа 1, КК), которым был произведен отбор сперматозоидов на КК с последующим проведением процедуры ИКСИ. Группу сравнения составили 137 пациентов, которым была выполнена стандартная процедура ИКСИ с отбором сперматозоидов по морфологическим характеристикам (группа 2, ИКСИ). Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



Рис. 1 Дизайн исследования

Все пациенты перед вступлением в программу лечения бесплодия методами ВРТ прошли комплексное обследование согласно приказу Минздрава Российской Федерации от 31 июля 2020 г. №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», которое включало сбор анамнестических данных, клинико-лабораторные и функциональные методы исследования в соответствии с действующими клиническими рекомендациями «Женское бесплодие» (2021).

Критерии включения пациентов в исследование: отсутствие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ согласно действующим регламентирующим документам; возраст женщины от 18 лет до 38 лет; уровень антимюллера гормона (АМГ) в крови женщины больше

или равно 1 нг/мл.; присутствие живых сперматозоидов в эякуляте у партнера не менее 50%; прогрессивная подвижность сперматозоидов в нативном эякуляте PR% не менее 12%; концентрация сперматозоидов не менее 1 млн/мл; проведение оплодотворения методом ИКСИ; подписанное информированное добровольное согласие на участие в исследовании; нормальный кариотип супругов.

Критерии исключения пациентов из исследования: выраженный мужской фактор бесплодия с получением сперматозоидов из ткани яичка; отсутствие гамет в день оплодотворения; тотальное отсутствие оплодотворения; арест раннего эмбриогенеза; СПКЯ; использование донорских половых клеток для оплодотворения; наружный генитальный эндометриоз III и IV стадий распространения; маточный фактор бесплодия; суррогатное материнство; наличие патологии эндометрия, не позволяющее провести перенос эмбриона в полость матки; нарушение кариотипа супругов; соматические и психические заболевания, являющиеся противопоказанием для вынашивания беременности и родов.

Овариальную стимуляцию выполняли по протоколу с препаратами гонадотропинов со 2–3 дня менструального цикла с использованием рекомбинантного ФСГ и/или человеческого менопаузального гонадотропина (ЧМГ) в течение 8–12 дней. В качестве триггера финального созревания ооцитов был использован препарат хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в стандартной дозе 10 000 МЕ п/к или препарат агониста гонадотропин-рилизинг гормона в дозе 0,2 мг п/к. Через 35–37 ч после введения триггера под общим наркозом проводили трансвагинальную пункцию фолликулов (ТВП) под УЗ-контролем.

Параметры спермограммы оценивали в ходе предварительного обследования пары перед программой ВРТ и в день трансвагинальной пункции яичников. Образцы эякулята оценивались на основе критериев 5-го издания ВОЗ «Руководство по оценке и криоконсервации эякулята» (2010 г).

Идентификацию ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) и оценку степени зрелости ооцитов проводили под стереомикроскопом на нагретой до 37°C поверхности стерильного ламинарного бокса.

Все процедуры ИКСИ проводились через 2 часа после трансвагинальной пункции фолликулов.

В качестве основных эмбриологических показателей циклов стимуляции оценивали количество ОКК, зрелых ооцитов (МП), частоту оплодотворения и бластуляции. Под частотой бластуляции понимали отношение числа бластоцист хорошего и отличного качества (количество замороженных бластоцист + число перенесенных эмбрионов) к числу зигот с двумя пронуклеусами.

Перенос эмбрионов осуществляли на 5 сутки культивирования посредством специального катетера СООК (Ирландия). Всем пациенткам был проведен перенос строго 1 эмбриона в полость матки под контролем УЗ. Ведение посттрансферного периода осуществляли по стандартному протоколу с препаратами дидрогестерона в дозе 30 мг/сут перорально со дня трансвагинальной пункции фолликулов. В случае использования в качестве триггера финального дозревания ооцитов препарат а-ГнРГ с целью поддержания функции желтых тел и, соответственно, концентрации уровня прогестерона, пациентке в день переноса эмбриона дополнительно назначали 0,1 мг а-ГнРГ.

На 14-й день после переноса эмбриона пациентки сдавали кровь на содержание в крови бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГ) для диагностики беременности.

Во всех случаях оплодотворения использовали собственные ОКК пациентки. Полученные ОКК и отдельные клетки кумулюса помещали в

культуральную среду (G-IVF, Vitrolife, Швеция) и инкубировали при 37°C, 6,2% CO₂, 5% O₂ в отдельных лунках 4-луночного планшета в ожидании дальнейшего использования. В группе сравнения отрезания клеток кумулюса не проводили. За час до процедуры ИКСИ готовили чашку Петри, показанную на рисунке 2. Собранные КК помещали в область центральной капли. Обработанные сперматозоиды — в крайнюю левую каплю.

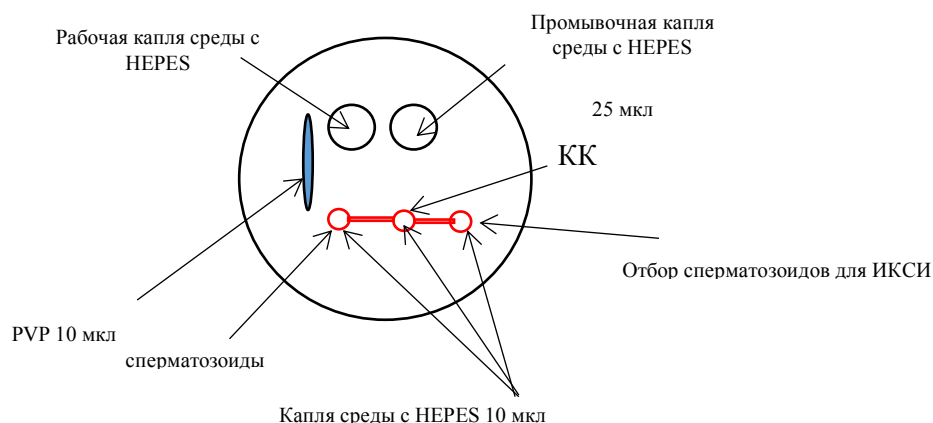


Рис. 2 Дизайн чашки Петри для селекции сперматозоидов на ооцит-кумулюсных комплексах, PVP – поливинилпирролидон для ИКСИ

Статистическая обработка полученных результатов диссертационной работы проводилась с использованием Microsoft Excel и статистического программного обеспечения SPSS 23.0, Statistica 8.0 for Windows (StatSoftInc., USA). Аналитическая статистика выполнялась с использованием t-теста Стьюдента для количественных данных с нормальным распределением. Для сравнения двух независимых непараметрических выборок использовали критерий Манна–Уитни. Значение вероятности $<0,05$ демонстрировало статистическую достоверность.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст пациенток, включенных в исследование, составил 33 (30; 37) для группы 1 (КК) и 35 (31;38) — в группе 2 (ИКСИ). Возраст мужчин в группе 1 (КК) — 35 (31; 41) и группе 2 (ИКСИ) — 36 (32; 42). У всех женщин в настоящем исследовании выявлен женский тип телосложения с правильным развитием вторичных половых признаков. Средний рост пациенток составлял $165,1 \pm 4,1$ см в группе 1 (КК), $161,0 \pm 4,9$ см в группе 2 (ИКСИ). Из 267 женщин у 28 (10,4%) регистрировали избыточную массу тела (12 в группе 1 (КК) и 16 в группе 2 (ИКСИ)), однако ИМТ не превышал $28,7$ кг/м². Таблица 1.

Анализ типа бесплодия и числа предыдущих попыток ВРТ у исследуемых женщин представлен в таблице 2. В группе 2 (ИКСИ) у пациентов было больше неудачных попыток ВРТ в анамнезе (Me: 1 против 2), а в группе 1 (КК) преобладали пары с первичным бесплодием. Именно поэтому было предложено использовать таким пациентам селекцию сперматозоидов на клетках кумулюса, поскольку психологически легче согласиться на новые технологии пациентам без детей и беременностей в анамнезе. По указанным клиническим показателям супружеские пары были сопоставимы между собой.

Таблица 1. – Данные о параметрах телосложения женщин в программах лечения бесплодия анализируемых групп

Группа исследования	Рост, см	Вес, кг	ИМТ, кг/м ²
Группа 1 (КК) n=130	165,1±4,1	61,3±8,4	23,4±2,5
Группа 2 (ИКСИ) n=137	161±4,9	67,1±4,9	26,8±3,2
Всего n=267			

Таблица 2. – Данные по особенностям программ ВРТ и типу бесплодия в анализируемых группах пациентов

Признак	Группа КК n=130	Группа ИКСИ n=137	Уровень значимости, p
Возраст женщины, лет	33 (30; 37)	35 (31; 38)	0,11*
Количество попыток ЭКО в анамнезе	1 (1; 2)	2 (1; 3)	0,06*
Первичное бесплодие	64,6% (84/130)	53,3% (73/137)	0,06**
Вторичное бесплодие	35,4% (46/130)	46,7% (64/137)	0,06 **

**Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом, U-критерий Манна-Уитни; **Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, Хи-квадрат*

В таблице 3 показана структура причин бесплодия у супружеских пар анализируемых групп. Согласно критериям включения, у всех пациентов присутствовал фактор мужского бесплодия в виде снижения показателей эякулята: морфология, концентрация или подвижность сперматозоидов. При этом фактор мужского бесплодия сочетался с женскими гинекологическими заболеваниями, структура которых показана в таблице 3. Различий между анализируемыми группами по структуре женского фактора бесплодия не выявлено.

Таблица 3. – Структура причин бесплодия у супружеских пар анализируемых групп

Причина бесплодия	Группа КК n=130	Группа ИКСИ n=137	Уровень значимости, p
Трубно-перитонеальный фактор	23,1% (30/130)	27,7% (38/137)	0,38
Наружный генитальный эндометриоз I и II стадий распространения	23,1% (30/130)	26,3% (36/137)	0,55
Внутриматочная патология в анамнезе	24,6% (32/130)	32,8% (45/137)	0,14

**Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, Хи-квадрат*

Перед программой лечения бесплодия методами ВРТ была проведена оценка функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы. Результаты гормонального скрининга женщин в

настоящем исследовании показаны в таблице 4. Представленные данные демонстрируют, что гормональный статус обследованных женщин был в пределах нормативных значений.

Таблица 4. – Гормональный статус обследованных женщин в анализируемых группах

Показатель	Группа 1 (КК) n=130	Группа 2 (ИКСИ) n=137	Уровень значимос ти, р
АМГ, нмоль/мл	2,99 (1,71–4,18)	3,02 (2,25–4,99)	0,386
ФСГ, МЕ/л	6,2 (5,3–7,6)	6,0 (5,1–7,5)	0,264
ЛГ, МЕ/л	5,5 (4,3–6,1)	5,6 (4,3–6,4)	0,919
Е ₂ , пмоль/л	137,0 (76,1–224,0)	139,0 (77,5–210,3)	0,661
Пролактин, мМЕ/л	297,1 (199,5–401,5)	274,0 (159,3–323,4)	0,281
Тестостерон, нмоль/л	1,2 (0,8–2,5)	1,3 (0,9–2,7)	0,083
ТТГ, мМЕ/л	2,0 (1,4–2,9)	1,9 (1,5–2,8)	0,062
Т ₄ _{св} , пмоль/л	13,1 (11,3–16,0)	13,2 (11,5–14,9)	0,283

**Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом, критерий U-критерий Манна-Уитни*

Данные, представленные в таблице 4, указывают на отсутствие различий в гормональном профиле обследуемых женщин групп 1 и 2. Характеристика менструального цикла исследуемых групп женщин показана в таблице 5. Статистически значимых различий также не обнаружено.

Таблица 5. – Характеристика менструального цикла у пациенток, включенных в исследование

Показатель	Группа 1 (КК) n=130	Группа 2 (ИКСИ) n=137	Уровень значимости , p
Регулярный менструальный цикл	100% (130)	100% (137)	1,000**
Средняя продолжительность менструации, дней	28,1±2,1	28,4±1,9	0,692*
Средняя длительность менструации, дней	3,9±1,2	4,1±1,5	0,364*

*Данные представлены как $M \pm SD$, t-test; **Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, Хи-квадрат

Клинико-anamnestические данные супругов в анализируемых группах показаны в таблице 6.

Согласно представленным результатам, анализируемые группы статистически значимо не отличались друг от друга ни по возрасту пациенток, ни по клинико-anamnestическим признакам: преобладанию типа

бесплодия (первичное или вторичное), наличием трубно-перитонеального фактора (ТПФ), наружного генитального эндометриоза.

Набранные группы пациентов позволили проанализировать клинические и эмбриологические данные программ лечения бесплодия методами ВРТ с учетом применения новой технологии селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса, что было выполнено на следующем этапе.

Таблица 6.– Характеристика мужчин в программах ВРТ, включенных в исследование

Показатель	Группа 1 (КК) n=130	Группа 2 (ИКСИ) n=137	Уровень значимост и, р
Возраст мужчин, лет	35 (31; 41)	36 (32; 42)	0,944
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	54 (28; 91)	57 (21; 79)	0,631
Процент прогрессивно подвижных сперматозоидов, PR%	51 (39; 72)	46 (38; 71)	0,777
Процент сперматозоидов с нормальной морфологией, %	2 (1; 3)	2 (1; 3)	0,081

**Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом, U-критерий Манна-Уитни*

Клинические и эмбриологические показатели программ лечения бесплодия у супружеских пар с фактором мужского бесплодия с селекцией сперматозоидов на клетках кумулюса

Сравнение полученных эмбриологических данных показано в таблице 7. Видно, что абсолютные количественные показатели эмбриологического этапа (количество зрелых ооцитов, количество

оплодотворившихся клеток, бластоцист хорошего и отличного качества) были статистически значимо выше в группе селекции сперматозоидов на КК. Однако, при оценке в относительных единицах данных характеристик эти различия не подтвердились/сохранились. Отмечалась тенденция к повышению частоты бластуляции в группе селекции сперматозоидов на КК ($p=0,08$).

Таблица 7.– Характеристика эмбриологических параметров программ ВРТ, включенных в исследование

Показатель	Группа 1 (КК) n=130	Группа 2 (ИКСИ) n=137	Уровень значимости, p
Количество полученных ооцит-кумулюсных комплексов	7 (4; 12)	6 (3; 10)	0,08
Количество зрелых МII ооцитов	6 (3; 9)	5 (2; 8)	0,06
Количество зигот (2PN)	5 (2; 8)	4 (2; 6)	0,01
Количество бластоцист хорошего и отличного качества	2 (1; 4)	2 (1; 3)	0,0001
Процент зрелости ооцитов, %	83,33 (70,00; 100,00)	80,00 (66,67; 100,00)	0,89
Процент оплодотворения (2PN2PB), %	100,00 (80,00; 100,00)	100,00 (66,67; 100,00)	0,21
Процент бластуляции, %	50,00 (40,00; 75,00)	50,00 (31,25; 75,00)	0,08

**Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом, U-критерий Манна-Уитни*

Исходы программ ВРТ в анализируемых группах представлены в таблице 8. На основании полученных данных можно говорить о том, что ни частота наступления беременности, ни частота родов не зависят от проведения селекции сперматозоидов на КК в общей популяции супружеских пар с бесплодием.

Таблица 8. – Исходы программ ВРТ (имплантация и роды) в анализируемых группах

	Группа 1 (КК) n=117	Группа 2 (ИКСИ) n=117	Уровень значимости*, р	ОР (95% ДИ)
Частота имплантации в расчете на перенос эмбриона, %	38,5% (45/117)	35,9% (42/117)	0,69	1,07 (95% ДИ 0,77; 1,50)
Частота родов (в расчете на перенос), %	29,9% (35/117)	26,5% (31/117)	0,56	1,13 (95% ДИ 0,75; 1,70)
Частота родов (в расчете на наступление беременности), %	77,8% (35/45)	73,8% (31/42)	0,67	1,05 (95% ДИ 0,83; 1,34)

**Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, Хи-квадрат*

Поскольку частота наступления беременности при расчете на один перенос между группами не различалась, было принято решение на следующем этапе диссертационной работы оценить кумулятивную частоту наступления беременности по всем пациентам, включенным в исследование. Расчет проводили за период с 2020 по 2023 год. В группе с селекцией на клетках кумулюса было выполнено 94 переноса

криоконсервированных/размороженных эмбрионов, в группе ИКСИ — 68 криоциклов. Расчет кумулятивной частоты наступления беременности с учетом криопереносов показан в таблице 9. Как показал анализ, перенос эмбрионов, полученных при оплодотворении сперматозоидами, отобранными на клетках кумулюса, в 1,4 раза чаще приводит к беременности в программах лечения бесплодия методами ВРТ в расчете на овариальную стимуляцию (95% ДИ 1,23; 1,73).

Таблица 9. – Кумулятивная частота наступления беременности в анализируемых группах с 2020 по 2023гг.

	Группа 1 (КК) n=130	Группа 2 (ИКСИ) n=137	Уровень значимости*, р	ОР (95% ДИ)
Число переносов нативных эмбрионов	117	117		
Число криопереносов	94	68		
Кумулятивная частота наступления беременности в расчете на стимуляцию, %	77,6% (101/130)	50,3% (69/137)	0,001	1,46 (95% ДИ 1,23; 1,73)

**Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, Хи-квадрат*

Были проанализированы исходы программ ВРТ в исследуемых группах и подгруппах с учетом использования метода селекции сперматозоидов на КК как среди молодых пациенток (≤ 35 лет), так и среди женщин позднего репродуктивного возраста старше 35 лет. Было установлено, что использование данного метода не влияет ни на частоту наступления беременности, ни на частоту родов. Данные представлены в таблице 10.

Таблица 10. – **Исходы программ ВРТ (имплантация и роды) в изучаемых когортах пациентов**

	Группа 1 КК	Группа 2 ИКСИ	Уровень значимости, р	ОР (95% ДИ)
Возраст ≤ 35 лет	n=74	n=71		
Частота имплантации в расчете на перенос, %	40,5% (30/74)	39,4% (28/71)	0,76	1,03 (95% ДИ 0,69; 1,53)
Частота родов (в расчете на перенос), %	36,4% (27/74)	29,5% (21/71)	0,36	1,23 (95% ДИ 0,77; 1,97)
Частота родов (в расчете на беременность), %	90,0% (27/30)	75,0% (21/28)	0,13	1,20 (95% ДИ 0,94; 1,53)
Возраст 35+ лет	n=43	n=46		
Частота имплантации в расчете на перенос, %	34,9% (15/43)	30,4% (14/46)	0,66	1,15 (95% ДИ 0,63; 2,08)
Частота родов (в расчете на перенос), %	18,6% (8/43)	21,7% (10/46)	0,18	0,85 (95% ДИ 0,37; 1,96)
Частота родов (в расчете на беременность), %	53,3% (8/15)	71,4% (10/14)	0,32	0,75 (95% ДИ 0,42; 1,33)

**Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, Хи-квадрат*

Далее была проведена стратификация супружеских пар в программах ВРТ, включенных в исследование, в зависимости от выраженности нарушений сперматогенеза

Учитывая, что результаты эмбриологического этапа и, как следствие, исходы программ ВРТ, зависят от многих факторов, одним из которых является качество эякулята (количество морфологически нормальных сперматозоидов), было принято решение отдельно оценить данные показатели в группе селекции сперматозоидов на КК с морфологией сперматозоидов 0–1% и 2–3% и сравнить их с аналогичными подгруппами в группе пациентов, которым была выполнена стандартная процедура ИКСИ. Были выделены группы мужчин в зависимости от морфологии сперматозоидов в день трансвагинальной пункции фолликулов 0–1% (n=79) и 2–3% (n=155). Каждая группа была далее поделена на подгруппы в зависимости от типа селекции сперматозоидов в программе ВРТ: классическое ИКСИ (n=117) и селекция на клетках кумулюса (n=117). Количество пациентов в подгруппах сравниваемых групп и результаты оценки эмбриологического этапа представлены в таблице 11.

В результате селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса с последующим проведением стандартной процедуры ИКСИ в когорте пациентов с морфологией сперматозоидов 0–1% было описано статистически значимое повышение процента оплодотворения и процента бластуляции по сравнению с соответствующей подгруппой пациентов, у которых отбор сперматозоидов проводился только на основании морфологических признаков. В когорте пациентов с морфологией 2–3% подобных различий выявлено не было.

Таблица 11. – Результаты сравнения эмбриологического этапа в подгруппах пациентов с разной морфологией и селекцией сперматозоидов на клетках кумулюса

	Группа 1 (КК)	Группа 2 (ИКСИ)	Уровень значимости, p
0-1% морфологии	n=47	n=41	
Процент МП ооцитов, %	83,3 (69,4; 100,0)	83,3 (71,4; 100,0)	0,324
Процент оплодотворения (2PN2PB), %	100,0 (79,2; 100,0)	77,8 (50,0; 100,0)	0,001
Процент бластуляции, %	60,0 (50,0; 92,9)	50,00 (25,0; 60,0)	0,004
2-3% морфологии	n=83	n=96	
Процент МП ооцитов, %	83,3 (70,29; 100,00)	77,4 (66,67; 100,00)	0,401
Процент оплодотворения (2PN2PB), %	96,0 (80,0; 100,0)	100,0 (80,0; 100,0)	0,529
Процент бластуляции, %	50,0 (36,4; 66,7)	50,0 (33,3; 75,0)	0,984

**Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом, U-критерий Манна-Уитни*

Таким образом можно говорить о том, что селекция сперматозоидов с помощью клеток кумулюса представляется перспективной методикой для повышения значимых характеристик эмбриологического этапа именно в данной когорте пациентов. Технология селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса при измененной морфологии мужских гамет, по всей видимости, позволяет отобрать более фертильные гаметы, которые способны активировать ооцит, давая начало формированию зиготы, и стимулировать развитие раннего преимплантационного эмбриона до более поздних стадий, в частности, до стадии бластоцисты, что так же указывает на больший фертильный потенциал отобранной мужской половой клетки.

Исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ у выделенных по морфологии подгрупп показаны в таблице 12. Как видно из представленных данных, исходы программ лечения у выделенных подгрупп достоверно не различаются.

Таким образом, путем селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса при тератозооспермии у мужчины удастся улучшить эмбриологический этап программы ВРТ, но ни частота наступления беременности, ни частота живорождения достоверно не повышаются. Данные результаты позволяют говорить о том, что при использовании клеток кумулюса для отбора мужских гамет при выраженной тератозооспермии удастся повысить число бластоцист, пригодных для переноса в полость матки и криоконсервации и снизить суммарное число процедур овариальной стимуляции у женщин в расчете на живорождение (повысить кумулятивную частоту наступления беременности из расчета на один цикл овариальной стимуляции). Улучшение показателей эмбриологического этапа дает больше шансов и при селекции эмбрионов на перенос, что также способствует повышению эффективности лечения.

Таблица 12. – Исходы программ ВРТ (имплантация и роды) в группах, стратифицированных по тяжести нарушений сперматогенеза

	Группа КК	Группа ИКСИ	Уровень значимости, р	ОР (95% ДИ)
0-1% морфологии	n=44	n=35		
Частота имплантации в расчете на перенос, %	31,8% (14/44)	25,7% (9/35)	0,55	1,24 (95% ДИ 0,61; 2,52)
Частота родов (в расчете на беременность), %	71,4% (10/14)	77,8% (7/9)	0,74	0,92 (95% ДИ 0,57; 1,49)
2-3% морфологии	n=73	n=82		
Частота имплантации в расчете на перенос, %	42,5% (31/73)	40,2% (33/82)	0,78	1,06 (95% ДИ 0,73; 1,54)
Частота родов (в расчете на беременность), %	80,6% (25/31)	72,7% (24/33)	0,46	1,11 (95% ДИ 0,85; 1,45)

**Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, Хи-квадрат*

ВЫВОДЫ

1. В общей когорте пациентов с бесплодием в программах ВРТ использование отбора сперматозоидов с помощью клеток кумулюса достоверно не увеличивает частоту имплантации эмбриона в полости матки (38,5% в группе КК против 35,9% в группе ИКСИ). Частота успешных родов из расчета на беременность при селекции сперматозоидов на клетках кумулюса не изменяется в общей популяции супружеских пар с бесплодием в программах ВРТ (77,8% в группе КК против 73,8% в группе ИКСИ).
2. Эффективность лечения бесплодия методами ВРТ с использованием селекции сперматозоидов на аутологичных клетках кумулюса статистически значимо выше при анализе кумулятивной частоты наступления беременности в расчете на 1 цикл овариальной стимуляции (с 50,3% до 77,6%, $p < 0,05$).
3. У пациенток позднего репродуктивного возраста (старше 35 лет) развивается достоверно большее число бластоцист на 5 сутки культивирования при селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса в программах оплодотворения методом ИКСИ ($p = 0,03$).
4. Частота оплодотворения достоверно увеличивается при использовании сперматозоидов, отобранных на аутологичных клетках кумулюса, у пациентов с выраженной тератозооспермией 0–1% ($p = 0,001$).
5. Применение технологии отбора сперматозоидов на клетках кумулюса достоверно приводит к увеличению числа эмбрионов хорошего и отличного качества при тератозооспермии 0–1% по сравнению с классическим оплодотворением методом ИКСИ (Me; с 50% до 60%, $p = 0,04$).

6. При тератозооспермии 2–3% у мужчин использование технологии селекции сперматозоидов на клетках кумулюса не приводит к значимым результатам и повышению эффективности лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для увеличения кумулятивной частоты наступления беременности в расчете на 1 цикл овариальной стимуляции в программах лечения бесплодия методами ВРТ целесообразно применять технологию селекции сперматозоидов на аутологичных клетках кумулюса у супружеских пар с неудачными попытками в анамнезе и факторе мужского бесплодия.
2. При решении вопроса о методе селекции сперматозоида для последующего проведения ИКСИ в программах лечения бесплодия методами ВРТ у супружеских пар с мужским фактором бесплодия необходимо учитывать степень выраженности тератозооспермии и возраст женщины.
3. Супружеским парам при лечении бесплодия методами ВРТ с мужским фактором бесплодия при тератозооспермии 0–1% следует рекомендовать селекцию сперматозоидов на клетках кумулюса для последующего ИКСИ для увеличения частоты оплодотворения и наступления беременности.
4. Женщинам позднего репродуктивного возраста, имеющим неэффективные программы ВРТ в анамнезе с сохраненным овариальным резервом и субфертильной спермой супруга, целесообразно применить отбор сперматозоидов на клетках кумулюса при ИКСИ для увеличения числа бластоцист хорошего и отличного качества.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Возможности повышения эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий с помощью селекции сперматозоидов на ооцит-кумулюсных комплексах. / **Чистякова А.В.**, Макарова Н.П., Лобанова Н.Н., Смольникова В.Ю. // **Акушерство и гинекология.** 2022. № 5. С. 30-34.
2. Рождение здорового ребенка у супружеской пары с множественными неудачными попытками ВРТ в анамнезе путем селекции сперматозоидов на ооцит-кумулюсных комплексах. Клинический случай. / **Чистякова А.В.**, Бабаян А.А., Довгань А.А., Макарова Н.П., Лобанова Н.Н., Смольникова В.Ю. // **Гинекология.** 2023; Т.25 №3; С. 364-367.
3. Результаты лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий с использованием селекции сперматозоидов на ооцит-кумулюсных комплексах. / **Чистякова А.В.**, Макарова Н.П., Непша О.С., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А. // **Акушерство и гинекология.** 2023. № 5. С. 92-99.
4. Влияние препаратов, применяемых в качестве триггера овуляции и возраста женщины на исходы программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий с использованием селекции сперматозоидов на ооцит-кумулюсных комплексах. / **Чистякова А.В.**, Макарова Н.П., Непша О.С., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А. // **Акушерство и гинекология.** 2023. № 6. С. 99-106.