

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

На правах рукописи

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

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Научный руководитель:

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

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	14
ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У СУПРУЖЕСКИХ ПАР С НАРУШЕНИЯМИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА.....	15
1.1. Супружеские пары с фактором мужского бесплодия в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий.....	15
1.2. Взаимодействие женских и мужских половых клеток при оплодотворении у человека <i>in vivo</i>	17
1.3. Особенности лечения супружеских пар с фактором мужского бесплодия: клинические преимущества и ограничения методов селекции сперматозоидов	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1. Материал исследования.....	33
2.2. Критерии включения и исключения	33
2.3. Дизайн исследования	34
2.1. Соблюдение этических норм.....	38
2.2. Методы исследования.....	38
2.2.1. Обследование супружеских пар для вступления в программу лечения бесплодия методами ВРТ	38
2.2.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза	42
2.2.3. Протокол стимуляции яичников и получение ооцитов	42
2.2.4. Анализ эякулята и подготовка сперматозоидов к экстракорпоральному оплодотворению.....	43
2.2.5. Эмбриологический этап и морфологическая оценка эмбрионов ...	44
2.2.6. Перенос эмбриона в полость матки	45
2.2.7. Диагностика наступления беременности.....	46
2.3. Протокол селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса	46
2.4. Статистические методы обработки полученных данных	48

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	49
3.1. Клинико-anamnestическая характеристика супружеских пар, включенных в программы лечения бесплодия методами ВРТ	49
3.2. Клинические и эмбриологические показатели программ лечения бесплодия у супружеских пар с фактором мужского бесплодия с селекцией сперматозоидов на клетках кумулюса	55
3.3. Результаты лечения бесплодия методами ВРТ с селекцией сперматозоидов с помощью кумулюсных клеток в зависимости от возраста женщины.....	58
3.4. Стратификация супружеских пар в программах ВРТ, включенных в исследование, в зависимости от выраженности нарушений сперматогенеза	66
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	71
ВЫВОДЫ.....	85
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	86
АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТЕХНОЛОГИИ СЕЛЕКЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОК КУМУЛЮСА	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	88

ВВЕДЕНИЕ

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 выполнении данной процедуры клинический эмбриолог проводит обработку эякулята в градиенте плотностей и для инъекции использует подвижный, морфологически нормальный сперматозоид. При таком методе оплодотворения выбранная мужская гамета не является физиологически отобранной, так как ИКСИ обходит множественные барьеры, предусмотренные в женских половых путях. В частности, не используются ни хемотаксис, ни реотаксис — отбор по молекулярным особенностям мембраны и паттернам движения. Более того, при тератозооспермии (снижение в эякуляте морфологически нормальных сперматозоидов) повышается риск использования для ИКСИ «плохого» мужского материала, что приводит к отсутствию оплодотворения, аресту раннего эмбриогенеза и множественным неудачным попыткам ВРТ. Литературные данные подтверждают, что при

выраженном факторе мужского бесплодия (повышенная фрагментация ДНК сперматозоидов, тератозооспермия) и проведении ИКСИ клинический и эмбриологический этап программы лечения имеют низкие показатели — снижение частоты оплодотворения, дробления, бластуляции, euploidности и имплантации эмбриона в полости матки [1, 20, 18, 30]. 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 [2].

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. ОКК представляет собой сложную структуру, основным компонентом которой является гиалуроновая кислота (ГК), которая синтезируется клетками кумулюса после повышения уровня лютеинизирующего гормона (ЛГ) и, как считается, играет ключевую роль в отборе здоровых сперматозоидов [10, 11]. Именно на взаимодействии ГК и сперматозоидов основан метод ПИКСИ (отбор мужских половых клеток по связыванию с ГК в чашке Петри). Научные исследования показали, что сперматозоиды, которые проходят через ОКК, имеют лучшую морфологию и в большей степени осуществляют акросомную реакцию [83]. 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 [31, 47]. 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-анамнестических 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.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

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 персонализировать подход к ведению супружеских пар с тератозооспермией (0–1% морфологически нормальных сперматозоидов) в программах 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 (ОР=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 «Акушерство и гинекология».

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Достоверность полученных результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования и их решением, использованием современных микроскопических, эмбриологических и клинических методов, достаточным объемом выборки пациентов, корректной статистической обработкой, критической оценкой полученных результатов при сравнении их с данными современной научной литературы.

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).

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.

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.

ПУБЛИКАЦИИ

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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

аГнРГ	аналоги (агонисты) гонадотропин-рилизинг гормона
АМГ	антимюллеров гормон
антГнРГ	антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВРТ	вспомогательные репродуктивные технологии
ДИ	доверительный интервал
ИКСИ	интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита
ИМТ	индекс массы тела
ИППП	инфекции, передающиеся половым путем
КК	клетки кумулюса
ЛГ	лютеинизирующий гормон
ОКК	ооцит-кумулюсный комплекс
ОР	относительный риск
ОШ	отношение шансов
ТВП	трансвагинальная пункция
УЗИ	ультразвуковое исследование
ЧИ	частота имплантации
ЧНБ	частота наступления клинической беременности
ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
ХГЧ	гонадотропин хорионический человека
ЭКО	экстракорпоральное оплодотворение

ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У СУПРУЖЕСКИХ ПАР С НАРУШЕНИЯМИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

1.1. Супружеские пары с фактором мужского бесплодия в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий

В настоящее время в клиники экстракорпорального оплодотворения все чаще обращаются пациенты с выявленными нарушениями процесса сперматогенеза, которые сочетаются с различными факторами женского бесплодия (трубно-перитонеальный, наружный генитальный эндометриоз, синдром поликистозных яичников (СПКЯ) и др.). Действительно, согласно последним эпидемиологическим данным ВОЗ, опубликованным в 2022 году, бесплодие затрагивает миллионы людей по всему миру, часто с разрушительными для семьи, здоровья и общества в целом последствиями [2, 50]. Главная проблема точной оценки распространенности бесплодия по всему миру состоит в отсутствии точных критериев выборки супружеских пар для соотнесения их по группам фертильности. Самодиагностика отсутствия беременности в течение 12 месяцев половой жизни без предохранения не является сегодня единственным критерием признания супружеской пары нефертильной. Специалисты ВОЗ провели оценку распространенности бесплодия на различных континентах мира, которая показала самую высокую распространенность в африканском регионе (18,1%), за которыми следовали Западная часть Тихого океана (14,2%), Европа (12,6%), Америка (11,2%) и Восточное Средиземноморье [50]. Авторы указывают на недостаточность и частую некорректность сбора данных в разных странах и подчеркивают настоятельную необходимость более систематического и всестороннего сбора данных для оценки

распространенности бесплодия на глобальном, региональном и местном уровнях.

В России для эпидемиологической оценки распространённости бесплодия чаще всего используют когорты супружеских пар, обратившихся в клиники экстракорпорального оплодотворения. Именно поэтому точно выявить число мужчин с нарушениями сперматогенеза невозможно. Последние опубликованные данные о распространённости бесплодия в России представлены в отчете Минздрава России за 2019–2020 гг, согласно которым частота бесплодных браков колеблется от 17,2 до 24% в различных регионах. К сожалению, в данных документах не выделяется мужское бесплодие как фактор отсутствия детей в семье. В работе Кулаковой Е.В. с соавторами (2021) показано, что причиной обращения в программы преимплантационного генетического скрининга у 34% пар является мужской фактор бесплодия [1]. В клинических рекомендациях от 2021 года «Мужское бесплодие» распространённость нарушений сперматогенеза не указана. Однако на основании обращаемости пар за лечением бесплодия уже сегодня можно говорить о превышении порога в 50%, когда бесплодие связано с фертильностью мужчины.

Нарушение в эякуляте концентрации, морфологии и подвижности сперматозоидов является причиной применения вспомогательных репродуктивных технологий (в частности, использования метода оплодотворения ИКСИ) для решения проблемы бесплодия и рождения ребенка у супружеской пары. Метод интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ) был разработан для лечения тяжелого мужского бесплодия из-за измененных параметров спермограммы и в настоящее время применяется во всем мире для лечения бесплодия. ИКСИ проводится с любым доступным сперматозоидом из биоптата

яичка в результате хирургического вмешательства или из эякулята, независимо от подвижности, морфологии или количества мужских гамет.

С момента первых клинических применений в 1992 г. доля ИКСИ в сравнении с обычным ЭКО не переставала увеличиваться, однако с 2013 г. установилась на уровне 70% всех оплодотворений *in vitro* [90]. ИКСИ является предпочтительным методом ЭКО при использовании размороженных ооцитов, сперматозоидов, полученных хирургическим путем, а также в случае преимплантационного генетического тестирования.

При проведении классического ЭКО процесс оплодотворения происходит «естественно», без микроманипуляций со стороны человека. Оплодотворяющий сперматозоид проходит через блестящую оболочку, чтобы оплодотворить яйцеклетку, как это происходит при спонтанном зачатии. В ИКСИ все наоборот — один выбранный эмбриологом сперматозоид помещается внутрь ооплазмы, минуя процесс связывания/отбора с зоной пеллюцида и слияния гамет. Именно этот факт вызывает вопрос о «несовершенстве» технологии ИКСИ, поскольку селекцию сперматозоидов проводит оператор под микроскопом. В естественных условиях единственный сперматозоид, проникающий в ооцит, проходит многостадийный отбор внутри женских половых путей.

1.2. Взаимодействие женских и мужских половых клеток при оплодотворении у человека *in vivo*

Взаимодействие сперматозоида с ооцитом имеет ключевое значение в процессе оплодотворения у человека. Ограниченное количество мужских половых клеток, попадающих в маточную трубу, а также анатомические ограничения указывают на то, что встреча сперматозоидов и ооцитов человека является не случайным, а направленным процессом. Хемотаксис — предполагаемый механизм

переориентации сперматозоидов к источнику хемоаттрактанта и, следовательно, к ооциту. Хемокины представляют собой надсемейство небольших (8–11 кДа) цитокиноподобных белков, которые, как было показано, опосредуют хемотаксис посредством связывания со специфическими рецепторами [26].

Во время полового акта во влагалище попадает около 250 миллионов сперматозоидов человека. Интересно, что только очень небольшое количество (80–1400 сперматозоидов) эякулированных сперматозоидов обнаруживаются на месте неоплодотворенного ооцита [26]. Такое ограниченное количество сперматозоидов и анатомические пропорции места оплодотворения позволяют предположить, что дистантные механизмы управления считаются обязательными для успешного оплодотворения.

После эякуляции во влагалище сперматозоиды проходят процесс созревания, называемый капациацией. Капациация является необходимым условием для того, чтобы сперматозоиды человека были термотактически и хемотактически чувствительными, чтобы связываться с блестящей оболочкой ооцита и вступить в акросомную реакцию. Капацированные сперматозоиды впоследствии направляются от более холодного участка резервуара спермы в истмическом отделе маточной трубы к более теплomu месту оплодотворения в ампулярном отделе за счет термотаксиса (дистантное взаимодействие) (рисунок 1, [26]).

В непосредственной близости от места оплодотворения сперматозоиды «ощущают» градиенты хемоаттрактантов, секретлируемых ооцит-кумулюсным комплексом, и направляются к ооциту посредством хемотаксиса (контактное взаимодействие).

Ооцит-кумулюсный комплекс представляет собой сложную структуру, состоящую из женской половой клетки, кумулюсных клеток и

их внеклеточного матрикса. При естественном оплодотворении только сперматозоиды с наилучшими характеристиками могут пройти через ОКК и в последующем проникнуть через зону пеллюцида и оплодотворить яйцеклетку. Присутствующий внеклеточный матрикс ОКК является сложноорганизованной структурой и образован полимеризованной гиалуроновой кислотой, которая синтезируется клетками кумулюса в ответ на выброс лютеинизирующего гормона.

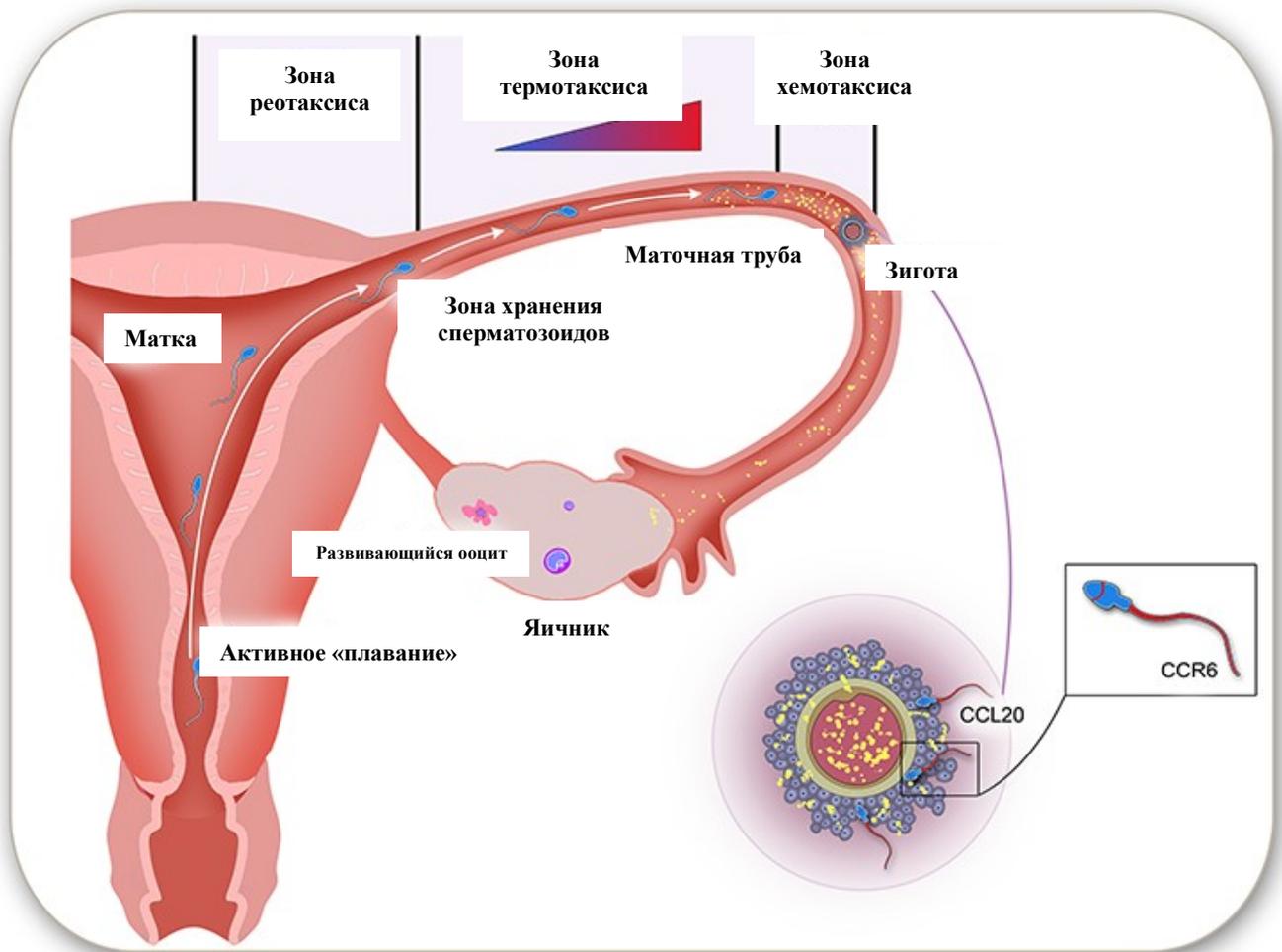


Рисунок 1. Дистантное и контактное взаимодействие мужских половых клеток с ооцит-кумулюсными комплексами в репродуктивном тракте женщины [26]. CCL20 — хемоаттрактант, выделяемый ооцит-кумулюсным комплексом; CCR6 — рецептор-хемоаттрактант на мембране сперматозоида.

Кумулюсные клетки играют важную роль в достижении ооцитами цитоплазматического созревания, а также в транспорте продуктов метаболизма между ооцитом и тканью яичника [49]. Исследования указывают на то, что клетки кумулюса координируют созревание ооцитов внутри фолликулов, стимулируют гликолиз, аминокислотный транспорт и биосинтез стеролов [49, 68, 74]. Профилирование экспрессии генов кумулюсных клеток поможет выявить биомаркеры для прогноза развития эмбриона. Взаимодействие ооцита с кумулюсом осуществляется посредством рецепторов GDF9 и BMP15, их ключевая роль в регуляции овуляции установлена сначала у мышей, затем подтверждена у овец и человека [33, 65, 75].

После эякуляции сперматозоиды человека активно продвигаются к перешейку маточной трубы. Здесь капцитированные сперматозоиды ощущают температурный градиент, зависящий от овуляции, и перемещаются к месту оплодотворения с помощью термотаксиса. Поднимаясь по фаллопиевой трубе, сперматозоиды ощущают градиент прогестерона и CCL20 (хемоаттрактант, выделяемый клетками кумулюса) и направляются к ооцит-кумулюсному комплексу посредством хемотаксиса. Далее сперматозоиды направляются к самому ооциту в соответствии с градиентом CCL20 (или более мощного хемоаттрактанта), секретиремым ооцитом в плотный матрикс кумулюса. Наконец, (CCR6+) экваториальный сегмент головки сперматозоида прикрепляется к (CCL20+)-ооциту, и начинается слияние плазматических мембран половых клеток.

Duan Y-G. et al. убедительно доказали, что хемокин CCL20 в избытке присутствует в фолликулярной жидкости человека и продуцируется ооцитами человека, а также окружающими клетками кумулюса [26]. Анализ содержания белка CCL20 в фолликулярной

жидкости человека показал, что CCL20 составляет примерно 0,007–0,03% от общей концентрации белка, что свидетельствует о важной функции этого хемокина в процессе оплодотворения. Эти результаты подтверждаются предыдущими исследованиями Kawano Y. et al., которые продемонстрировали присутствие белка CCL20 в фолликулярной жидкости женщин [71]. Более того, экспрессия CCL20 в яичниках показала периодическую регуляцию с пиковой экспрессией во время предовуляторной фазы женского менструального цикла. Соответственно, в яичниках человека CCL20 достигает пика экспрессии в фолликулярной жидкости, содержащей зрелые ооциты, в отличие от фолликулярной жидкости, содержащей незрелые ооциты. Kawano Y. et al предлагают новую модифицированную модель движения сперматозоидов в женских репродуктивных путях (рисунок 1): выходя из влагалища, сперматозоиды человека активно плывут с помощью реотаксиса к так называемому месту хранения спермы на перешейке фаллопиевой трубы. Этот процесс поддерживается координированными сокращениями влагалища и матки. Достигнув места скопления спермы, различные подмножества сперматозоидов капацитируют в зависимости от времени. Впоследствии капацитированные сперматозоиды ощущают температурный градиент, зависящий от овуляции, и перемещаются от более прохладного места хранения к более теплomu месту оплодотворения с помощью термотаксиса. Здесь сперматозоиды ощущают градиент хемотаксического фактора, секретирuемого ооцит-кумуляным комплексом, такого как CCL20, CCL5 или прогестерон, и направляются к комплексу посредством хемотаксиса. При достижении ооцит-кумуляного комплекса факторы наведения сперматозоидов, такие как CCL20, CCL5 или прогестерон, могут направлять сперматозоиды человека к ооциту с помощью таких механизмов, как

адгезия между клетками, которая еще не изучена. В настоящее время предложенный механизм является самым актуальным, поскольку основан на последних достижениях в области молекулярной биологии, эмбриологии и генетики. Понимание движения гамет позволяет проводить попытки использования ооцит-кумулюсных комплексов в программах лечения бесплодия методами ВРТ, в частности, на эмбриологическом этапе при селекции мужских половых клеток.

1.3. Особенности лечения супружеских пар с фактором мужского бесплодия: клинические преимущества и ограничения методов селекции сперматозоидов

В последние годы бесплодие становится все более распространенной и актуальной проблемой не только медицинского, но и социально-экономического характера [84]. По некоторым оценкам, бесплодие затрагивает 8–12% супружеских пар во всем мире и имеет тенденцию к росту. Около 15% сексуально активных пар не могут достичь беременности в течение 1 года [3, 20]. Длительный период времени считалось, что основной причиной бесплодия являются проблемы, связанные с репродуктивной системой женщины, однако, на сегодняшний день известно, что примерно в 50% случаев оно ассоциируется с мужским фактором [57, 18].

К основным причинам, способствующим ухудшению фертильности у мужчин можно отнести возраст, наличие вредных привычек, генетические и эпигенетические изменения, эндокринные и метаболические расстройства, инфекционно-воспалительные заболевания, сосудистые нарушения, воздействие химиотерапевтических препаратов и др. Однако в 30–40% случаев мужское бесплодие носит идиопатический характер [4, 5, 64]. Недостаточная фертильность у

мужчин, как правило, проявляется отклонениями в параметрах эякулята — уменьшением концентрации сперматозоидов, снижением их подвижности и резким ухудшением морфологических характеристик [56, 57, 84].

К трем основным стратегиям лечения бесплодия относятся фармакологическая терапия, хирургическое лечение (в основном, эндоскопия) и вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Непрерывное совершенствование последних в значительной степени позволяет расширить возможности в лечении различных форм бесплодия [1, 4, 5, 11].

Все используемые методы селекции сперматозоидов в программах ВРТ можно условно разделить на традиционные и научно-ориентированные [60]. В рутинной практике используется два традиционных метода: центрифугирование в градиенте плотностей и метод всплытия, или *swim up*. Данные технологии имеют как преимущества, так и ограничения (таблица 1). Метод всплытия подразумевает наслоение культуральной среды на нативный эякулят и выдерживание в течение 1 часа с последующим сбором фракции подвижных сперматозоидов. Метод относительно прост и не требует высокой квалификации специалистов. Важным преимуществом такого подхода является отсутствие центрифугирования, которое потенциально может повреждать ДНК сперматозоидов. Однако данная технология не подходит для образцов с низкими показателями концентрации и подвижности. При центрифугировании в градиенте плотностей используют пошаговую обработку эякулята, выделяя как подвижные, так и морфологически нормальные сперматозоиды. Метод подходит для большинства образцов, однако считается, что центрифугирование вызывает повреждения ДНК сперматозоидов и требует больших

материальных и временных затрат. Оба традиционных метода обработки эякулята позволяют отбирать сперматозоиды по подвижности и плотности, которые не являются специфическими маркерами способности к оплодотворению. Этим фактом частично можно объяснить возникновение неудач оплодотворения при экстракорпоральном оплодотворении. В современных условиях интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит (ИКСИ) стала наиболее востребованным методом ВРТ для преодоления мужского бесплодия. Метод ИКСИ обычно используется в случаях тяжелой олиго-, астено- и тератозооспермии. Одной из основных задач, стоящих перед эмбриологом, выполняющим процедуру ИКСИ, является отбор сперматозоида, имеющего нормальную морфологию и подвижность.

Таблица 1. Клинические преимущества и ограничения различных методов селекции сперматозоидов в программах ВРТ [60]

Методы селекции сперматозоидов	Преимущества	Недостатки
<i>Традиционные методы</i>		
Метод всплытия, или <i>swim up</i>	Позволяет прогрессивно подвижным сперматозоидам мигрировать из семенной плазмы без дополнительных этапов подготовки; отделяет неподвижные сперматозоиды и клеточный дебрис от подвижных; концентрирует субпопуляцию с улучшенными параметрами подвижности	Длительное воздействие дебриса, незрелых сперматозоидов и лейкоцитов может вызвать повреждения активными формами кислорода; не применим к мужчинам с олигоспермией из-за низкой концентрации; подвижность может не полностью отражать потенциал оплодотворения

Методы селекции сперматозоидов	Преимущества	Недостатки
Центрифугирование в градиенте плотности	Концентрирует морфологически нормальные и зрелые сперматозоиды в осадок; удаляет аномальные сперматозоиды, остатки клеток и лейкоциты; обогащает субпопуляцию сперматозоидов с улучшенными характеристиками	Требует нескольких повторных стадий центрифугирования, которые могут индуцировать выработку активных форм кислорода в сперме, что приводит к фрагментации ДНК; относительно дорогая процедура
<i>Научные методы</i>		
Исследование морфологии подвижных сперматозоидов (MSOME или ИМСИ)	Позволяет оценить морфологию сперматозоидов в режиме реального времени с использованием большого увеличения (x6600)	Относительно длительная процедура; ручная оценка может быть очень субъективной
Метод Zech-selector [19], отбор в специальной камере по подвижности	Выделяет высокоподвижные сперматозоиды с улучшенными параметрами и генетическими качествами; не требует центрифугирования	Можно обрабатывать только небольшое количество эякулята за один раз

Методы селекции сперматозоидов	Преимущества	Недостатки
<p>ζ-метод, микропоток на основе электрофореза</p>	<p>Требуется только короткое время обработки и простая подготовка; может не требовать центрифугирования; концентрирует субпопуляции сперматозоидов с повышенными параметрами оплодотворения</p>	<p>Метод невоспроизводим от образца к образцу; должен быть проведен своевременно из-за постепенной потери отрицательных зарядов после начала капацитации сперматозоидов</p>
<p>Селекция по аннексину V (MACS)</p>	<p>Концентрирует субпопуляции сперматозоидов с улучшенными параметрами оплодотворения, удаляя апоптотические сперматозоиды</p>	<p>Невозможно различить незрелые сперматозоиды и лейкоциты, необходимо сочетать с градиентом плотностей; требует нескольких этапов центрифугирования и ручной обработки; может обрабатывать только небольшое количество сперматозоидов за раз и требует длительного времени обработки</p>

Методы селекции сперматозоидов	Преимущества	Недостатки
<p>Проникновение через цервикальную слизь или заменители; взаимодействие с эпителиальными клетками маточной трубы; взаимодействие с ооцит-кумулюсным комплексом; анализ связывания с гиалуроновой кислотой; zona pellucida-связывающий анализ</p>	<p>Воспроизводит механизмы естественного отбора сперматозоидов; разделяет сперматозоиды по их физиологическим характеристикам; обогащает субпопуляции сперматозоидов с улучшенными параметрами оплодотворения; могут демонстрировать высокую специфичность и чувствительность</p>	<p>Сообщается о противоречивых результатах; все методы (кроме анализа связывания с гиалуроновой кислотой) требуют использования человеческих ресурсов, что может привести к функциональным вариациям (ненормируемы); этические проблемы, связанные с использованием биологического материала человека; могут потребоваться специальные методы, такие как ИКСИ</p>
<p><i>Отбор с помощью микрофлюидики на основе химико-физических свойств мужской половой клетки</i></p>		
<p>Термотаксис; хемотаксис; реотаксис</p>	<p>Может легко выполняться в клинических условиях в системах с высокой пропускной способностью, интегрированных с микрофлюидными методами; демонстрируют высокую специфичность и чувствительность; может</p>	<p>Необходимо установить стандартизированный протокол с большими размерами выборки; необходимо дополнительно подтвердить воспроизводимость и надежность</p>

Методы селекции сперматозоидов	Преимущества	Недостатки
	не требовать центрифугирования; позволяет концентрировать субпопуляции сперматозоидов с улучшенными параметрами	

Несмотря на то, что рутинные методы обработки эякулята и морфологические критерии селекции сперматозоида для ИКСИ позволяют снизить риск использования аномального сперматозоида, все же ИКСИ обходит естественные барьеры, препятствующие проникновению аномальных сперматозоидов в ооцит, что может влиять на частоту оплодотворения и качество эмбрионов [10, 12, 13]. Таким образом, выбор сперматозоидов наилучшего качества имеет решающее значение для улучшения результативности оплодотворения в случае ИКСИ [43]. Представленные в таблице 1 нетрадиционные методы обработки эякулята в большей степени относятся именно к оплодотворению методом ИКСИ.

Существуют различные методы, которые используются для отбора сперматозоидов при проведении ИКСИ [43]. Среди них самый востребованный — метод ПИКСИ (физиологическая интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида), основанный на связывании сперматозоидов с гиалуроновой кислотой (ГК) и, таким образом, имитирующий селекцию мужских половых клеток, как при естественном оплодотворении [43, 56]. Ряд исследований подтверждает, что ГК, выступающая в роли «физиологического селектора», способствует отбору наилучших сперматозоидов с более качественными

характеристиками, особенно при повышенной фрагментации ДНК сперматозоидов.

Так же одним из альтернативных методов селекции сперматозоидов является анализ морфологии сперматозоида при сверхвысоком увеличении более чем в 6000 раз — ИМСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида после селекции по морфологическим критериям), позволяющий оценить 6 клеточных структур: акросому, постакросомную пластинку, шейку, хвост, митохондрии и ядро. Несмотря на то, что данный метод используется в практике и является усовершенствованным вариантом ИКСИ, в практической медицине возникает все больше противоречивой информации относительно показаний к его проведению и эффективности наступления беременности и/или родов живым плодом. Так, в работе Knez K. et al. [69] было показано, что частота наступления беременности у пациенток из группы ИМСИ выше, чем при проведении стандартного ИКСИ [69]. Согласно Mangoli E. et al [41], ИМСИ не является методом выбора и должно проводиться только после нескольких неудачных попыток стандартного ИКСИ [41].

Вышеописанные методы ВРТ широко используются в мировой практике, однако они имеют свои отрицательные стороны. Естественный отбор наилучших сперматозоидов заменяется выбором эмбриолога, который основан на морфологических критериях и подвижности. Такой отбор не отражает целостность генома сперматозоидов и не исключает наличия разного рода патологий, что обосновывает важность разработки методов селекции сперматозоидов, которые были бы максимально приближены к естественным условиям зачатия [4, 1]. По данным современных исследований, отбор сперматозоидов с помощью ооцит-кумулюсных комплексов может способствовать увеличению частоты

имплантации и наступления беременности у определенных групп супружеских пар [12].

Несмотря на то, что физиологическая роль ОКК изучена недостаточно [31], различные исследования подтверждают его влияние на процесс оплодотворения и частоту бластуляции в программах ВРТ [20, 29, 75]. Например, в нескольких научных работах было показано, что сперматозоиды, способные проникать через ОКК, имеют лучшую морфологию (сформированная акросома, неутолщенная шейка, длинный жгутик, отсутствие цитоплазматических капель на поверхности мембраны клетки), вступают в большее число акросомальных реакций, имеют лучшие потенции к капацитации. Отобранные таким образом мужские половые клетки имеют более высокую зона-связывающую способность и более высокую целостность хроматина [29, 75].

Так, в исследовании Wang C. et al. [13], целью которого было изучение эффективности физиологического отбора сперматозоидов с помощью ОКК для ИКСИ, авторами было проанализировано 857 ооцитов на стадии МП, которые были поделены для оплодотворения на две группы: с использованием ОКК-ИКСИ (n=429) и стандартного ИКСИ (n=428). Частота оплодотворения яйцеклеток методом ОКК-ИКСИ была выше, чем в группе стандартного ИКСИ (85,31% против 74,77%; $p < 0,05$). По частоте развития эмбрионов 3-х суток без фрагментации между ОКК-ИКСИ и стандартным ИКСИ статистически значимых различий выявлено не было (63,23% против 58,92%; $p > 0,05$) Однако, на 5-ые сутки в группе ОКК-ИКСИ была отмечена большая частота формирования бластоцист (46,52% против 38,85%; $p < 0,05$), в том числе бластоцист отличного качества, пригодных для переноса в полость матки и криоконсервации (38,72% против 24,20%; $p < 0,05$) по сравнению с группой обычного ИКСИ [13]. Таким образом, авторы показали, что использование ОКК для отбора

сперматозоидов для ИКСИ оказалось эффективным и привело к статистически значимому улучшению развития и качества бластоцист.

В исследовании Franken D.R. et al. [44] так же было изучено взаимодействие кумулюсных клеток со сперматозоидами человека. Оценивали акросомальную реакцию, морфологию, связывающую способность и целостность хроматина. Используя ранее описанную модель ОКК, авторы учитывали конкретные функциональные аспекты сперматозоидов, которые пересекают ОКК (основная группа). Контрольные сперматозоиды содержались в аналогичных экспериментальных условиях, только в питательной среде. Результаты показали, что кумулюсные клетки влияют на функциональные особенности сперматозоидов. Средний процент морфологически нормальных сперматозоидов в контрольной выборке составил 6,9%, в то время как сперматозоиды, прошедшие ОКК, имели значительно более высокий процент нормальных форм (в среднем 9,5%; $p \leq 0,01$). Также было выявлено снижение процента сперматозоидов с деконденсированным хроматином (СМА₃-положительных) при сравнении контрольной популяции (49,1%) с основной группой 38,4%, ($p \leq 0,05$). Кроме того, у большего количества сперматозоидов основной группы была выявлена акросомальная реакция в 23% против 11% в группе контроля и более высокая зона-связывающая способность и целостность хроматина (61%) против (47%) ($p < 0,01$) по группам, соответственно [44].

Hong S.J. et al. еще в 2004 году показали, что сперматозоиды, способные проникать через КК, имеют более высокие параметры движения сперматозоида, такие как: средняя скорость обычного пути, средняя скорость поступательного движения, средняя амплитуда боковых наклонов головки, прямолинейность и др. по сравнению с контрольной

группой [23]. Полученные данные также были подтверждены другими авторами [27, 56].

В некоторых работах было продемонстрировано, что внеклеточный матрикс ОКК оказывает непосредственное влияние на сперматозоиды, увеличивая созревание их мембран, подвижность и целостность ДНК. Предположительно, такие изменения характера подвижности сперматозоидов могут возникать в результате механического сопротивления из-за специфической вязкой среды КК [44]. Однако, в литературе представлены немногочисленные и противоречивые результаты, касающиеся данного вопроса. В некоторых работах сообщалось, что характеристики КК не могут вызывать определенные паттерны подвижности сперматозоидов, поскольку сперматозоиды могут свободно плавать в культуральной среде [27, 53, 56, 65]. Таким образом, конкретный механизм действия КК остается дискуссионным и нуждается в дальнейшем изучении.

Однако научные данные об эффективности использования КК при селекции сперматозоидов в программах лечения бесплодия убеждают в целесообразности его использования и определении контингента пациентов, у которых именно такой отбор мужских половых клеток был бы клинически целесообразен и обоснован.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

В исследование были включены супружеские пары, проходившие лечение в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель — профессор, д.м.н. Калинина Е.А.) Института репродуктивной медицины (директор — профессор, д.м.н. Назаренко Т.А.) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России (директор — академик РАН, профессор, д.м.н. Сухих Г.Т.) с января 2020 г. по декабрь 2022 г. Всего было включено 267 супружеских пар. 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).

2.2. Критерии включения и исключения

Критериями включения служили следующие параметры:

- 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:

- 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.

2.3. Дизайн исследования

Диссертационная работа представляет собой когортное проспективное исследование в параллельных группах.

В зависимости от поставленной цели и задач был разработан следующий дизайн исследования, указанный на рисунке 2.

За критерии эффективности использования селекции сперматозоидов на клетках кумулюса принимали частоту

оплодотворения и частоту бластуляции. Первичные исходы совпадают с критерием эффективности — улучшение показателей эмбриологического этапа. Вторичные исходы — эффективность программ ВРТ (частота наступления клинической беременности/имплантации и частота живорождения). Конечной точкой исследования выбраны параметры: относительный риск (ОР) наступления клинической беременности (по данным ультразвукового исследования), ОР ранних репродуктивных потерь беременности (до 12 недель гестации) и живорождения в зависимости от вида селекции сперматозоидов для оплодотворения методом ИКСИ.

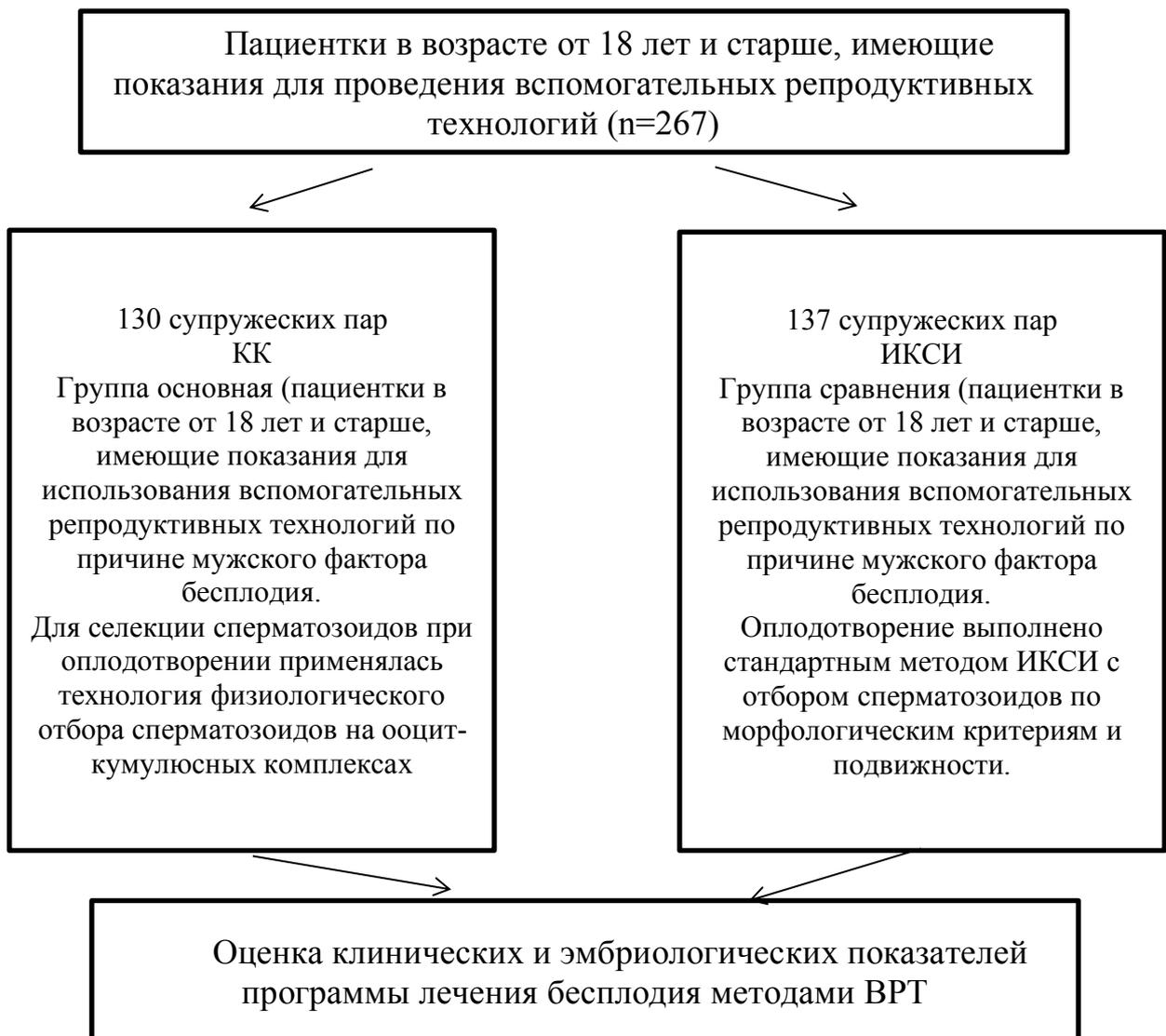


Рисунок 2. Дизайн исследования

Для решения задачи 4 супружеские пары были разделены на группы в зависимости от возраста женщины и показателей эякулята у мужчины. Дизайн представлен на рисунках 3 и 4.

Первичные точки: частота оплодотворения и частота бластуляции.

Конечные точки: эффективность программ ВРТ (частота наступления клинической беременности (имплантация) и частота живорождения).

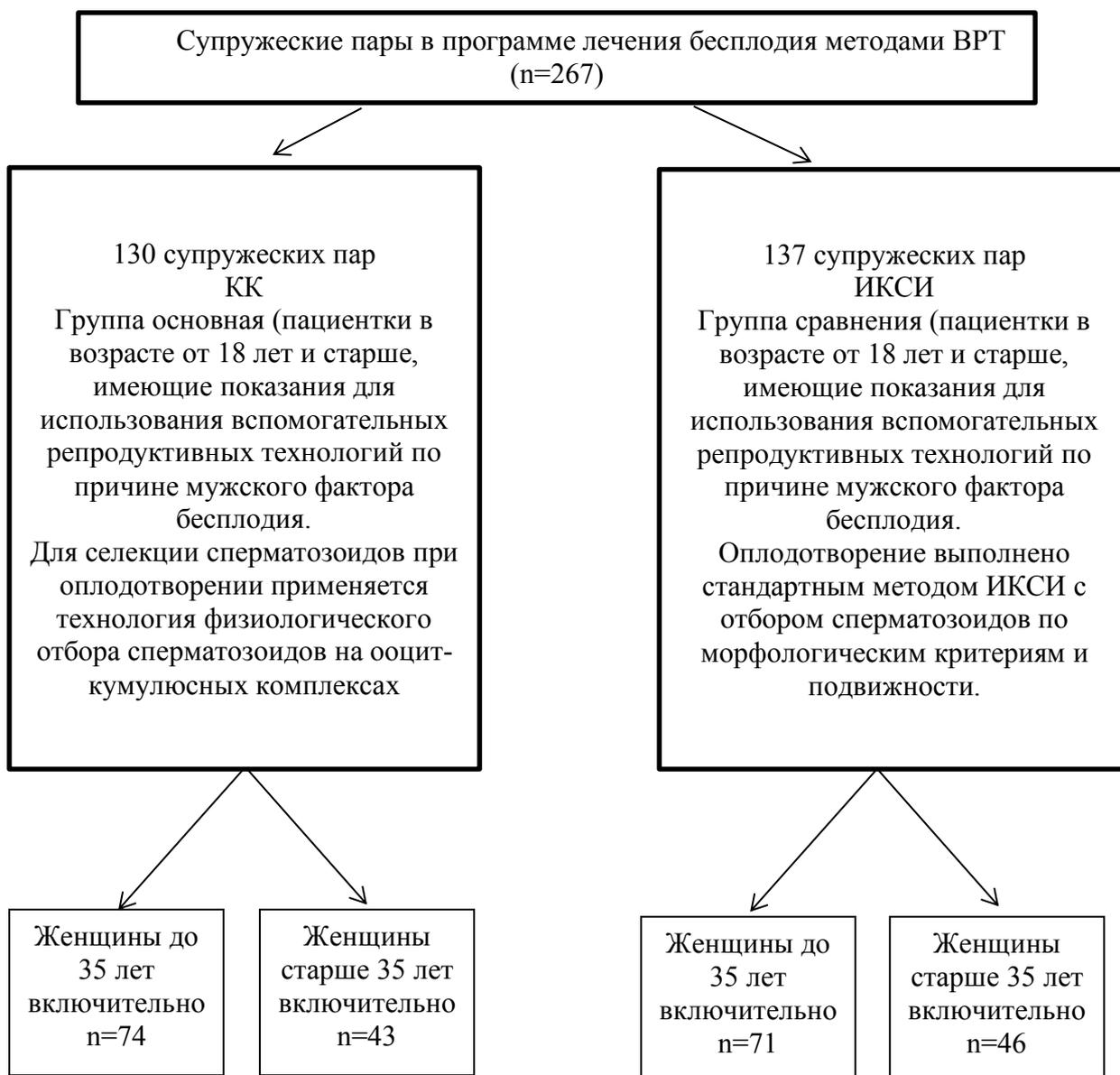


Рисунок 3. Дизайн исследования для задачи 4 и изучения влияния возраста женщины на эффективность протоколов ВРТ с селекцией сперматозоидов на клетках кумулюса

Первичные точки: частота оплодотворения и частота бластуляции.

Конечные точки: эффективность программ ВРТ (частота наступления клинической беременности/имплантации и частота живорождения).

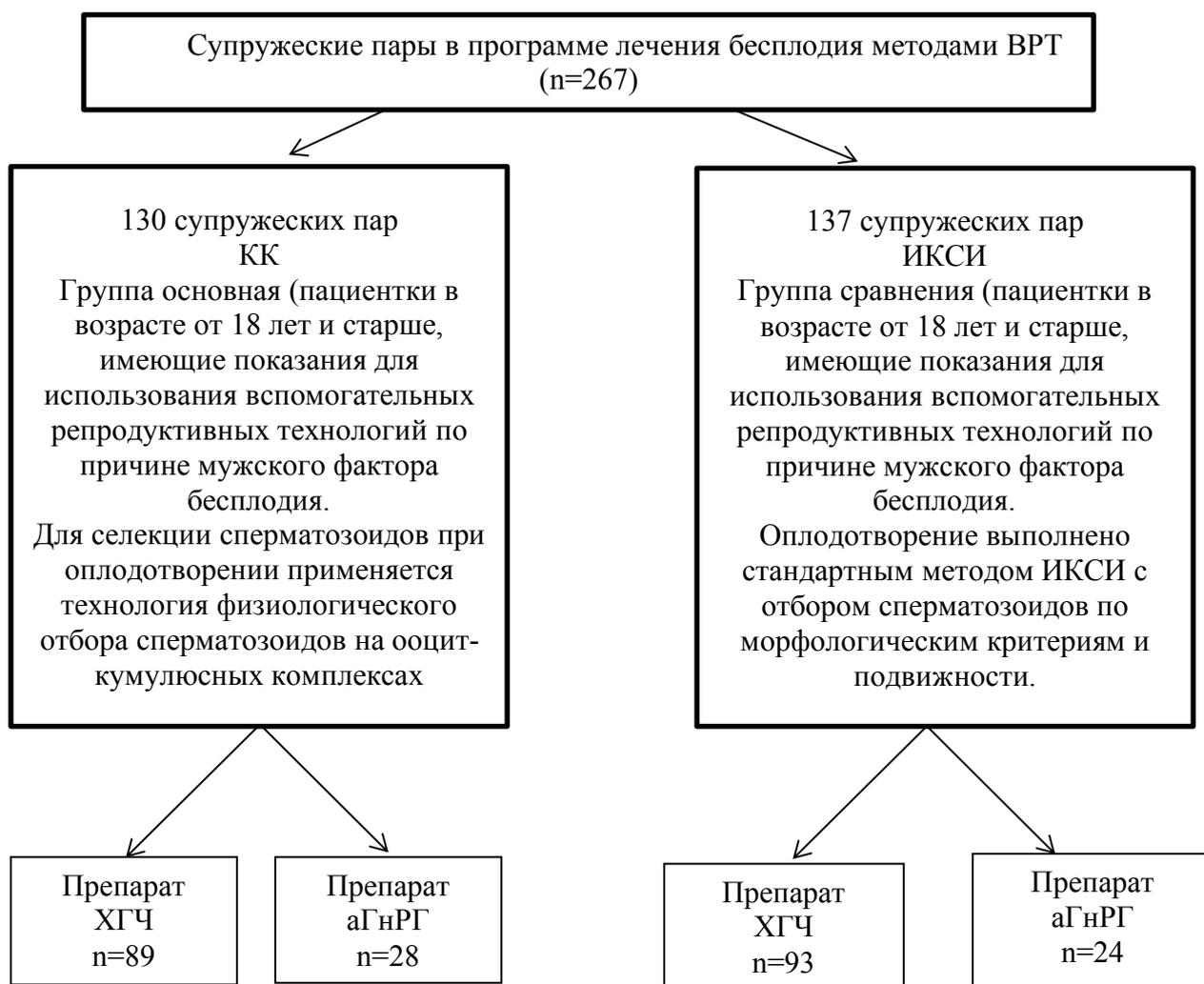


Рисунок 4. Дизайн исследования для изучения влияния типа препарата для финального созревания ооцитов при овариальной стимуляции у женщины на эмбриологические показатели протоколов ВРТ с селекцией сперматозоидов на клетках кумулюса

2.1. Соблюдение этических норм

Диссертационное исследование было одобрено на заседании комиссии по этике биомедицинских исследований, протокол №11 от 12 ноября 2020 г. Все пациенты, включенные в работу, подписали информированное добровольное согласие на участие и стандартное согласие на обработку своих персональных данных.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Обследование супружеских пар для вступления в программу лечения бесплодия методами ВРТ

Все супружеские пары перед вступлением в программу лечения бесплодия методами ВРТ прошли комплексное обследование согласно действующим регламентирующим документам:

- Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 июля 2020 г. №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»;
- Клинические рекомендации «Женское бесплодие», утвержденные Министерством здравоохранения Российской Федерации (2021 г.).

Перед началом лечения бесплодия методами ВРТ мужчины и женщины в амбулаторных условиях проходили как обязательные, так и специальные (по показаниям) методы исследования, необходимые для начала программы лечения и оценки наличия/отсутствия противопоказаний к экстракорпоральному оплодотворению, вынашиванию беременности и родам согласно действующим регламентирующим документам по ВРТ.

Обязательные исследования [2]:

- общее и специальное гинекологическое обследование;
- ультразвуковое исследование органов малого таза на 5–8-й день менструального цикла;
- определение группы крови и резус-фактора;
- клинический анализ крови;
- гемостазиограмма;
- анализ крови на антитела к ВИЧ, HBsAg, анти-HCV, реакция Вассермана (оба супруга);
- исследование на флору цервикального канала и степень чистоты влагалища;
- цитологическое исследование мазков шейки матки;
- флюорография или рентген грудной клетки;
- электрокардиограмма;
- заключение врача-терапевта о состоянии здоровья и об отсутствии противопоказаний к овариальной стимуляции, вынашиваю беременности и родам;
- спермограмма для мужчин.

Исследования по показаниям:

- исследование состояния матки и маточных труб (гистеросальпингография или гистеросальпингоскопия);
- биопсия эндометрия;
- бактериологическое исследование материала из цервикального канала;
- цитологическое исследование мазков шейки матки;

- гормоны крови (на 2–3-й день менструального цикла): ЛГ, ФСГ, эстрадиол, ТТГ, Т3/Т4св, ДГА-С, пролактин, СТГ, кортизол, тестостерон, прогестерон;
- обследование на наличие антиспермальных и антифосфолипидных антител;
- исследование цервикального мазка на инфекции методом ПЦР: *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* и *genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, HSV, CMV;
- анализ крови на IgG+IgM к HSV, CMV, *Toxoplasma gondii*, *Rubella*;
- заключения смежных специалистов по показаниям;
- медико-генетическое консультирование для пар старше 35 лет;
- консультация андролога.

График обследований супружеских пар представлен в таблице 2.

Таблица 2. Используемые методы обследования пар, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ и посттрансферный период

	Перед вступл ление м.в прогр	пункт я	Транс вагин альна	5-е сутки после ТВП	эмбри	2 нед после перен оса	4 нед после перен оса	12 нед после перен оса	40 нед после перен оса
Гемостазиограмма	X								
RW, ВИЧ, HBs, HCV, группа крови	X								
Гормоны крови	X								
Мазок на микрофлору выделяемого влагалища	X								
ИППП	X								

	Перед вступле- нием м в прогр	Транс- вагиналь- ная пункция	5-е сутки после ТВП	эмбри	2 нед после переноса	4 нед после переноса	12 нед после переноса	40 нед после переноса
Мазок на онкоцитологию	X							
Спермограмма (муж)	X							
УЗИ органов малого таза	X							
Консультация врача-терапевта	X							
Морфологическая оценка качества ооцитов		X						
Селекция сперматозоидов с помощью клеток кумулюса, ИКСИ		X						
Морфологическая оценка качества эмбрионов			X					
Перенос эмбрионов			X					
Анализ крови на ХГЧ				X				
УЗ-исследование акушера-гинеколога		X			X			
Оценка сердцебиения плода						X		
Результат родов								X

2.2.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза

Ультразвуковое исследование органов малого таза проводили в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России с 5 по 7 день менструального цикла, предшествующего циклу стимуляции функции яичников. Проводили измерение размеров тела матки и структуры миометрия, толщины и структуры эндометрия, размеров и объема яичников, состояния фолликулярного аппарата, наличия или отсутствия объемной патологии в малом тазу. На данном этапе принималось решение о возможности и целесообразности проведения программы ВРТ с собственными ооцитами. Анализ выполняли на ультразвуковых аппаратах Flex Focus 800 с помощью интравагинального датчика с частотой 5 МГц.

2.2.3. Протокол стимуляции яичников и получение ооцитов

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 аГнРГ 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.

2.2.4. Анализ эякулята и подготовка сперматозоидов к экстракорпоральному оплодотворению

Параметры спермограммы оценивали в ходе предварительного обследования пары перед программой ВРТ и в день трансвагинальной пункции яичников. Образцы эякулята собирались в стерильный контейнер после 3–5 дней полового воздержания путем мастурбации в день трансвагинальной пункции и оценивались на основе критериев 5-го издания ВОЗ «Руководство по оценке и криоконсервации эякулята» (2010 г., таблица 3).

Таблица 3. Нормативные показатели эякулята

Показатель	Значение
Время разжижения спермы	До 60 минут
Объем	1,5 мл и более
pH	7,2 и более
Концентрация сперматозоидов	15 млн/мл и более
Общее количество сперматозоидов	39 млн и более
Общая подвижность сперматозоидов, %	50% и более
Сперматозоиды с поступательным движением, PR%	32% и более
Морфология сперматозоидов, %	Более 4% по Крюгеру
Жизнеспособность сперматозоидов, %	58% и более

Для главных характеристик спермы использовали следующие параметры: концентрация, процент прогрессивно-подвижных сперматозоидов и процент морфологически нормальных сперматозоидов.

Нормальными параметрами эякулята считали значения, указанные в таблице 3. После разжижения эякулят был обработан методом центрифугирования и разделения в градиенте плотностей с последующей отмывкой и всплытием сперматозоидов в культуральной среде с HEPES. На данном этапе использовали среды SpermWash (Irvine Sc., США). Буферные системы использовали строго согласно рекомендациям производителя.

2.2.5. Эмбриологический этап и морфологическая оценка эмбрионов

Идентификацию ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) и оценку степени зрелости ооцитов проводили под стереомикроскопом на нагретой до 37°C поверхности стерильного ламинарного бокса. ОКК отмывали от фолликулярной жидкости (ФЖ) и крови и помещали в стерильные планшеты (Nunc, Дания) с культуральной средой Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., США) на 2–3 ч в целях предварительной инкубации при температуре +37,0°C и атмосфере с 6% CO₂. Денудирование ооцитов проводилось в растворе гиалуронидазы в течение 20 с (Irvine Sc., США). Далее ОКК отмывали в среде CSCM (Irvine Sc., США) и возвращали в лунки. Все процедуры ИКСИ проводились через 2 часа после трансвагинальной пункции фолликулов обученным эмбриологом с опытом работы более 5 лет.

Сперматозоиды с наилучшей морфологией отбирали для инъекции с помощью инвертированного микроскопа, оснащенного микроманипуляторами. После инъекции ооциты переносили в отдельные чашки для культивирования со средой для оплодотворения (G-IVF, Vitrolife, Швеция) до момента наблюдения за пронуклеусами. Оценка наступления стадии двух пронуклеусов проводили через 14–16 часов после оплодотворения. В случае отсутствия двух пронуклеусов

оплодотворение считали несостоявшимся. Все этапы культивирования проводили в мультигазовых инкубаторах СООК (Ирландия) в каплях по 25 мкл под маслом (Irvine Sc., США). Среду CSCM (Irvine Sc., США) не меняли в течение всего процесса культивирования. Бластоцисты были оценены по классификации, принятой Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов в модификации, и согласно Рекомендациям РАРЧ по оценке морфологии ооцитов и эмбрионов (2021).

В качестве основных эмбриологических показателей циклов стимуляции оценивали количество ОКК, зрелых ооцитов (МII), 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.

2.2.6. Перенос эмбриона в полость матки

Перенос эмбрионов осуществляли без анестезиологического пособия врачом-репродуктологом 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.

2.2.7. Диагностика наступления беременности

На 14-й день после переноса эмбриона пациентки сдавали кровь на содержание в крови бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГ) для диагностики беременности. При положительном результате β -ХГ для диагностики клинической внутриматочной беременности на 21-й день после переноса эмбриона выполняли трансвагинальное УЗИ. Дальнейшее наблюдение и ведение беременности осуществляли в индивидуальном порядке.

2.3. Протокол селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса

Во всех случаях оплодотворения использовали собственные ОКК пациентки. При сборе ОКК клетки кумулюса частично отсекали механически с помощью стерильной иглы инсулинового шприца под оптическим микроскопом, предварительно отмыв ОКК от клеток крови и фолликулярной жидкости в буфере с HEPES (Gamete Buffer, COOK, Ирландия). Затем 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 5, фото чашки Петри — рисунок 6. Использовали среду, содержащую HEPES (Gamete Buffer, COOK, Ирландия). Собранные КК помещали в область центральной капли. Обработанные сперматозоиды — в крайнюю левую каплю.

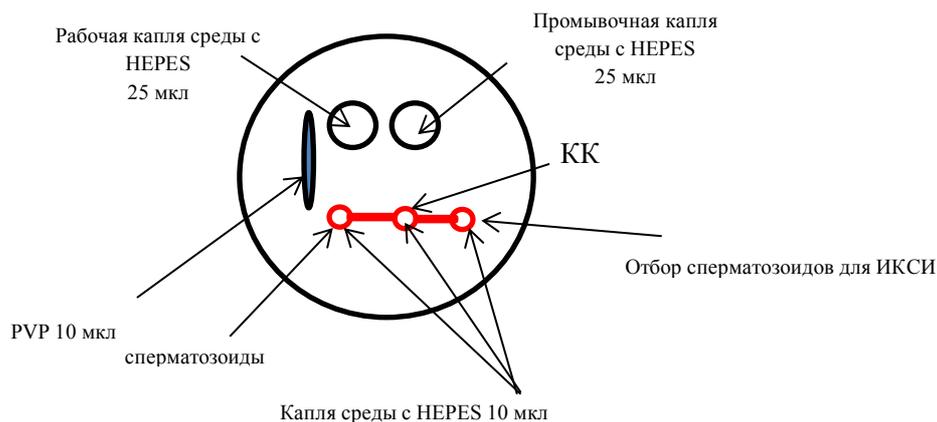


Рисунок 5. Дизайн чашки Петри для селекции сперматозоидов на ооцит-кумулюсных комплексах, PVP – поливинилпирролидон для ИКСИ

Ожидали, что сперматозоиды будут плыть из крайней левой капли через центральную, содержащую клетки кумулюса, собираясь в крайней правой капле. Оттуда микроинструментами для ИКСИ мужские половые клетки отбирали и проводили оплодотворение. Подготовленную рабочую чашку с КК и спермой выдерживали в инкубаторе в течение 1 часа, чтобы сперматозоиды могли пересечь КК.



Рисунок 6. Фото чашки Петри для ИКСИ с селекцией сперматозоидов на клетках кумулюса

2.4. Статистические методы обработки полученных данных

Анализ результатов проводился с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics версии 23.0 (США), а также с помощью таблиц «Microsoft Excel». Для анализа количественных данных в группах определялся вид распределения данных (тест Колмогорова-Смирнова). Непрерывные переменные были представлены в виде медианы (Me) и межквартильных значений (Q1; Q3) на основе распределения выборки. Статистический анализ проводили с помощью теста Манна-Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения. Для описания категориальных бинарных данных (клинико-anamнестические данные и исходы программ ВРТ (имплантация и роды)) использовали процентные доли от общего числа пациенток в группе P и абсолютные числа N в формате P% (N). Анализ номинальных данных проводили с помощью критерия Хи-квадрат и точного критерия Фишера. Для сравнения групп по номинальным признакам в проспективном исследовании рассчитывали относительный риск (ОР) с 95% доверительным интервалом (ДИ) для сравнения вероятности исхода (имплантация, роды) в зависимости от наличия фактора (селекция сперматозоидов на ОКК). Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05. Силу связи или зависимости между бинарными величинами рассчитывали с помощью отношения рисков (ОР). Дополнительно оценивали статистическую значимость ОР, исходя из значений 95% доверительного интервала (ДИ).

К количественным переменным относили возраст женщины, количество ОКК, количество МП ооцитов, количество оплодотворенных клеток (2PN), количество бластоцист хорошего и отличного качества, процент зрелых клеток, процент оплодотворения, процент бластуляции,

количество попыток ЭКО/ИКСИ в анамнезе. В качестве клинико-анамнестических данных, закодированных в бинарном виде, рассматривали наличие трубно-перитонеального фактора (ТПФ), наличие эндометриоза I, II стадий распространения, первичное (Б1) или вторичное бесплодие (Б2), а также принадлежность к изучаемым группам (селекция сперматозоидов на ОКК или стандартная процедура проведения ИКСИ). Под бластуляцией понимали процент бластоцист хорошего и отличного качества, пригодных для переноса или криоконсервации.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Клинико-анамнестическая характеристика супружеских пар, включенных в программы лечения бесплодия методами ВРТ

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. Росто-весовые показатели представлены в таблице 4. Женщины с недостатком массы тела в исследование включены не были. Согласно результатам теста Колмогорова-Смирнова, распределение значений количественных характеристик значительно отличается от нормального ($p < 0,05$). Представленные данные демонстрируют отсутствие достоверных различий по показателям роста, веса и ИМТ между исследуемыми группами ($p > 0,05$).

Анализ типа бесплодия и числа предыдущих попыток ВРТ у исследуемых женщин представлен в таблице 5. 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 4. Данные о параметрах телосложения женщин в программах лечения бесплодия анализируемых групп

Группа исследования	Рост, см	Вес, кг	ИМТ, кг/м²
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 5. 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 6 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 6. Различий между анализируемыми группами по структуре женского фактора бесплодия не выявлено.

Таблица 6. 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 7. Представленные данные демонстрируют, что гормональный статус обследованных женщин был в пределах нормативных значений.

Таблица 7. Гормональный статус обследованных женщин в анализируемых группах

Показатель	Группа 1 (КК) n=130	Группа 2 (ИКСИ) n=137	Уровень значимости, 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 7, указывают на отсутствие различий в гормональном профиле обследуемых женщин групп 1 и 2. Характеристика менструального цикла исследуемых групп женщин показана в таблице 8. Статистически значимых различий также не обнаружено.

Таблица 8. Характеристика менструального цикла у пациенток, включенных в исследование

Показатель	Группа 1 (КК) n=130	Группа 2 (ИКСИ) n=137	Уровень значимост и, р
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-anamнестические данные супругов в анализируемых группах показаны в таблице 9.

Согласно представленным результатам, анализируемые группы статистически значимо не отличались друг от друга ни по возрасту пациенток, ни по клинико-anamнестическим признакам: преобладанию типа бесплодия (первичное или вторичное), наличию 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 9. Характеристика мужчин в программах ВРТ, включенных в исследование

Показатель	Группа 1 (КК) n=130	Группа 2 (ИКСИ) n=137	Уровень значимости, 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*

3.2. 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 10. 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 10. 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-	7 (4; 12)	6 (3; 10)	0,08

Показатель	Группа 1 (КК) n=130	Группа 2 (ИКСИ) n=137	Уровень значимости, p
кумулясных комплексов			
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 11. 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 11. **Исходы программ ВРТ (имплантация и роды) в анализируемых группах**

	Группа 1 (КК) n=117	Группа 2 (ИКСИ) n=117	Уровень значимости*, p	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 12. 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 12. 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*

3.3. Результаты лечения бесплодия методами ВРТ с селекцией сперматозоидов с помощью кумулюсных клеток в зависимости от возраста женщины

Поскольку схема овариальной стимуляции, в частности, тип триггера финального созревания ооцитов, влияют на качество

получаемых ооцит-кумулюсных комплексов (ввиду различного механизма действия лекарственных препаратов), на следующем этапе диссертационной работы была проведена стратификация пациенток по возрасту женщин и используемому триггеру финального созревания ооцитов. Супружеские пары были поделены на группы пациенток моложе 35 лет (n=167) и старше 35 лет (n=100) с учетом типа селекции сперматозоидов при оплодотворении методом ИКСИ. Клинико-анамнестические данные и параметры эмбриологического этапа программы лечения бесплодия выделенных подгрупп показаны в таблицах 13 и 14.

Таблица 13. Клинико-анамнестические данные и характеристики эмбриологического этапа для когорты пациенток в возрасте ≤ 35 лет

Признак	Группа 1 (КК)	Группа 2 (ИКСИ)	Уровень значимости, p
Возраст ≤ 35 лет	n=86	n=81	
Возраст женщины, лет	31 (30; 33)	32 (29; 34)	0,57*
Триггер ХГЧ	65,1% (56/86)	64,2% (52/81)	0,90*
Триггер аГнРГ	34,9% (30/86)	35,8% (29/81)	
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	50 (28; 81)	47 (23; 77)	0,33*
Процент прогрессивно подвижных сперматозоидов, %	52 (40; 62)	48 (39; 61)	0,60*
Процент сперматозоидов с нормальной морфологией, %	2 (1; 3)	2 (1; 3)	0,34*
Количество ОКК	9 (5; 14)	8 (5; 13)	0,32*
Количество МП ооцитов	7 (4; 11)	6 (3; 9)	0,17*

Признак	Группа 1 (КК)	Группа 2 (ИКСИ)	Уровень значимости, р
Количество оплодотворенных клеток (2PN)	6 (3; 9)	4 (3; 8)	0,06*
Количество бластоцист	3 (1; 5)	2 (1; 3)	0,02*
Процент МП ооцитов, %	83,3 (70; 100)	80 (66,7; 100)	0,38*
Процент бластуляции, %	50 (40; 66,7)	50 (33,3; 66,7)	0,70*
Количество попыток ЭКО в анамнезе	1 (1; 2)	2 (1; 2)	0,06*
Первичное бесплодие	65,4% (64/86)	74,4% (53/81)	0,21**
Вторичное бесплодие	34,6% (22/86)	25,6% (28/81)	0,20**
Трубно-перитонеальный фактор бесплодия	23,3% (20/86)	27,2% (22/81)	0,56**
Наружный генитальный эндометриоз I и II стадии распространения	22,1% (19/86)	28,4% (23/81)	0,35**

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

Несмотря на то, что эмбриологические показатели в абсолютных значениях (количество оплодотворившихся ооцитов и число бластоцист) в группе КК статистически значимо отличались от таковых в группе ИКСИ и были выше, при сравнении соответствующих относительных величин данных значений эти различия не подтвердились

при анализе результатов эмбриологического этапа в когорте женщин моложе 35 лет.

Таблица 14. Клинико-анамнестические данные и характеристики эмбриологического этапа для когорты пациенток в возрасте 35+ лет.

Признак	Группа 1 (КК)	Группа 2 (ИКСИ)	Уровень значимости, р
Возраст 35+ лет	n=44	n=56	
Возраст женщины, лет	39 (36,5; 41)	39 (38; 42)	0,17*
Триггер ХГЧ	79,5% (35/44)	96,4% (54/56)	0,01**
Триггер аГнРГ	20,5% (9/44)	3,6% (2/56)	
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	51,5 (26; 66)	42 (28; 71)	1,00*
Процент прогрессивно подвижных сперматозоидов, %*	46,2 (16,6)	43,7 (17,7)	0,47*
Процент сперматозоидов с нормальной морфологией, %	2 (1; 2,5)	2 (1; 3)	0,82*
Количество ОКК	5 (3; 7)	4 (2; 7,5)	0,25*
Количество МII ооцитов	4 (2; 6)	3 (2; 6)	0,32*
Количество оплодотворенных клеток (2PN)	3 (2; 5)	2 (2; 4)	0,07*
Количество бластоцист	2 (1; 3)	1 (1; 2)	0,001*
Процент МII ооцитов, %	81,7 (68,3; 100)	81,7 (66,7; 100)	0,43*
Процент оплодотворившихся клеток (2PN), %	100 (77,5; 100)	100 (66,7; 100)	0,41*

Признак	Группа 1 (КК)	Группа 2 (ИКСИ)	Уровень значимости, р
Процент бластуляции, %	55 (50; 100)	50 (25; 77,5)	0,03*
Количество попыток ЭКО в анамнезе	2 (1; 3)	2 (1; 3,5)	0,70*
Распространенность типа бесплодия	Б1 45,5% (20/44) Б2 54,5% (24/44)	Б1 35,7% (20/56) Б2 64,3% (36/56)	0,32**
Трубно-перитонеальный фактор бесплодия	22,7% (10/44)	28,6% (16/56)	0,51**
Наружный генитальный эндометриоз I и II стадии распространения	25,0% (11/44)	23,2% (13/56)	0,84**

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

Стоит отметить, что результаты сравнения показателей эмбриологического этапа в группе пациентов старше 35 лет показали статистически значимое увеличение процента бластуляции в подгруппе пациенток, которым проводился отбор сперматозоидов с использованием КК ($p=0,03$). Также обращает на себя внимание значимое отличие между группами в частоте использования триггера финального созревания ооцитов в протоколах стимуляции: в группе ИКСИ чаще использовался препарат ХГЧ по сравнению с аГнРГ.

Исходы программ ВРТ в анализируемых группах и подгруппах представлены в таблицах 15 и 16. На основании полученных данных ни частота наступления беременности, ни частота родов не зависят от проведения селекции сперматозоидов на КК как среди молодых

пациенток (≤ 35 лет), так и среди женщин позднего репродуктивного возраста старше 35 лет.

Таблица 15. 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

Таблица 16. Исходы программ ВРТ в анализируемых группах в зависимости от используемого триггера финального созревания ооцитов

	ХГЧ	аГнРГ	Уровень значимости, р	ОР (95% ДИ)
КК n=117	n=89	n=28		
Частота имплантации в расчете на перенос, %	44,9% (40/89)	17,9% (5/28)	0,01	2,52 (95% ДИ 1,10; 5,76)
Частота родов (в расчете на перенос), %	34,8% (31/89)	14,2% (4/28)	0,34	2,4 (95% ДИ 0,94; 6,3)
Частота родов (в расчете на беременность), %	77,5% (31/40)	80,0% (4/5)	0,90	0,97 (95% ДИ 0,61; 1,55)
ИКСИ n=117	n=93	n=24		
Частота имплантации в расчете на перенос, %	36,6% (34/93)	33,3% (8/24)	0,82	1,10 (95% ДИ 0,59; 2,05)
Частота родов (в расчете на перенос), %	38,7% (26/93)	20,8% (5/24)	0,28	1,45 (95% ДИ 0,62; 3,41)

Частота родов (в расчете на беременность), %	76,5% (26/34)	62,5% (5/8)	0,42	1,22 (95% ДИ 0,69; 2,16)
--	---------------	-------------	------	--------------------------

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

Анализ результатов лечения двух групп пациенток (исследуемой и контрольной) вне зависимости от возраста показал, что в группе с селекцией сперматозоидов с помощью КК при проведении протоколов стимуляции с использованием в качестве триггера препарата ХГЧ статистически значимо чаще происходила имплантация эмбриона по сравнению с использованием в протоколах стимуляции аГнРГ. В группе пациенток с ИКСИ не было обнаружено разницы ни в частоте имплантации, ни в частоте родов в зависимости от триггера.

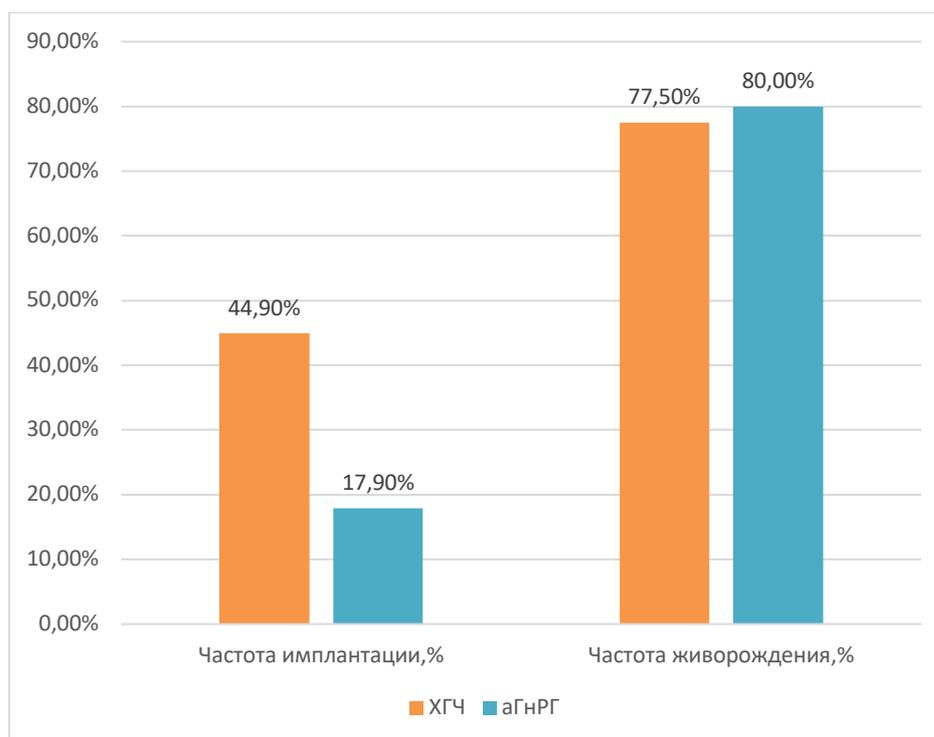


Рисунок 7. Клинические исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ с селекцией сперматозоидов на клетках кумулюса в зависимости от типа триггера финального созревания ооцитов

3.4. 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 17.

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 17. 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

	Группа 1 (КК)	Группа 2 (ИКСИ)	Уровень значимости, p
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 18. 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 удается 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 18. 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*

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

При каждом половом акте миллионы сперматозоидов попадают во влагалище, но только около 1000 мужских гамет достигают фаллопиевой трубы для потенциального оплодотворения яйцеклетки. Существенное снижение числа сперматозоидов, достигающих фаллопиевой трубы, является результатом отбора при оплодотворении *in vivo*. Чтобы пройти отбор, сперматозоиды должны быть способны взаимодействовать с женскими половыми путями и проникать через клетки кумулюса и блестящую оболочку.

По оценкам, бесплодие затрагивает 15% пар репродуктивного возраста (15–49 лет) во всем мире, а мужское бесплодие составляет 20–70% в структуре бесплодного брака. Методы ВРТ позволяют эффективно преодолевать бесплодие, однако около 10% супружеских пар сталкиваются с неудачами оплодотворения, арестом дробления эмбрионов и отсутствием эмбрионов, пригодных для переноса в полость матки. Метод ИКСИ частично позволил преодолевать мужской фактор бесплодия, однако до настоящего момента эффективность зачатия при нарушениях сперматогенеза остается ниже по сравнению с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

Исследователи пытаются улучшить отбор сперматозоидов в эпоху ИКСИ, применяя различные методы. Одним из них является использование КК, эффективность которого была оценена в настоящей работе. Как показали клинические результаты проведенного исследования, частота имплантации (38,5% в группе КК против 35,9% в группе ИКСИ) в общей когорте пациенток достоверно не увеличивается при селекции сперматозоидов на КК. Частота успешных родов также осталась прежней (77,8% в группе КК против 73,8% в группе ИКСИ). Эмбриологический этап в общей когорте пациентов достоверно не

улучшается. Была показана лишь тенденция к увеличению числа бластоцист отличного и хорошего качества при оплодотворении сперматозоидами, прошедшими КК, и как следствие — увеличению числа эмбрионов, пригодных для переноса в полость матки и криоконсервации.

Однако при выделении групп пациентов с показателями морфологии сперматозоидов 0–1% и 2–3%, то есть при стратификации тератозооспермии на легкую и выраженную, было обнаружено достоверное увеличение процента оплодотворения (100% в группе КК и 77,78% в группе ИКСИ, $p=0,001$). Процент дорастания бластоцист отличного и хорошего качества при такой стратификации также был достоверно выше в группе селекции сперматозоидов на КК (60% в группе КК против 50% в группе ИКСИ, $p=0,004$).

Необходимо отметить, что тератозооспермия в настоящее время является достаточно сложной патологией, поскольку не поддается медикаментозной терапии [33]. Пациенты с отсутствием морфологически нормальных сперматозоидов в программах лечения бесплодия нуждаются в поиске дополнительных критериев селекции мужских гамет, так как до сих пор нет единого мнения о влиянии морфологии на исходы лечения. Более того, все чаще пишут о стандартизации оценки морфологии мужских половых клеток с помощью методов машинного обучения для снижения субъективности исследования [39, 62]. Одним из наиболее широко распространённым в клиниках экстракорпорального оплодотворения способов селекции сперматозоидов при тератозооспермии считается ПИКСИ — физиологический отбор по связыванию с гиалуроновой кислотой в чашке Петри. Однако накопленные данные не подтверждают улучшения эмбриологических параметров программы лечения бесплодия у пациентов с выраженной тератозооспермией. Более того, используемая синтезированная

гиалуроновая кислота не всегда является хорошим инструментом для отбора в виду своей нефизиологичности.

Интересно, что с годами произошли значительные изменения в классификации морфологии сперматозоидов. Нормальные референсные значения морфологии сперматозоидов были резко пересмотрены с $\geq 80,5\%$, указанных в 1-м издании руководства ВОЗ до $\geq 14\%$ в 4-м издании, и даже ниже, до $\geq 4\%$ в 5-м и самом последнем издании. «Строгие критерии» оценки морфологии сперматозоидов по Крюгеру классифицируют эякулят как фертильный, если процент нормальных сперматозоидов составляет $\geq 14\%$. Показано, что аномальная морфология сперматозоидов связана с плохим оплодотворением и клиническими исходами после вспомогательных репродуктивных технологий, тем самым было установлено, что морфология сперматозоидов является предиктором исходов ВРТ. Пороговое значение морфологии сперматозоидов, основанное на строгих критериях, было еще раз пересмотрено в 5-м издании руководства ВОЗ, в котором используются 5-е процентиля (и их 95% доверительные интервалы [ДИ]) в качестве нижнего контрольного предела (отсечка $\geq 4\%$ для нормальной морфологии сперматозоидов). Нижний предел для морфологически нормальных форм сперматозоидов составляет 4% (95% ДИ, 3–4%) и все пограничные формы считаются аномальными. Эта классификация служит до сих пор неоптимальным инструментом для выбора наиболее подходящего типа процедуры ВРТ для бесплодных пар: внутриматочная инсеминация, классическое ЭКО или ИКСИ. К сожалению, в российских клинических рекомендациях по женскому бесплодию также не даны указания на конкретные значения параметров эякулята, при которых рекомендован тот или иной метод ВРТ.

В настоящее время специалисты в области репродуктивной медицины считают, что оценка морфологии сперматозоидов очень субъективна и во многом зависит от восприятия наблюдателя, оценивающего предметное стекло. Для получения надежных и воспроизводимых результатов андрологическая лаборатория должна разработать подробный пошаговый протокол отбора сперматозоидов. Кроме того, использование окулярного микрометра необходимо для измерения размеров сперматозоидов.

Согласно рекомендациям ВОЗ, головка спермия должна быть овальной формы, гладкой, правильной формы, длиной от 5 до 6 мкм и шириной от 2,5 до 3,5 мкм [28]. Акросома должна быть четко очерченной, занимать от 40 до 70% общей площади головки и содержать не более двух мелких вакуолей. Вакуоли не должны занимать более 20% площади головки спермия. Акросомальная область окрашивается в светло-синий цвет, а постакросомальная область окрашивается в темно-синий цвет (краситель Дифф-квик, Испания). Постакросомальная область не должна содержать вакуолей. Средняя часть должна быть правильной формы, тонкой, примерно такой же длины, как и головка спермия, окрашена в пурпурно-красный цвет. Средняя часть также должна быть выровнена с осью головки сперматозоида. Если присутствует остаточная цитоплазма, превышающая одну треть площади головки, сперматозоид следует рассматривать как аномальный [47]. При наличии избыточной остаточной цитоплазмы вокруг средней части можно увидеть розово-красный или красновато-оранжевый цвет в зависимости от типа используемого окрашивания. Жгутик должен быть примерно 45 мкм в длину, однородным по всей длине, казаться тоньше средней части и окрашен в синий или красноватый цвет. Необходимо подсчитать не менее 2 повторов из 100 сперматозоидов, при этом все пограничные формы

считаются аномальными. При соблюдении этой строгой классификации референсный порог составляет $\geq 4\%$ для морфологически нормальных форм. В нашей работе морфология сперматозоидов была оценена именно по строгим критериям, описанным выше. Улучшение параметров раннего эмбриогенеза, которые мы обнаружили в группе мужчин с выраженной тератозооспермией, а именно повышение частоты оплодотворения и частоты бластуляции в группе селекции на клетках кумулюса, согласуются с исследованием влияния морфологии на эмбриогенез [14, 71, 6]. Применение дополнительного критерия отбора на эмбриологическом этапе программ лечения позволяет улучшить исходы, что также было подтверждено в настоящей диссертационной работе [48]. Данные результаты указывают на целесообразность использования данного метода селекции сперматозоидов при тератозооспермии с показателями морфологически нормальных сперматозоидов 0–1%. Особенно важно использовать дополнительные критерии отбора сперматозоидов при 100% тератозооспермии (0% морфологически нормальных сперматозоидов). Действительно, при стратификации в группы по морфологии сперматозоидов нам не удалось показать значимое повышение эффективности программ лечения бесплодия методами ВРТ. В группе 0–1% частота имплантации при селекции на клетках кумулюса составила 31,8%, при стандартном ИКСИ — 25,7% ($p=0,62$), однако прослеживалась положительная тенденция. Вероятно, при увеличении выборки можно будет получить достоверную разницу. Частота родов также при тератозооспермии 0–1% достоверно не увеличилась после селекции сперматозоидов на КК и составила 71,4% против 77,8% в группе ИКСИ.

При этом важным результатом настоящей работы является увеличение числа эмбрионов хорошего и отличного качества при

тератозооспермии 0–1% при оплодотворении сперматозоидами, отобранными на клетках кумулюса. Это дает шанс супружеской паре без повторной овариальной стимуляции вступить в программу переноса размороженного эмбриона и достичь долгожданной беременности. Также использование селекции на КК в этой когорте пациентов позволяет снизить государственные затраты на рождение 1 ребенка, поскольку стоимость полной программы ВРТ по сравнению с криопротоколом отличается в 3 раза.

Согласно современным молекулярно-биологическим данным о влиянии мужских гамет на ранний эмбриогенез, сперматозоид вносит в ооцит не только свою ДНК. На развитие эмбриона оказывают влияние и ДНК-разрывы, и содержание малых некодирующих РНК сперматозоида.

На поздних стадиях сперматогенеза (спермиогенеза) мужская гамета подвергается молекулярному ремоделированию. Гистоновые белки замещаются протаминами, а гаплоидная ДНК сперматозоидов разрывается на несколько частей, чтобы занимать как можно меньше места внутри головки клетки. Гистон-протаминовый переход происходит в придатке яичка. Кроме того, известно, что некоторые клинические факторы и факторы окружающей среды оказывают негативное влияние на целостность ДНК сперматозоидов, увеличивая процент фрагментации. Многочисленные исследования подчеркивают прямую связь между уровнем фрагментации ДНК, мужским бесплодием и увеличением частоты ранних репродуктивных потерь после ВРТ [71, 61, 39]. Показано, что низкий уровень фрагментации может быть репарирован компетентными ооцитами, а вот высокие значения коррелируют с задержкой морфокинетики эмбриона, наблюдаемой с момента исчезновения пронуклеусов до стадии морулы [70]. Следствием этого является более низкая частота бластуляции и наступления беременности

[3]. Таким супружеским парам не рекомендовано даже проведение преимплантационного генетического тестирования, поскольку ДНК-фрагментация сперматозоидов и уровень анеуплоидии в эмбрионе являются двумя независимыми параметрами [18].

Достижения в области молекулярной биологии, в частности, секвенирование РНК, позволили в последние годы охарактеризовать полное содержание РНК в сперматозоиде, которое включает как кодирующие, так и не кодирующие РНК, такие как мРНК, микроРНК, рРНК, пиРНК, днРНК, siRNA, tRF и др. [38, 10, 24]. Доказано, что некоторые РНК кодируются генами, упакованными в гистоны H2M4me3, которые совместимы с транскрипцией. Поэтому недавно было высказано предположение, что сперматозоид может быть способен к транскрипции *de novo*, по крайней мере, в специфических локусах ДНК. Ряд транскриптов, кодирующих факторы роста, факторы транскрипции или протеинкиназы, были идентифицированы в сперме человека в разной концентрации у бесплодных пациентов по сравнению с фертильным контролем [63, 45, 5]. Некоторые РНК сперматозоидов могут быть маркерами мужского бесплодия и при их инъекции в ооциты при ИКСИ приводить к нарушению раннего эмбриогенеза [4]. Именно поэтому становится все более очевидным разработка технологий селекции сперматозоидов для ИКСИ при лечении супружеской пары. Как показывают результаты настоящей диссертационной работы, селекция сперматозоидов с помощью клеток кумулюса может стать одним из таких методов.

Опубликованные результаты зарубежных авторов частично согласуются с полученными в данной работе результатами [13, 30, 20]. По данным этих исследований, эффективный подход, основанный на отборе сперматозоидов с помощью ооцит-кумулюсных комплексов,

обеспечивает безопасную селекцию сперматозоидов в чашке ИКСИ [20]. Naknam W. с соавторами было проанализировано 857 сиблинговых ооцитов на стадии МII, которые произвольно и поровну были поделены для оплодотворения с использованием КК-ИКСИ (n=429) и стандартным ИКСИ (n=428). У яйцеклеток, оплодотворенных сперматозоидами, отобранными с помощью КК, коэффициент оплодотворения был выше, чем в группе обычного ИКСИ (85,31% против 74,77%; $p < 0,05$). Статистически достоверных различий в коэффициенте дробления (98,09% против 98,13%; $p > 0,05$) и частоте получения эмбрионов без фрагментаций на 3-й день (63,23% против 58,92%; $p > 0,05$) между КК-ИКСИ и обычным ИКСИ не выявлено.

Однако при рассмотрении дальнейшего развития по сравнению с группой обычного ИКСИ группа КК-ИКСИ показала большую частоту формирования бластоцист на 5-й день (46,52% против 38,85%; $p < 0,05$) и бластоцист отличного качества, пригодных для переноса в полость матки и криоконсервации (38,72% против 24,20%; $p < 0,05$). Кумулятивный показатель имплантации эмбрионов при КК-ИКСИ и при обычном ИКСИ составили 64,3% и 53,9%, соответственно. Это подтверждает наши данные об отсутствии эффекта селекции сперматозоидов на клетках кумулюса в общей когорте пациентов на исходы программ ВРТ. В отличие от зарубежных авторов, мы стратифицировали пациентов по морфологии сперматозоидов и получили значимые результаты в группе мужчин с выраженной тератозооспермией 0–1%. Такие данные в зарубежной научной литературе нами найдены не были.

В настоящей работе был применен метод отбора сперматозоидов с помощью аутологичных клеток кумулюса супруги в зависимости от возраста пациентки. Полученные данные показали, что возраст женщины имеет критическое значение при любом методе

оплодотворения: как с КК, так и без. В группе молодых пациентов до 35 лет абсолютные значения количества полученных бластоцист на 5 сутки культивирования были значимо выше в группе с применением селекции на КК по сравнению с традиционным ИКСИ (Ме 2 (1;3) и 3 (1; 5), $p=0,02$). Однако это может быть связано с большим числом полученных ооцитов на стадии МП ($p=0,05$). При этом пациентки в группе традиционного ИКСИ были со значимо большим числом неудачных попыток в анамнезе, при этом по причинам бесплодия в супружеской паре группы не отличались.

В группе пациенток позднего репродуктивного возраста также показано статистически значимо большее число бластоцист на 5 сутки культивирования при селекции сперматозоидов с помощью КК ($p=0,03$). По остальным анализируемым параметрам группы между собой не отличались. Данные результаты могут говорить о целесообразности применения селекции сперматозоидов на КК для улучшения эмбриологического этапа, а именно для увеличения числа бластоцист. Однако мы не изучали генетический статус полученных эмбрионов. Для группы женщин младше 35 лет большее число полученных бластоцист в виду низкого риска анеуплоидий в эмбрионах позволит в рамках одной овариальной стимуляции и нескольких криопротоколов получить долгожданную беременность и родить здорового ребенка.

Для группы женщин позднего репродуктивного возраста, когда возрастает риск хромосомных аномалий в эмбрионах, улучшение эмбриологических показателей в виде увеличения числа бластоцист, пригодных для переноса в полость матки, может привести как к рождению ребенка с генетическими нарушениям, так и множественным неудачным попыткам переноса размороженного эмбриона в полость матки. Для женщин старше 35 лет остается актуальной рекомендация по

проведению преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на анеуплоидии для снижения риска рождения детей с хромосомной патологией.

При анализе исходов программ лечения бесплодия методами ВРТ с разными типами селекции сперматозоидов было выявлено отсутствие статистически значимой разницы во всех возрастных группах пациенток по частоте наступления беременности и родов.

Ввиду того, что триггер финального созревания фолликулов преимущественно действует на клетки кумулюса, пациентки были стратифицированы по использованию препарата финального созревания ооцитов: ХГЧ и аГнРГ. Из анализа были исключены женщины, которым не проводили перенос эмбриона в полость матки по причине неготовности эндометрия или риска развития синдрома гиперстимуляции яичников. В результате группу КК составили 117 пациенток, группу традиционного ИКСИ — так же 117 пациенток. При оценке влияния триггера финального созревания фолликулов было выявлено, что при использовании ХГЧ и селекции сперматозоидов на КК достоверно выше частота имплантации эмбрионов в полости матки (КК — 44,9%, ИКСИ — 17,9%, $p=0,01$), при этом частота родов из расчета на клиническую беременность значимо не отличалась. В группе ИКСИ данных закономерностей выявлено не было.

Выявленные достоверные результаты по частоте имплантации в группе женщин позднего репродуктивного возраста в зависимости от типа триггера позволяют предположить, что экспансия клеток кумулюса и их физиологическое состояние имеют принципиальное значение для селекции сперматозоидов.

Поиск протокола стимуляции функции яичников, когда соблюдается оптимальный баланс между качеством получаемых ооцитов

и низкой вероятностью развития клинически значимого синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ), всегда оставался в фокусе внимания врачей-репродуктологов. За несколько десятилетий хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) в качестве триггера финального дозревания ооцитов зарекомендовал себя как превосходный заменитель всплеска естественного эндогенного лютеинизирующего гормона (ЛГ). Тем не менее, ХГЧ потенциально может вызвать опасное для жизни ятрогенное осложнение, СГЯ, у здоровых женщин из-за его длительного периода полувыведения. Действие ХГЧ основано на его физиологической роли в коммуникации между ооцитом и кумулюсными клетками, его влияние очень важно для ядерного и цитоплазматического созревания всего ооцит-кумулясного комплекса. С момента появления протоколов с антагонистами ГнРГ для предотвращения преждевременного выброса ЛГ были разработаны протоколы с препаратами агонистов ГнРГ (а-ГнРГ), обеспечивающие более безопасный вариант индукции окончательного созревания ооцитов.

Как и в естественном цикле, повышение продукции эстрогена доминантным фолликулом вызывает всплеск ЛГ, который инициирует реактивацию ооцитов в мейозе, экспансию (или расширение) клеток кумулюса, синтез простагландинов и лютеинизацию клеток гранулезы [68, 26].

С другой стороны, использование а-ГнРГ как триггера приводит к более короткой продолжительности высвобождения ЛГ по сравнению с естественным менструальным циклом. При проведении овариальной стимуляции желтое тело, которое стимулируется ЛГ, может быть недостаточно активным. Исследования показали более короткую продолжительность лютеиновой фазы при овариальной стимуляции с использованием препарата а-ГнРГ в качестве триггера финального

созревания ооцитов [50]. Возникающий при этом дефицит лютеиновой фазы должен быть скорректирован назначением препаратов эстрадиола и прогестерона, или дополнительным однократным назначением препарата а-ГнРГ в дозе 0,1 мг на 5-й день после трансвагинальной пункции фолликулов.

В недавнем рандомизированном клиническом исследовании Taheripana H. et al. сравнили влияние а-ГнРГ и ХГЧ в качестве триггера финального дозревания на ооциты при стимуляции комбинацией препаратов кломифена цитрата и рекомбинантного ФСГ. Авторы не обнаружили различий в частоте оплодотворения, имплантации, наступления беременности, между двумя триггерами, хотя не упомянули о частоте возникновения преждевременной овуляции [9]. Аналогичным образом в исследовании Yumusak A. et al., после стимуляции функции яичников у 280 пациенток с бесплодием препаратами кломифен цитрата и ХГЧ в качестве триггера, авторы не обнаружили существенной разницы в отношении возраста женщин, продолжительности бесплодия, толщины эндометрия и количества зрелых фолликулов, влияющих на исход среди групп [72]. Эта информация подтверждает тот факт, что и аГнРГ, и ХГЧ эффективно вызывают дозревание ооцитов, независимо от упомянутых факторов. Однако данные триггеры финального созревания ооцитов по-разному влияют на клетки кумулюса. Этот факт является несущественным при оплодотворении методом ИКСИ, поскольку ооцит с помощью фермента гиалуронидазы проходит подготовку к оплодотворению. Однако при использовании клеток кумулюса для отбора сперматозоидов вид триггера оказался существенным в группе женщин позднего репродуктивного возраста. Возможно это связано с выбросом ФСГ гипофизом при действии а-ГнРГ, а уровень ФСГ и так несколько повышен у таких пациенток в силу возраста. Возможно,

суммарная концентрация ФСГ в фолликулярной жидкости у возрастных пациенток ингибировала экспансию клеток кумулюса и привела к недостаточно эффективной селекции сперматозоидов, чего не наблюдали у пациенток молодого возраста с заранее более низкими показателями ФСГ. Более того, еще в 1979 году была опубликована работа, которая доказала, что синтез гиалуроновой кислоты *in vitro* в ооцит-кумуляном комплексе стимулируется ФСГ, но не ЛГ, при этом существует пороговая концентрация ФСГ, обладающая подавляющими свойствами на гликозаминогликан [22]. Дозозависимый эффект ФСГ на экспансию клеток кумулюса и фертильность ооцитов был также подтвержден на животных моделях и при разработке технологии дозревания ооцитов IVМ [17, 42, 59].

Таким образом, можно говорить о том, что селекция сперматозоидов на КК повышает эффективность программ лечения бесплодия при использовании ХГЧ в качестве триггера финального созревания фолликулов. Данный факт можно объяснить влиянием ХГЧ на клетки кумулюса. В естественном овуляторном менструальном цикле разрыв доминантного фолликула и выход ооцитов инициируется резким подъемом уровня лютеинизирующего гормона (ЛГ) в середине цикла. Экзогенный ХГЧ поддерживает лютеиновую фазу благодаря длительному периоду полувыведения, по этой же причине ХГЧ увеличивает вероятность развития синдрома гиперстимуляции яичников. Более длительное воздействие ХГЧ на клетки кумулюса в силу природы действия препарата позволяет ооцит-кумуляному комплексу формировать менее плотные связи на гиалуроновом матриксе, тем самым, вероятно, способствуя лучшей селекции сперматозоидов. КК при использовании аГнРГ в качестве триггера финального созревания

ооцитов не имеют такого «распушенного» матрикса, тем самым менее эффективно происходит отбор сперматозоидов при этом.

На сегодняшний день в современной научной литературе представлены немногочисленные данные, касающиеся эффективности селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса. Данные о влиянии типа триггера на эффективность селекции сперматозоидов с помощью клеток кумулюса представлены впервые. Аналогичные исследования найдены не были.

Суммируя представленные результаты, можно с уверенностью говорить о том, что технология отбора сперматозоидов с помощью клеток кумулюса может улучшить существующую технику ИКСИ, тем самым увеличив эффективность программ лечения бесплодия методами ВРТ, особенно у супружеских пар с выраженным фактором мужского бесплодия. Кроме того, данная методика приближена к естественному процессу селекции мужских гамет и в меньшей степени зависит от субъективного решения клинического эмбриолога, основанного только на оценке параметров и подвижности сперматозоидов. Кроме того, отбор мужских половых клеток на КК не повышает частоту потенциальных рисков для пациентов и не увеличивает частоту прогнозируемых осложнений. Учитывая результаты проведенных исследований, можно сделать вывод о высокой перспективности использования такого метода, в результате которого процедура оплодотворения ИКСИ, вероятно, станет еще более совершенной, что позволит повысить частоту наступления клинической беременности и живорождения.

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 blastocyst хорошего и отличного качества.

**АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К
ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТЕХНОЛОГИИ СЕЛЕКЦИИ
СПЕРМАТОЗОИДОВ С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОК КУМУЛЮСА**



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляева Н.А. и др. Возможности применения преимплантационной генетической диагностики с целью повышения эффективности программ ЭКО/ИКСИ у супружеских пар с мужским фактором бесплодия и генетическими особенностями у мужчин / Беляева Н.А., Калинина Е.А., Горшинова В.К. // Акушерство и гинекология. – 2016. – №8. – С.107-111.
2. Бесплодный брак / Назаренко Т.А., Бирюкова А.М., Макарова Н.П., Джанашвили Л.Г., Амян Т.С., Королькова А.И., Драпкина Ю.С., Власова Г.А., Хачатрян Н.А., Митюрин Е.В., Мартиросян Я.О., Соколова Ю.В., Колесова В.И., Фролова Д.В., Макарова Т.А., Гаджимурадова Ж.А., Погосян К., Курылева Н.В., Федорова В.Н., Андреева П.Д. и др. //Клинические задачи и их решение / Москва, 2023
3. Влияние преимплантационного генетического тестирования на результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий у супружеских пар с мужским фактором бесплодия / Н. П. Макарова, Н. Н. Лобанова, Е. В. Кулакова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2021. – № 11. – С. 154-164.
4. Гамидов С.И. Оксидативный стресс сперматозоидов: клиническое значения и коррекция /Шатылко Т.В., Попова А.Ю., Гасанов Н.Г., Гамидов Р.С. //Медицинский совет. 2021. № 3. С. 19-27.
5. Гамидов С.И. Роль антиоксидантных молекул в терапии мужского бесплодия и подготовке мужчины к зачатию ребенка / Шатылко Т.В., Ли К.И., Гасанов Н.Г. //Медицинский совет. — 2020.— № 3.— С.122–129.
6. Гасанов Н.Г. Роль пункционной биопсии яичка в ведении пациентов с азооспермией / Гамидов С.И., Шатылко Т.В., Попова

- А.Ю., Макарова Н.П., Ушакова И.В., Лоран О.Б.// Исследования и практика в медицине. —2020. —Т. 7.— № 3.— С. 43-50.
7. Глинкина Ж.И. и др. Использование высокопроизводительного секвенирования (NGS) в целях профилактики хромосомной патологии в программе ВРТ / Глинкина Ж.И., Курцер М.А., Младова Е.С. // Вестник Росздравнадзора. – 2016. – №5. – С.40-43.
 8. Долгушина Н.В. и др. Преимплантационный генетический скрининг у супружеских пар с патозооспермией у мужчин: анализ затраты – эффективность / Долгушина Н.В., Сокур С.А., Горшкова А.Г. // Акушерство и гинекология. – 2014. – №4. – С. 51-61.
 9. Долгушина Н.В. и др. Риск анеуплоидии эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий у мужчин с патозооспермией (мета-анализ) / Долгушина Н.В., Ратушняк С.С., Сокур С.А. // Акушерство и гинекология. – 2012. – №7. – С.4-13.
 10. Комарова Е.М., Лесик Е.А., Обьедкова К.В., Рыжов Ю.Р., Гзгзян А.М., Тапильская Н.И. Прогностическое значение маркеров митохондриальной дисфункции клеток кумулюса в получении эмбрионов оптимального качества в протоколах вспомогательных репродуктивных технологий. Проблемы репродукции. 2023;29(6):57-64.
 11. Мужское бесплодие / Жуков О.Б., Брагина Е.Е., Корнеев И.А., Кадыров З.А., Епанчинцева Е.А., Коршунов М.Н., Коршунова Е.С., Боголюбов С.В., Витязева И.И., Артамонов А., Лебедев Д.А., Москвичев Д.Д., Осипов И.Б., Красильников Д.Е., Алексеева Л.А., Осипов А.И., Бурханов В.В., Лифанова М.В., Сарычев С.А., Чоговадзе А.Г. и др. // От Национальных клинических рекомендаций к персональной медицине / Москва, 2021.

12. Митюрин Е.В. и др. Причины повторных неудач имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения / Митюрин Е.В., Перминова С.Г., Амян Т.С. // *Акушерство и гинекология*. – 2016. – №11. – С.34-40.
13. Овчинников Р.И. Мужское бесплодие: до и после эпохи коронавируса SARS-COV-2 / Гамидов С.И., Попова А.Ю., Ижбаев С.Х. // *Медицинский совет*. — 2020. — № 13. — С.179–187.
14. Попова А.Ю. Антиоксидантная терапия улучшает показатели НВА-теста у мужчин с бесплодием при подготовке к программам вспомогательных репродуктивных технологий (ЭКО/ИКСИ) / Овчинников Р.И., Гамидов С.И. // *Урология*. — 2019. — № 1. — С. 90-96.
15. Различные методики оплодотворения ооцитов и их взаимосвязь с результативностью программ вспомогательных репродуктивных технологий при лечении бесплодия // А. Х. Дударова, В. Ю. Смольникова, Н. П. Макарова [и др.] // *Акушерство и гинекология*. - 2017. - № 7. - С. 96-103.
16. Сафронова Н.А., Калинина Е.А., Донников А.Е., и др. Перспективы исследования маркеров клеток кумулюса для оценки качества ооцитов и эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология*. 2015;12:21 5
17. Сокур С. А. и др. Взаимосвязь патозооспермии и анеуплоидии хромосом в сперматозоидах и эмбрионах в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Сокур С.А., Долгушина Н.В., Глинкина Ж.И. // *Акушерство и гинекология*. – 2013. – №3. – С.10-13.

18. Седова А.О. Анеуплоидия в сперматозоидах у фертильных мужчин и пациентов с нарушением репродукции / Мартемьянова А.И., Черных В.Б. // Андрология и генитальная хирургия. — 2021. — Т.22. — № 4. — С. 27-35.
19. Соловова О.А. Полноэкзомное секвенирование в комплексной диагностике генетически обусловленных форм мужского бесплодия, связанных с тяжелыми формами патозооспермии / Опарина Н.В., Рыжкова О.П., Сорокина Т.М., Черных В.Б. // Медицинская генетика. 2022. Т. 21. № 10. С. 46-50.
20. Шатылко Т.В. и др. Применение вспомогательных репродуктивных технологий при сложных формах мужского бесплодия и азооспермии / Гамидов С.И., Тамбиев А.Х., Сафиуллин Р.И., Попова А.Ю. // Фармакология & Фармакотерапия. — 2022. № 3. — С.10–16.
21. Analysis Parameters Correlate with Sperm DNA Fragmentation? A Retrospective Study from 2567 Semen Samples Analyzed by the Halosperm Test / SC. Chua, SJ. Yovich, PM. Hinchliffe [et al.] // Perspective Medicine. – 2023. - Mar 13;13, N 3. – P. 518.
22. Assessing spermatozoal small ribonucleic acids and their relationship to blastocyst development in idiopathic infertile males / M. Hamilton, S. Russell, K. Menezes [et al.] // Science Reproduction. – 2022. - Nov 21;12, N 1. – P.20010.
23. Association between Sperm Morphology and Altered Sperm micro RNA Expression / M. Tomic, L. Bolha, J. Pizem [et al.] // Biology (Basel). – 2022. - Nov 17;11, N 11. – P.1671.
24. Auger, J. Another look at human sperm morphology / J. Auger, P. Jouannet, F. Eustache // Human Reproduction. – 2016. – Vol.31, N 1. – P.10-23.

25. Byskov, AG. Role of meiosis activating sterols, MAS, in induced oocyte maturation / AG. Byskov, CY. Andersen, L. Leonardsen // *Molecular Cell Endocrinology*. – 2002. - Feb 22;187, N 1-2. – P.189-196.
26. CCL20-CCR6 axis directs sperm-oocyte interaction and its dysregulation correlates/associates with male infertility‡ / YC. Duan, UP. Wehry, BA. Buhren [et al.] // *Biology Reproduction*. – 2020. - Aug 21;103, N3. – P. 630-642.
27. Comparing the effect of gonadotropin-releasing hormone agonist and human chorionic gonadotropin on final oocytes for ovulation triggering among infertile women undergoing intrauterine insemination: An RCT / R. Taheripannah, M. Zamaniyan, A. Moridi [et al.] // *International J Reproduction Biomedicine*. – 2017. - Vol.15, N 6. – P.351-356.
28. Contribution of semen to early embryo development: fertilization and beyond / M. Vallet - Buisan, R. Mecca, C. Jones [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2023. - Mar 7: dmad006.
29. Correlation analysis of sperm DNA fragmentation index with semen parameters and the effect of sperm DFI on outcomes of ART/ K. Liu, X. Mao, F. Pan [et al.] // *Science Reproduction*. – 2023. - Feb 15;13, N 1. – P.2717.
30. Correlation study of male semen parameters and embryo aneuploidy in preimplantation genetic testing for aneuploidy / H. Yang, Y. Liu, W. Niu [et al.] // *Front Endocrinology (Lausanne)*. – 2023. - Vol.26, N 13. – P.1072176.
31. Cumulus oophorus complexes favor physiologic selection of spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection / C. Wang, G. Feng, J. Shu [et al.] // *Fertility Sterility*. – 2018. – Vol.109, N 5. – P.823-831.

32. Danis, RB. Sperm Morphology: History, Challenges, and Impact on Natural and Assisted Fertility / R. B. Danis, MK. Samplaski // *Current Urology Reproduction*. – 2019. - Jun 15;20, N 8. – P.43.
33. Di Pasquale E. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene / E. Di Pasquale, P. Beck-Peccoz, L Persani // *Am J Human Genetic*. – 2004. – Vol. 75, N 1. – P. 106-111.
34. Diaz, FJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles / FJ. Diaz, K. Wigglesworth, JJ. Eppig. - 2007. – Vol. 120, Pt. 8. – P. 1330-1340.
35. Downs, SM. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte / SM. Downs // *Dev Biology*. – 1995. - Vol.167, N 2. – P. 502-512.
36. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates / A. Casanovas, J. Ribas - Maynou, S. Lara-Cerrillo [et al.] // *Fertility Sterility*. – 2019. - Vol.111, N 4. – P. 699-707.e1.
37. Easy sperm processing technique allowing exclusive accumulation and later usage of DNA-strandbreak-free spermatozoa / T. Ebner, O. Shebl, M. Moser [et al.] // *Reproduction Biomed Online*. – 2011. - Vol. 22, N 1. – P.37-43.
38. Effect of sperm selection method by cumulus oophorus complexes and conventional sperm preparation method on sperm quality and DNA fragmentation for assisted reproduction technology / W. Naknam, L. Salang, J. Sothornwit [et al.] // *European J Obstetrics Gynecology Reproduction Biology*. – 2019. – N 243. – P. 46-50.

39. Eppig, J. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte–cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles / J. Eppig // *J Nature*. – 1979. – N 281. – P. 483–448.
40. Establishment of a capillary-cumulus model to study the selection of sperm for fertilization by the cumulus oophorus / S. J. Hong, P. C. Chiu, K. F. Lee [et al.] // *Human Reproduction*. – 2004. – Vol. 19.- P.1562–1569.
41. Expression of SPAG7 and its regulatory microRNAs in seminal plasma and seminal plasma-derived extracellular vesicles of patients with subfertility / M. Abu-Halima, LS. Becker, MA. Al Smadi [et al.] // *Science Reproduction*. -2023. - Mar 4;13, N 1. – P. 3645.
42. European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) /C. Wyns, C. De Geyter, C. Calhaz- Jorge [et al.] ART in Europe, 2017: results generated from European registries by ESHRE // *Human Reproduction Open*. – 2021. – Vol.5, N 3: hoab026.
43. Evaluation of the safety and efficacy of corifollitropin alfa combined with GnRH agonist triggering in oocyte donation cycles. A prospective longitudinal study / I. Tsakiridis, R. Najdecki, P. Tatsi [et al.] // *JBRA Assist Reproduction*. – 2020. - Oct 6;24, N 4. – P.436-441.
44. Franken, D.R. Can a cumulus cell complex be used to select spermatozoa for assisted reproduction? / D. R. Franken, H. S. Bastiaan // *Andrologia*. – 2009. – Vol.41, N 6. – P. 369-376.
45. Fuentes, A. Avita. Effect of Sperm Morphology in Intrauterine Insemination: Analysis of 115 Cycles and Literature Review/ A. Fuentes Ávila, R. Blasco Sanz, C. Cortés Alaguero // *Obstetrics Gynecology Survey*. – 2021. - Vol.76, N 3. –P.170-174.

46. Gadella, B.M. Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilization / B. M. Gadella // *Reproduction Fertility Dev.* – 2012. – Vol.25, N1. – P.26-37.
47. Hamze, JG. Sperm-Binding Assay Using an In Vitro 3D Model of the Mammalian Cumulus-Oocyte Complex / JG. Hamze, M, Jiménez-Movilla, R. Romar // *Current Protocol Toxicology.* – 2020. - Vol. 86, N 1. -e100.
48. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status / G. Huszar, C.C. Ozenci, S. Cayli [et al.]. // *Fertility Sterility.* – 2003. - Vol.79. – P.1616–1624.
49. Huang, Z. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome / Z. Huang, D. Wells // *Molecular Human Reproduction.* – 2010. – Vol.16, N 10. - P. 715- 725.
50. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis / CM. Cox, ME. Thoma, N. Tchangalova [et al.] // *Human Reproduction Open.* – 2022. - Nov 12, N 4: hoac051.
51. Influence of oocyte –secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes / M L Sutton, P D Cetica, M T Beconi [et al.] // *Reproduction.* – 2003. - N 126. – P. 27-34.
52. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional in vitro fertilisation (IVF) in couples with non-severe male infertility (NSMI-ICSI): protocol for a multicentre randomised controlled trial / D. Zheng, L. Zeng, R. Yang [et al.] // *BMJ Open.* – 2019. - Sep 30;9(9). - e030366.
53. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies / A. Jakab, D. Sakkas, E. Delpiano [et al.] // *Fertility Sterility.* – 2005. –Vol. 84. – P.1665–1672.

54. Kohn, TP. Role of Sperm Morphology in Deciding Between Various Assisted Reproduction Technologies / TP. Kohn, JR. Kohn, DJ. Lamb // *European Urology Focus*. – 2018. - Vol.4, N 3. – P.311-313.
55. Larriba, S. L. Using Small Non-Coding RNAs in Extracellular Vesicles of Semen as Biomarkers of Male Reproductive System Health: Opportunities and Challenges / S. Larriba, F. Vigués, L. Bassas // *International J Molecular Sci*. – 2023. - Mar 13;24, N 6. – P. 5447.
56. Male infertility / A. Agarwal, S. Baskaran, N. Parekh [et al.] // *Lancet*. – 2021. - Jan 23;397,N 10271. - P. 319-333.
57. Male infertility and its causes in human / T. Miyamoto, A. Tsujimura, Y. Miyagawa [et al.] // *Adv Urology*. – 2012. –P. 384520.
58. Mangoli, E.V The Beneficial Role of Intra Cytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection (IMSI) in Assisted Reproduction/ E. Mangoli, MA. Khalili // *J Reproduction Infertility*. – 2020. - Vol.21, N 1. – P.3-10.
59. Meiosis activating sterol (MAS) regulate FSH-induced meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes via PKC pathway / S. Jin, M. Zhang, L. Lei [et al.] // *Mol Cell Endocrinology*. – 2006. - Apr 25;249, N 1-2. – P. 64-70.
60. Meseguer, M. Better together than alone: the cumulus benefits // M. Meseguer, C. Hickman, A. Pellicer // *Fertility Sterility*. – 2018. - Vol. 109, N 5. – P. 786-787.
61. Metabolites involved in cellular communication among human cumulus-oocyte-complex and sperm during in vitro fertilization / M. J. Gómez-Torres, E. M. García, J. Guerrero [et al.] // *Reproduction Biology Endocrinology*. – 2015. – N 9. – P.13:123.

62. MicroRNAs expression in semen and testis of azoospermic men / A. Wainstein, S. Hassan, S. Barda [et al.] // *Andrology*. – 2023. - Vol. 11, N 4. – P. 687-697.
63. Molecular genetic mechanisms of teratozoospermia / Y. Chang, X. Jiang, W. Liu [et al.] // *Zygote*. -2023. - Vol.31, N 2. – P.101-110.
64. Mortimer, D. Sperm morphology assessment: historical perspectives and current opinions / D. Mortimer, R. Menkveld // *J Andrology*. – 2001. – N 22. –P. 192–205.
65. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*) / JP. Hanrahan, SM. Gregan, P. Mulsant [et al.] // *Biology Reproduction*. – 2004. – Vol. 70, N 4. – P.900-909.
66. New horizons in human sperm selection for assisted reproduction / B. Nixon, JE. Schjenken, ND. Burke [et al.] // *Front Endocrinology (Lausanne)*. – 2023. - Vol.22, N14. – P.1145533.
67. Nonsupplemented Luteal Phase Characteristics after the Administration of Recombinant Human Chorionic Gonadotropin, Recombinant Luteinizing Hormone, or Gonadotropin-Releasing Hormone (Gn RH) Agonist to Induce Final Oocyte Maturation in *in Vitro* Fertilization Patients after Ovarian Stimulation with Recombinant Follicle-Stimulating Hormone and GnRH Antagonist Cotreatment / G.M. Nicole Beckers, S. Nicholas Macklon, Marinus J. Eijkemans [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2003. – Vol. 88, Issue 9, 1 September. – P. 4186–4192.
68. Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes / Oseguera-Lopez, S. Ruiz-Diaz, P. Ramos-Ibeas [et al.] // *Front Cell Dev Biology*. – 2019. – Vol. 29, N 7. – P.298.

- 69."Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality / L. Parmegiani, G. E. Cognigni, S. Bernardi [et al.] //Fertility Sterility. – 2010. - Vol.93, N 2. – P. 598-604.
- 70.Primakoff, P. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction / P. Primakoff, D. G. Myles // Science. - 2002. - Jun 21;296, N 5576. – P.2183-2185.
- 71.Production of macrophage inflammatory protein-3alpha in human follicular fluid and cultured granulosa cells / Y. Kawano, J. Fukuda, K. Nasu [et al.] // Fertility Sterility. – 2004. - Vol.82 Suppl. 3. – P.1206-1211.
- 72.Receptors and the Motility of Schwann Cell(-Like) Phenotypes / S. Ouasti, A. Faroni, P.J. Kingham [et al.] // Cells. – 2020. - Jun 17;9, N 6. – P.1477.
- 73.Rijsdijk, M. Use of the capillary-cumulus oophorus model for evaluating the selection of spermatozoa / M. Rijsdijk, D. R. Franken // Fertility Sterility. – 2007. – Vol.88, N 6. – P. 1595-1602.
- 74.Robert, B. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality / B. Robert Gilchrist, Michelle Lane, G. Jeremy Thompson // Human Reproduction Update. – 2008. - PMID: 18175787 Review
- 75.Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion / RA. Dragovic, LJ. Ritter, SJ. Schulz [et l.] // Endocrinology. -2005. – Vol.146, N 6. – P. 2798-2806.
- 76.Roles of gonadotropins and meiosis-activating sterols in meiotic resumption of cultured follicle-enclosed mouse oocytes / H. Xie, G. Xia,

- AG. Byskov [et al.] // *Molecular Cell Endocrinology*. – 2004. - Apr 15;218, N 1-2. – P.155-163.
77. Simulating nature in sperm selection for assisted reproduction / ETY. Leung, CL. Lee, X. Tian [et al.] // *Nat Rev Urology*. – 2022. – Vol.19, N 1. – P.16-36.
78. Sperm DNA integrity and male infertility: a narrative review and guide for the reproductive physicians / A. Farkouh, G. Salvio, S. Kuroda [et al.] // *Transl Andrology Urology*. – 2022. – Vol.11, N 7. – P.1023-1044.
79. Sperm DNA Fragmentation: A Critical Assessment of Clinical Practice Guidelines / A. Agarwal, A. Farkouh, N. Parekh [et al.] // *World J Mens Health*. – 2022. – Vol.40, N 1. – P.30-37.
80. Sperm DNA Fragmentation and Sperm-Borne miRNAs: Molecular Biomarkers of Embryo Development? / AC. Conflitti, G. Cicolani, A. Buonacquisto [et al.] // *International J Molecular Sci*. – 2023. - Jan 5;24, N 2. – P.1007.
81. Sperm Morphology Assessment in the Era of Intracytoplasmic Sperm Injection: Reliable Results Require Focus on Standardization, Quality Control, and Training / A. Agarwal, R. Sharma, S. Gupta [et al.] // *World J Mens Health*. – 2022. - Vol.40, N 3. – P.347-360.
82. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida / E. Kim, M. Yamashita, M. Kimura [et al.] // *International J Dev Biology*. – 2008. – Vol.52, N 5-6. – P.677-682.
83. Sperm selection with hyaluronic acid improved live birth outcomes among older couples and was connected to sperm DNA quality, potentially affecting all treatment outcomes / R. West, A. Coomarasamy, L. Frew [et al.] // *Human Reproduction*. – 2022. - May 30;37, N 6. – P.1106-1125.

84. Szamatowicz, M. Assisted reproductive technology in reproductive medicine - possibilities and limitations / M. Szamatowicz // *Gynecology Pol.* – 2016. – Vol. 87, N 12. – P. 820-823.
85. Tantitham, C. The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on the In vitro Development of Immature to Mature Human Oocytes: A Randomized Controlled Study / C. Tantitham, S. Panunumpa, C. Satirapod // *The J Human Reproduction Science* – 2020. - Vol. 13, N 2.- P.133-137.
86. The IMSI procedure improves poor embryo development in the same infertile couples with poor semen quality: a comparative prospective randomized study/ K. Knez, B. Zorn, T. Tomazevic [et al.] // *Reproduction Biology Endocrinology.* – 2011. - Vol.29, N 9. – P.123.
87. The effect of sperm DNA fragmentation on ICSI outcomes depending on oocyte quality /B Braga DPAF, A. Setti, C. Morishima [et al.] // *Andrology.* -2023. - Apr 2
88. The Impact of a Very Short Abstinence Period on Conventional Sperm Parameters and Sperm DNA Fragmentation: A Systematic Review and Meta-Analysis / F. Barbagallo, R. Cannarella, A. Crafa [et al.] // *J Clinical Medicine.* – 2022. - Dec 8;11, N 24. – P.7303.
89. Which is the best intrauterine insemination timing choice following exogenous hCG administration during ovulation induction by using clomiphene citrate treatment? A retrospective study / O.H. Yumusak, S. Kahyaoglu, M. K. Pekcan [et al.] // *Springer Plus.* – 2016. - N 5. – P. 1307.
90. What Does Intracytoplasmic Sperm Injection Change in Embryonic Development? The Spermatozoon Contribution / S. Chamayou, F. Giacone, R. Cannarella [et al.] // *J Clinical Medicine.* – 2023. - Jan 14;12, N 2. – P. 671.

91. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010.
92. Zhuo, L. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation // L. Zhuo, K. Kimata // Cell Structure Funct. – 2001. - N26. – P.189–196.