

*На правах рукописи*

ЗОРИНА

Инна Михайловна

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ В  
ОПТИМИЗАЦИИ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ  
ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ СЕЛЕКТИВНОМ ПЕРЕНОСЕ ЭМБРИОНА

14.01.01- акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2019

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук  
кандидат химических наук

Смольникова Вероника Юрьевна  
Бобров Михаил Юрьевич

Официальные оппоненты:

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

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

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации [http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/ZorinaIM\\_diss.pdf](http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/ZorinaIM_diss.pdf)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Возникновение проблем с зачатием не теряет своей актуальности для супружеских пар репродуктивного возраста во всем мире, а у части из них единственной возможностью рождения ребенка становится лечение методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Успешность лечебных программ существенно зависит от состояния овариального резерва пациентки, ее возраста, фактора бесплодия, сопутствующих гинекологических и соматических заболеваний, своевременного обнаружения внутриматочной патологии, морфологического состояния эндометрия, определения «окна имплантации» (Корсак В.С., 2017, Краснопольская К.В., 2017, Гзгзян А.М., 2017, Доброхотова Ю.Э., 2017, Эбзеева М.В., 2009, Назаренко Т.А., 2016, Poli M., 2015, Беляева Н.А., 2014, Маслова М.А., 2015, Edgell T. A., 2013).

Непрерывное усовершенствование препаратов, персонализация лечебных протоколов, модификация методов культивирования полученных эмбрионов, внедрение особых методов оплодотворения позволяют увеличить процент успеха в терапии мужского и женского бесплодия. Однако, это не решает полностью проблем негативных исходов программ ВРТ, так как частота наступления беременности не превышает 50% даже при наличии УЗ-картины нормальных параметров прегравидарного эндометрия и эуплоидного хромосомного набора переносимого эмбриона (Зобова А.В., 2016).

Общепринятым методом выбора эмбриона для переноса является оценка качества на основании морфологических критериев, положенных в основу классификации Гарднера, оценивающая степень экспансии бластоцисты и параметры внутриклеточной массы и трофэктодермы (класс А, В и С по системе Gardner D.R., 1999) (Seli E., 2008). При этом эмбрионы получают субъективную оценку клинического эмбриолога на основании скорости развития и количества клеток, симметрии и степени фрагментации. Недостатками этого метода являются однократная визуализация перед переносом и отсутствие определения истинного потенциала развития каждого эмбриона, вероятности наступления и

прогрессирования беременности (Vergouw C.G., 2008, Nerenz R.D., 2016, Макарова Н.П., 2012). Об этом говорят материалы исследований и результаты проведенных лечебных программ: эмбрионы «отличного» и «хорошего» морфологического качества не всегда успешно имплантируются, а, кроме того, могут иметь анеуплоидный набор хромосом (Wong K., 2016).

Крупномасштабные мировые исследования сообщают, что 10% беременностей прерываются в связи с наличием хромосомной патологии эмбриона: отсутствие в диплоидном наборе хромосом или наличие дополнительных хромосом (Nagaoka S.I., 2012, Hassold T., 2001, Lintsen A.M., 2007, Franasiak J.M., 2014, Hodes-Wertz B., 2012). Проведение преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) вот уже более десяти лет позволяет выявить генетические аномалии эмбрионов до переноса их в полость матки, то есть до проведения пренатальной диагностики во время прогрессирующей беременности (Balaban B., 2011, Гзгзян А.М., 2018). Отмечается увеличение частоты имплантации и живорождения, снижение показателей невынашивания беременности в группе пациентов, которым проводились лечебные циклы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с ПГТ по сравнению со стандартным ЭКО (Gianaroli L., 1999, Munne S., 2003, Munne S., 2006).

Такой метод выбора эмбриона, несомненно, превосходит стандартную морфологическую оценку, но нельзя не отметить его ограничения. К ним относят потенциальное воздействие на эмбрион при проведении биопсии, вероятность мозаицизма при интерпретации результатов, возможность самокоррекции и селективного апоптоза эмбрионов ранних стадий развития, высокая стоимость исследования и невозможность диагностики на небольшом количестве материала. Кроме того, диагностика генома не исключает наличие сбалансированных хромосомных aberrаций, точечных мутаций, которые в известной мере влияют на имплантацию эмбриона и развитие врожденных пороков (Cimadomo D., 2016, Echten-Arends J., 2011, Northrop L.E., 2010, Cohen J., 2007, Los F. J., 2004, Staessen C., 2004).

### Степень разработанности темы

Хотя результаты первоначальных исследований являются многообещающими, а количество проводимых во всем мире программ ЭКО увеличивается, необходимо совершенствование современных подходов для обеспечения четкого понимания биологических процессов, лежащих в основе неудач имплантации эуплоидных эмбрионов (Gardner D. K., 2013, Juneau C., 2016, Краснопольская К.В., 2017), а также развитие актуальных неинвазивных методов оценки жизнеспособности эмбрионов человека в программах ЭКО (Katz-Jaffe M.G., 2006, Vergouw C.G., 2012, Hardarson T., 2012). Возможно, из-за недостаточной изученности молекулярной физиологии половых клеток, эмбрионов, эндометрия, выявлены не все принципиальные причины повторных неудач имплантации (Garrido N., 2008, Varghese A.C., 2007).

Неинвазивное изучение изменения углеводного состава и метаболизма аминокислот эмбрионов в отработанных средах культивирования может стать одним из альтернативных или дополнительных способов. Однако, в доступных публикациях имеются противоречивые данные, поскольку группы исследователей используют коммерческие среды культивирования разного состава, отличается и методология пробоподготовки и аналитических методов. Все это препятствует возможности использовать данные параметры как критерии пригодности эмбриона для селективного переноса в полость матки с последующим развитием беременности.

«Омиксные» технологии являются новыми дисциплинами, которые позволяют изучать функционирование клеточных структур от ДНК и генов до метаболитов. Благодаря применению этих методов в области вспомогательной репродукции описываются новые молекулярные биомаркеры, связанные с бесплодием, что позволяет расширять диагностические возможности, улучшая исходы программ ЭКО.

Уникальным объектом исследования являются среды культивирования эмбрионов различных стадий развития, так как они несут в себе информацию о метаболической активности, энергетическом обмене и состоянии сигнальных

систем эмбриона (Gardner D. K., 2011). В связи с вышеизложенным, представляется актуальным и перспективным поиск маркеров успешной имплантации эмбрионов человека с последующим развитием клинической беременности и рождением здорового ребенка.

#### Цель исследования:

Оптимизировать методы вспомогательных репродуктивных технологий, определив способность эмбриона к успешной имплантации при селективном переносе в полость матки, на основании изучения профиля метаболитов и потребления компонентов культуральных сред, а именно глюкозы и глутамата.

#### Задачи исследования:

1. Оценить клинико-анамнестические данные и выявить факторы прогнозирования морфологического качества эмбрионов и факторы риска получения анеуплоидных эмбрионов в программах ВРТ.

2. Оценить профиль метаболитов в средах культивирования эмбрионов 5 суток и определить ассоциацию исследуемых показателей с качеством и плоидностью эмбрионов.

3. Исследовать изменение содержания компонентов культуральных сред, а именно глюкозы и глутамата, эмбрионами 5 суток и определить ассоциацию исследуемых показателей с качеством и плоидностью эмбрионов.

4. Изучить влияние исследуемых показателей у эмбрионов 5 суток на способность к успешной имплантации в программе ВРТ.

5. Разработать комплексный алгоритм индивидуального ведения женщин в программах ВРТ с учетом полученных данных.

#### Научная новизна

В результате проведенного исследования представлены и научно обоснованы данные о способности эмбрионов к успешной имплантации на основании изучения изменения профиля метаболитов, а также потребления компонентов культуральных сред, а именно глюкозы и глутамата, эмбрионами 5 суток культивирования, что является новым дополнительным неинвазивным методом оценки качества эмбрионов для повышения эффективности программ ВРТ. На

основании полученных данных проведена комплексная научная оценка исходов программ ВРТ, а также выявлена прогностическая значимость изученных параметров.

#### Практическая значимость

Были получены данные о клинико–анамнестических факторах, предрасполагающих к получению анеуплоидных эмбрионов в программе ЭКО, позволяющих прогнозировать морфологическое качество эмбрионов в последующих лечебных циклах.

В ходе выполненного исследования были получены данные о целесообразности проведения дифференциальной оценки молекулярного состава сред культивирования с целью определения способности эмбрионов 5-х суток развития к успешной имплантации.

Представленные практические рекомендации и алгоритм оптимизации программ позволят клиницистам использовать дополнительный неинвазивный метод оценки для повышения эффективности программ ВРТ.

#### Методология и методы исследования

Проведено ретроспективное и проспективное обследование 96 супружеских пар, обратившихся для проведения программы ЭКО/ИКСИ с проведением ПГТ. В соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. все пациенты были предварительно полностью обследованы. На 5-е сутки культивирования проводилась морфологическая оценка всех эмбрионов и биопсия трофэктодермы бластоцист с целью проведения ПГТ методом сравнительной геномной гибридизации (aCGH), последующая криоконсервация. Для определения молекулярно-генетических предикторов качества развивающихся эмбрионов все образцы сред культивирования были условно разделены на группы в зависимости от их морфологического, генетического качества и исхода переносов эмбрионов в полость матки.

#### Положения, выносимые на защиту

1. Прогностическими факторами морфологического качества получаемых в программах ЭКО эмбрионов являются: данные о прерывании беременности в

анамнезе, фактор бесплодия, ИМТ на момент проведения стимуляции суперовуляции, способ оплодотворения и метод селекции сперматозоидов, а также плоидность эмбрионов, полученных в предыдущей попытке ВРТ с ПГТ.

2. Предикторами возникновения анеуплоидий у эмбрионов, полученных в результате программы ВРТ с ПГТ у исследуемых женщин, явились возраст старше 34 лет, вторичное бесплодие, верифицированный наружный генитальный эндометриоз I-II степени.

3. Анализ состава сред культивирования эмбрионов методом метаболомного профилирования может способствовать более точному отбору эмбриона для переноса. При оценке способности к имплантации наибольшую предиктивную значимость имели изменения содержания L-фенилаланина, L-валина, L-пролина, аланил-глутамина, фенилпирувата и  $\beta$ -L-фукоза-1-фосфата в средах культивирования имплантировавшихся эмбрионов.

4. Потребление глюкозы не является предиктивным критерием для выявления анеуплоидий и половой принадлежности. Тем не менее, изменение содержания глюкозы позволяет выявить эмбрион с высоким потенциалом к имплантации, поскольку ее потребление у группы имплантировавшихся эмбрионов в 3,4 раза выше по сравнению с группой неимплантировавшихся эмбрионов.

#### Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовал в выборе темы научного исследования, разработке цели и задач исследования, сборе материала, проведении и интерпретации результатов флуоресцентной спектроскопии и масс-спектрометрического профилирования сред культивирования, анализе, обобщении и статистической обработке полученных данных. Автор лично принимал участие в ведении пациенток на всех этапах лечения бесплодия в программе ЭКО и ПЭ.

#### Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01-«акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования

соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

#### Апробация материалов диссертации

Основные положения диссертации и результаты работы представлены и доложены на Ежегодной международной конференции «Клиническая протеомика. Постгеномная медицины» (Москва, 2017) и XXV Конгрессе «Контroversии в акушерстве, гинекологии и репродукции» (Вена, Австрия, 2017).

Работа обсуждена на межклинической конференции отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия (15.11.2018г.) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России (17.12.2018 г., протокол № 15).

#### Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Леонова Б.В. ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, 3 из которых входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК.

#### Структура и объем диссертации

Диссертация изложена в традиционной форме на 131 странице. Состоит из оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 32 рисунками. Библиографический указатель включает 184 литературных источника, из них 15 русскоязычных и 169 иностранных работ.

### СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

#### Материал и методы исследования

Проведено ретроспективное и проспективное обследование 96 супружеских пар, обратившихся для проведения программы ЭКО/ИКСИ с проведением ПГТ. В соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. все пациенты

были предварительно полностью обследованы. На 5-е сутки культивирования проводилась морфологическая оценка всех эмбрионов и биопсия трофэктодермы бластоцист с целью проведения ПГТ методом сравнительной геномной гибридизации (aCGH), последующая криоконсервация. Для определения молекулярно-генетических предикторов качества развивающихся эмбрионов все образцы сред культивирования были условно разделены на группы в зависимости от их морфологического, генетического качества и исхода переносов эмбрионов в полость матки.

Критерии включения пациенток в исследование:

- проведение программы ВРТ с ПГТ у пар, обратившихся для лечения бесплодия;
- возраст от 18 до 45 лет включительно;
- соответствие параметрам нормального овариального резерва (на 2-3 день менструального цикла уровень ФСГ  $\leq 10$  МЕ/л; уровень АМГ не менее 1 нг/мл; не менее 5 антральных фолликулов в каждом яичнике по данным УЗ-исследования органов малого таза);
- нормальное анатомическое строение матки;
- результат кариотипирования обоих супругов (46,XX; 46,XY);
- подписанное информированное согласие на включение в исследование.

Критерии невключения в исследование:

- Патологические состояния репродуктивной системы:
  - » приобретенные деформации полости матки и врожденные пороки развития, исключающие возможность имплантации эмбрионов и вынашивания беременности;
  - » эндометриоз III-IV степени распространения, миома матки больших размеров, опухоли яичников, СПКЯ, снижение овариального резерва, проведение оперативных вмешательств на яичниках и др;

Наличие других заболеваний, являющихся противопоказаниями для вынашивания беременности и родов:

- » соматические заболевания: патологии щитовидной железы, сахарный диабет 1 и 2 типов, а также острые воспалительные заболевания и обострение хронических заболеваний любой локализации;
- » психические расстройства;
- » злокачественные новообразования любой локализации, в том числе в анамнезе;
- Тяжелые формы патозооспермии.

Критерии исключения пациенток из исследования:

- при проведении стимуляции суперовуляции рост фолликулов отсутствует;
- при проведении трансвагинальной пункции ооциты не получены.

Проведение стимуляции функции яичников у всех пациенток начиналось со 2-5 дня менструального цикла по протоколу с использованием препаратов гонадотропинов и антагонистов гонадотропин-релизинг гормона (ант-ГнРГ) с последующим проведением преимплантационного генетического скрининга методом сравнительной геномной гибридизации.

В зависимости от возраста пациентки, параметров овариального резерва и гормонального статуса индивидуально подбирался объем стартовой дозы гонадотропинов. При ультразвуковой оценке в динамике для коррекции дозы вводимых гонадотропинов фиксировался рост фолликулов. Ежедневное подкожное введение препарата ант-ГнРг в дозе 0,25 мг/сут для предотвращения преждевременной лютеинизации фолликулов начиналось при достижении лидирующим фолликулом размеров 13-14 мм в диаметре. С целью финального дозревания ооцитов в качестве триггера овуляции вводился препарат хорионического гонадотропина человека в стандартной дозе 10 000 ЕД однократно внутримышечно за 35 часов до планируемой ТВП при достижении фолликулами размеров 18-20 мм в диаметре. Через 35 часов после введения овуляторной дозы ХГ под внутривенным обезболиванием и ультразвуковым контролем с использованием одноразовых игл (Vitrolife Inc, США) осуществлялась трансвагинальная пункция яичников и забор ооцитов. Аспирация фолликулярной жидкости производилась под отрицательным давлением 190 мм

водного столба в заранее подогретые стерильные пробирки, содержащие 0,5 мл гепарина, которые немедленно передавались эмбриологу для последующей идентификации ооцит-кумулюсного комплекса и оценки степени зрелости полученных ооцитов.

Метод оплодотворения ИКСИ применялся для оплодотворения полученных ооцитов с целью исключения влияния сторонней ДНК. На начальном этапе осуществлялась предварительная инкубация. Далее в течение 20 секунд производилось очищение ооцитов при помощи раствора гиалуронидазы от кумулюсных клеток-денудирование ооцитов. После отмывания в буферной среде NEPES, ооцит-кумулюсные комплексы вновь переносились в лунки для преинкубации. В завершении, через 30 минут, механическим путем осуществлялось удаление оставшихся клеток кумулюса. Через 14-16 часов после осуществления оплодотворения проводилась его оценка. В случае наличия двух пронуклеусов в цитоплазме, оплодотворение признавалось нормальным. Если же в цитоплазме визуализировался один пронуклеус, более двух или же пронуклеусы отсутствовали, оплодотворение расценивали как аномальное.

На 5-е сутки культивирования после морфологической оценки эмбрионов (по параметрам трофэктодермы, внеклеточной массы и степени экспансии) проводилась биопсия клеточного материала (клеток трофэктодермы). После подготовки биопсированных клеток к генетической диагностике материал отправляли в лабораторию молекулярно-генетических методов исследования для анализа хромосомных нарушений методом сравнительной геномной гибридизации. После проведения биопсии все эмбрионы витрифицировались. Для определения молекулярно-генетических предикторов качества развивающихся эмбрионов образцы сред культивирования на основании общепринятых критериев оценки по классификации Гарднера в данной работе были условно разделены на группы в зависимости от их морфологического качества (таблица 1). В связи с проведением преимплантационного генетического скрининга в лечебном цикле перенос эмбрионов в полость матки не осуществлялся, поскольку после

проведения биопсии на 5-е сутки культивирования эмбрионы витрифицировались.

Таблица 1 – Условное разделение эмбрионов по морфологическим группам

	1	2	3	4	5	6
<b>AA</b>			1 класс «отличного» качества			
<b>AB</b>						
<b>AC</b>						
<b>BA</b>						
<b>BB</b>						
<b>BC</b>	3 класс «удовлетворительного» качества					
<b>CA</b>						
<b>CB</b>						
<b>CC</b>						
<b>a</b>	4 класс «плохого» качества					
<b>b</b>						
<b>c</b>						

Через 2-3 менструальных цикла по результатам ПГТ производился перенос криоконсервированных/размороженных эуплоидных эмбрионов: назначалась циклическая гормональная терапия (с 4-5 дня менструального цикла эстрадиола валерат в дозе 6 мг/сутки, с 15-16 дня менструального цикла микронизированный прогестерон 400-600 мг/сутки) и осуществлялся УЗ-контроль динамики роста эндометрия на 9-10 день менструального цикла, на 15-16 день цикла для назначения гестагенов.

Перенос эмбрионов в полость матки осуществлялся на 20-21 день менструального цикла с помощью мягкого катетера Wallace (Германия) или Cook (Австралия). Предварительное размораживание эмбрионов и ведение

посттрансферного периода осуществлялось согласно принятым в клинической практике протоколам.

Обработка данных выполнена на персональном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «SPSS Statistics 17.0», «Statistica for Windows» v. 7.0.

#### Результаты собственных исследований и их обсуждение

Все пациентки, включенные в исследование, были сопоставимы по параметрам и критериям для минимизации влияния вмешивающихся факторов на результат программ ВРТ.

Антропометрические характеристики пациенток соответствовали среднестатистическим нормам. Данные о характере менструальной функции по средним характеристикам соответствовали общепопуляционным параметрам менструального цикла женщин репродуктивного возраста.

Медиана возраста пациенток составила 35,50 (30-40,75) лет. Было обнаружено снижение количества полученных и оплодотворившихся ооцитов с увеличением возраста пациенток ( $p < 0,005$ ), отрицательная корреляция возраста пациенток и количества эмбрионов с нормальным оплодотворением ( $p < 0,005$ ).

При оценке параметров гормонального профиля на основании коэффициента Спирмена выявлена значимая положительная корреляция уровней гормонов ФСГ ( $p = 0,007$ ), пролактина ( $p = 0,021$ ), эстрадиола ( $p < 0,005$ ) и значимая отрицательная корреляция уровней АМГ ( $p < 0,005$ ), тестостерона ( $p = 0,042$ ) и прогестерона ( $p = 0,028$ ) с возрастом пациенток, включенных в исследование. Это соответствует известным данным об особенностях синтеза и содержания гормонов в крови женщин в рамках увеличения возраста.

Данные о типе бесплодия у женщин демонстрируют преобладание случаев вторичного бесплодия (64,6%) по сравнению с первичным (35,4%). Мужской фактор составил 48%, трубно-перитонеальный фактор 23%, отсутствие овуляции 13% случаев, сочетанный фактор и бесплодие неясного генеза в 8% случаев бесплодия, что соответствовало заявленным критериям включения в исследование.

Для выявления факторов прогноза морфологического качества полученных в программах ВРТ эмбрионов был применен метод логистической регрессии, где бинарной зависимой переменной было морфологическое качество эмбрионов-отличное и хорошее. Многофакторный анализ позволил определить влияние независимых факторов на зависимую переменную. Пошаговое включение и исключение переменных позволило определить лишь влияющие на исход предикторы.

В результате данного статистического анализа выяснилось, что такие факторы, как: данные о неразвивающихся беременностях в анамнезе, ИМТ, фактор бесплодия, оплодотворение методом ИКСИ, применение метода селекции сперматозоидов ПИКСИ, кариотип эмбрионов, полученных в предыдущих попытках ВРТ с ПГТ, позволили прогнозировать морфологическое качество эмбрионов в данной выборке пациентов. Для изучения вероятности с учетом каждого из выявленных факторов риска, дальнейший анализ логистической регрессии был проведен по следующей формуле:

$$P = \left( \frac{1}{1 + e^{-Z}} \right) * 100 \% ,$$

где P-вероятность получения эмбрионов отличного или хорошего морфологического качества; e-основание натурального логарифма;  $e = 2,72$ ; z-уравнение линейной регрессии, вида  $z = w_0 + w_1x_1 + w_2x_2 + \dots + w_nx_n$ , рассчитанное ниже.

Для вычисления вероятности и подсчета уравнения z факторы были представлены как математические значения: z = Неразвивающаяся беременность в анамнезе (0-нет; 1-да)\*0,453-ИМТ (0-16-18,5; 1-18,5-24,99; 2-25-30; 3-30-35)\*0,567+Тип оплодотворения (1-метод ИКСИ; 2-селекция ПИКСИ)\*1,141+Кариотип эмбрионов (0-эуплоидный; 1-анеуплоидный)\*0,771-Фактор бесплодия (0-отсутствие овуляции; 1-трубно-перитонеальный; 2-мужской, 3-сочетанный, 4-неясного генеза)\*0,409-0,792.С целью подтверждения

диагностической чувствительности и специфичности был произведен ROC – анализ. Площадь под кривой (показатель AUC) составила 0,69 (ДИ:0,62-0,75,  $p=0,002$ ), чувствительность и специфичность метода составили 80% и 46% соответственно (рисунок 1). Данная математическая формула применима в отношении пациенток, планирующих проведение программы ВРТ, имеющих в анамнезе программы ВРТ с ПГТ.

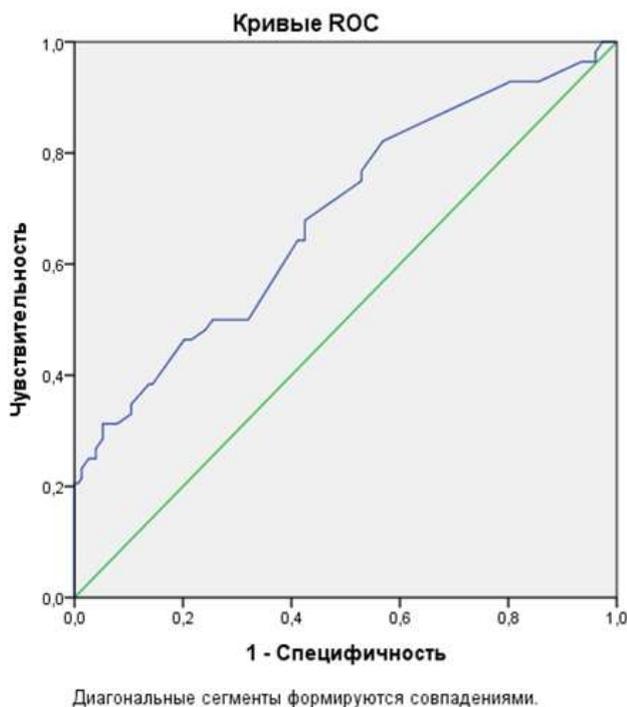


Рисунок 1. ROC – анализ полученной математической модели

На следующем этапе производилась биопсия трофэктодермы бластоцист с целью проведения преимплантационного генетического тестирования. В группе эмбрионов отличного морфологического качества наблюдалось меньшее количество случаев анеуплоидий по результатам ПГТ по сравнению с эмбрионами хорошего морфологического качества ( $\chi^2$ ,  $p=0,004$ ) (рисунок 2).

Из возрастной группы пациенток до 34 лет эуплоидный кариотип имели 61% эмбрионов. Из группы 35–39 лет эуплоидный кариотип имели 47% эмбрионов. У пациенток старше 40 лет эуплоидный кариотип имели 40% эмбрионов. Эти показатели демонстрируют прямую зависимость плоидности полученных эмбрионов от возраста женщины ( $\chi^2$ ,  $p=0,008$ ) (рисунок 3).

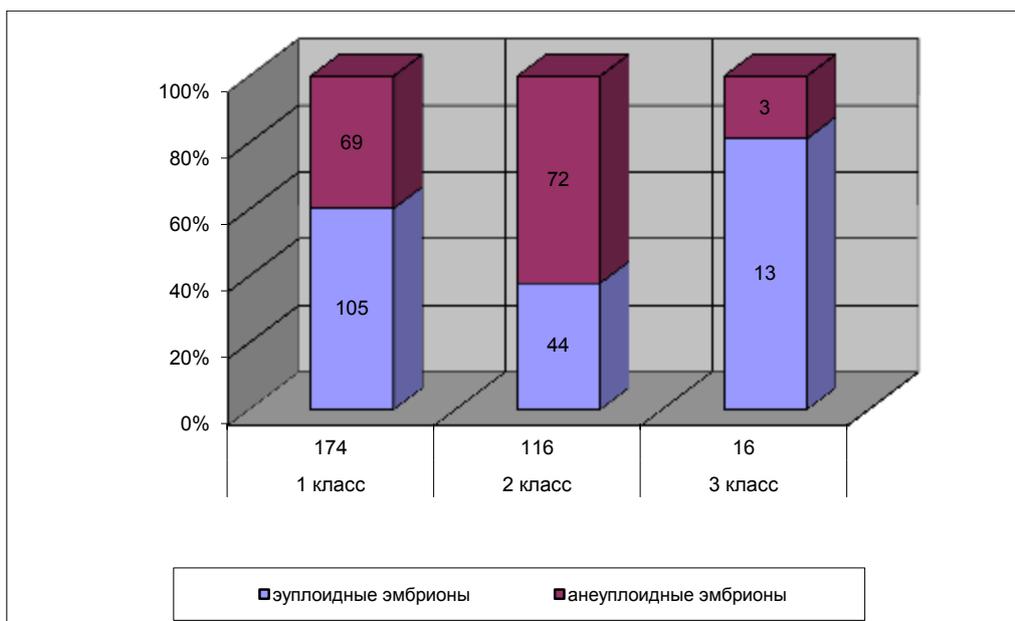


Рисунок 2. Ассоциация морфологического класса эмбрионов 5-х суток культивирования с наличием хромосомных аномалий в эмбрионе по результатам ПГТ

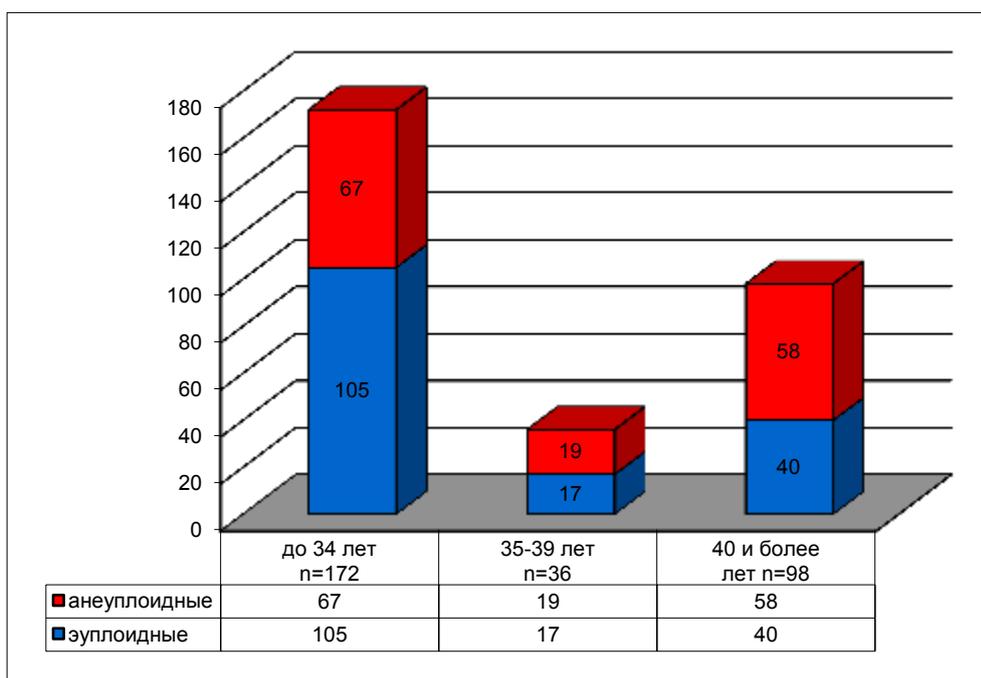


Рисунок 3. Структура плоидности эмбрионов, полученных у пациенток разных возрастных групп, включенных в исследование

Кроме того, была выявлена взаимосвязь между неправильным генетическим набором эмбрионов и наличием наружного генитального эндометриоза у

пациентки ( $\chi^2$ ,  $p=0,006$ ) (рисунок 4), а также типом бесплодия ( $\chi^2$ ,  $p=0,038$ ) (рисунок 5).

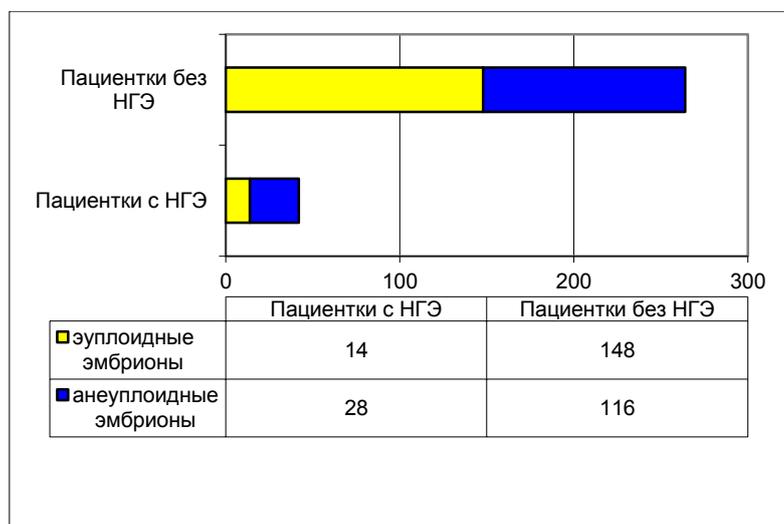


Рисунок 4. Структура плоидности эмбрионов, полученных у пациенток с наличием и отсутствием наружного генитального эндометриоза

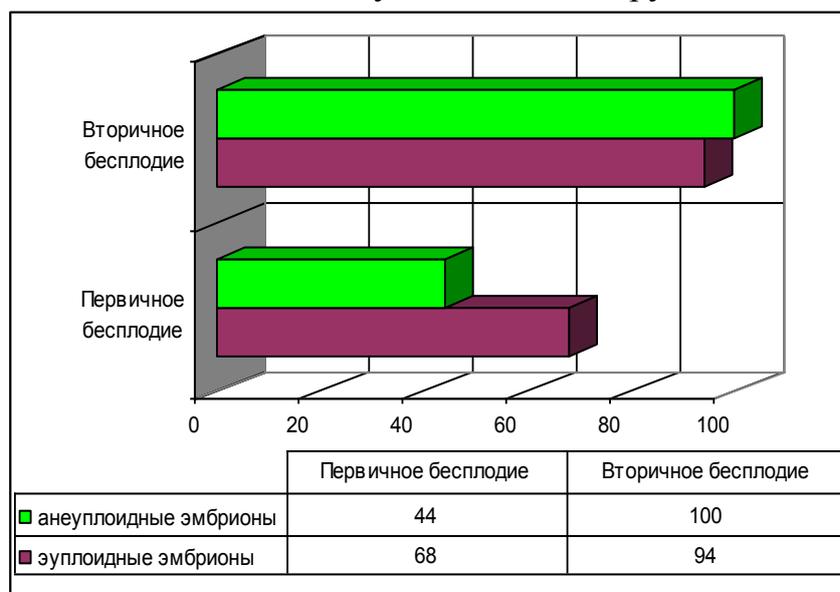


Рисунок 5. Структура плоидности эмбрионов, полученных у пациенток с первичным и вторичным бесплодием

Принимая во внимание в данной работе изучение изменения состава исследуемых веществ, на основании морфологических и генетических критериев были проведены межгрупповые и внутригрупповые сравнения профилей метаболитов отработанных сред культивирования.

По данным морфологического исследования эмбрионы были разделены на четыре класса в соответствии с морфологической оценкой на 5-е сутки культивирования.

Проведенный анализ главных компонент (principal components analysis, PCA) выявил отличия в профилях метаболитов обработанных сред культивирования исследуемых классов. Примечательно, что отличия наблюдались у всех классов по сравнению с контрольной группой сред, в которых культивирование эмбрионов не производилось в отличие от сред эмбрионов, остановившихся в развитии на ранних этапах. На рисунке 5 приведены характерные диаграммы межгруппового сравнения.

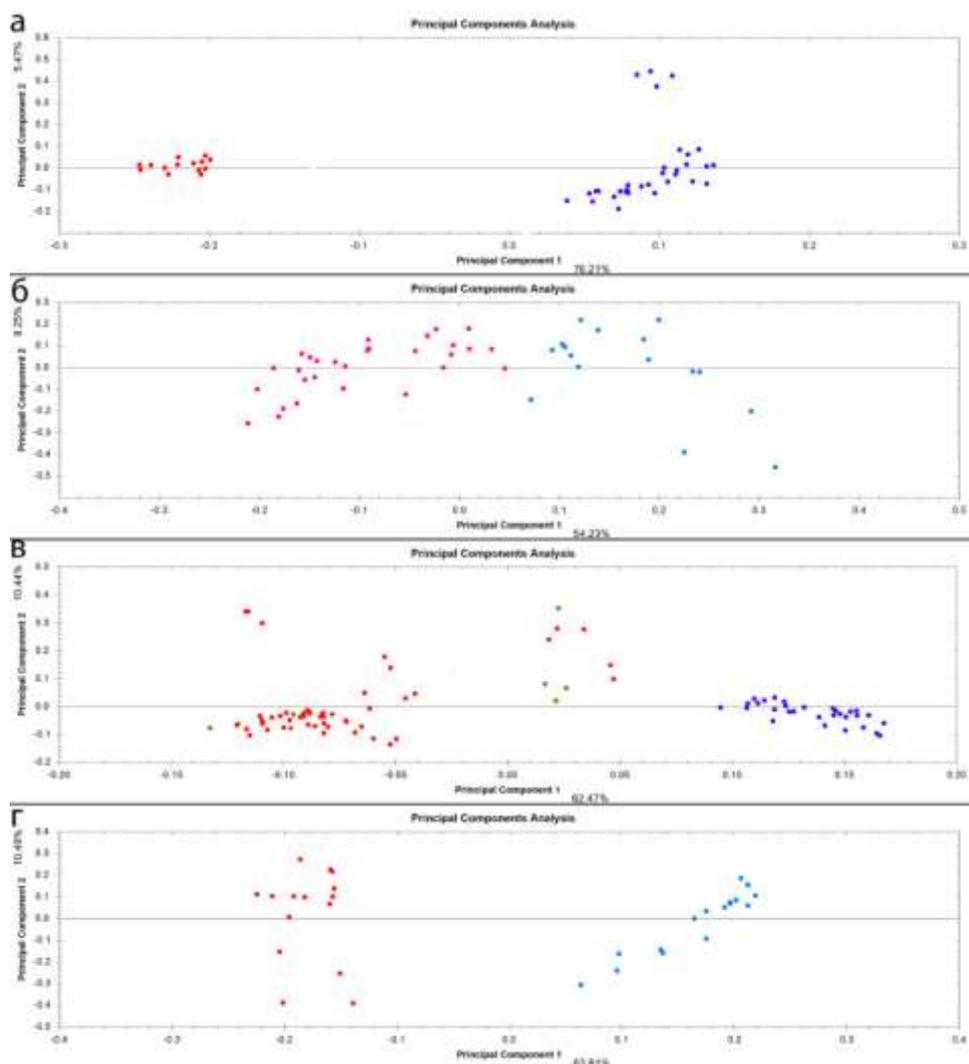


Рисунок 5. PCA-анализ. Межгрупповое сравнение профилей метаболитов эмбрионов разных морфологических классов: а - для 1 и 2 класс эмбрионов; б - для 1 и 3 класса эмбрионов; в-для 1 и 4 класса эмбрионов, а также контрольных сред без культивирования эмбрионов (р); г - для 2 и 3 класса эмбрионов

Также проводилось внутригрупповое сравнение эмбрионов одного класса, имеющих отличия в морфологических параметрах, которое не выявило достоверных отличий (рисунок 6). Полученные данные свидетельствуют о том, что специфические профили метаболитов характерны именно для каждого морфологического класса.

Внутригрупповой сравнительный анализ профилей сред культивирования эмбрионов с нормальным и аномальным генетическим набором не выявил значимых отличий в исследуемых группах (рисунок 7).

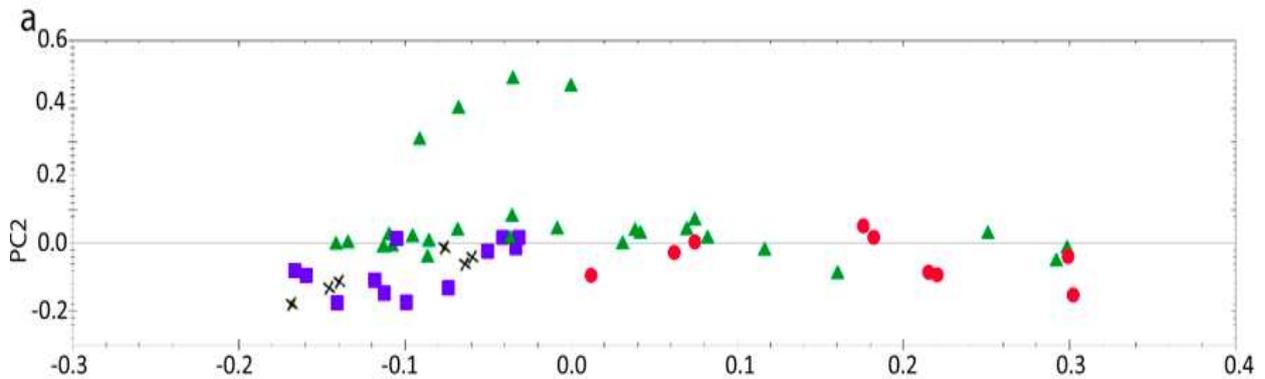


Рисунок 6. PCA-анализ. Внутригрупповое сравнение профилей метаболитов эмбрионов 1-го класса: ● - 6AA, ■ - 4AA, x - 4AB, ▲ - 3AA

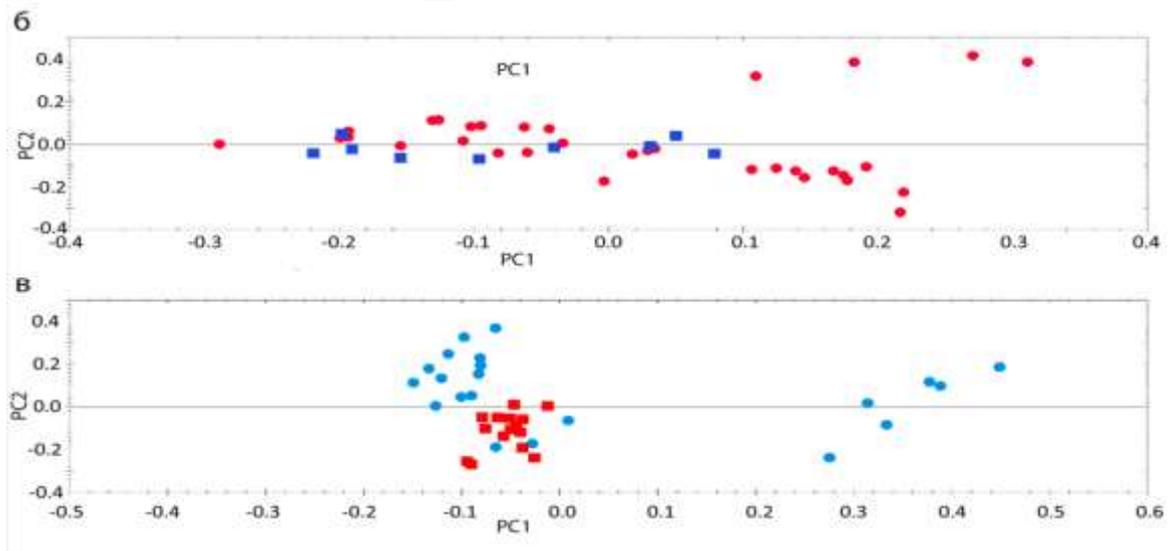


Рисунок 7. PCA-анализ. Сравнение профилей сред культивирования эмбрионов 1-го морфологического класса (б) (● - эуплоидные эмбрионы, ■ - анеуплоидные эмбрионы) и 2-го морфологического класса (в) (● - эуплоидные эмбрионы, ● - анеуплоидные эмбрионы)

На следующем этапе был проведен анализ корреляции уровней метаболитов в отработанных средах культивирования у включенных в исследование пациенток с результатами программы ЭКО (ИКСИ) с ПГТ. Проведенный PCA – анализ позволил обнаружить достоверные отличия между группами с различными исходами после селективного переноса эуплоидного эмбриона в полость матки (рисунок 8).

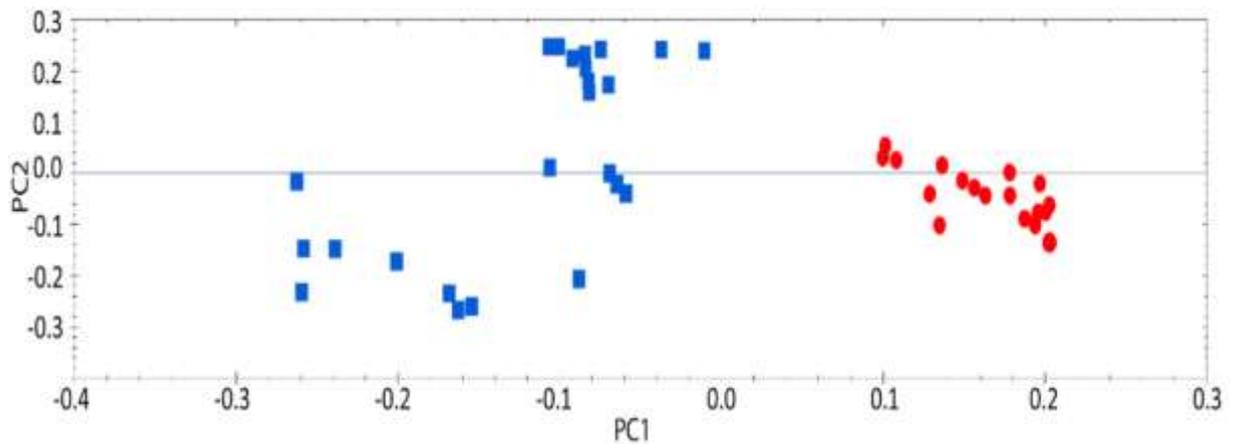


Рисунок 8. PCA-анализ. Оценка имплантационного потенциала по профилям метаболитов в культуральных средах эмбрионов: ■ - имплантация, ● - отсутствие имплантации

Дальнейшая обработка данных позволила обнаружить достоверные отличия между группами с различными исходами после переноса.

При качественном сравнительном анализе параметров полученных пиков масс в средах культивирования имплантировавшихся эмбрионов концентрация L-Валина (118,0864 Да), L-Пролина (138,0526 Да), аланин-глутамин (218,1144 Да), фенилпировата (165,0545 Да) и  $\beta$ -L-фукоза-1- фосфат (267,0257 Да) стала меньше, а концентрация L-фенилаланина (166,0866 Да) стала больше по сравнению со средами культивирования неимплантировавшихся эмбрионов.

Результат свидетельствует о важной роли изменений метаболизма эмбрионов на стадии культивирования для последующей имплантации. В таблице 2 представлены вещества с наибольшей предиктивной значимостью и их изменения в средах культивирования.

Таблица 2 - Изменения концентрации исследуемых веществ в средах культивирования имплантировавшихся эмбрионов по сравнению с неимплантировавшимися

Молекулярная масса, Да	Предполагаемая молекула	Изменения концентрации
118.0864	L-валин	меньше в 18 раз
138.0526	L-пролин	меньше в 4100 раз
218.1144	аланин-глутамин	меньше в 19 раз
166.0866	L-фенилаланин	больше в 287 раз
165.0545	фенилпируват	меньше в 697 раз
267.0257	$\beta$ -L-фукоза-1-фосфат	меньше в 3069 раз

Принимая во внимание в данной работе изучение изменения состава исследуемых веществ, на основании морфологических и генетических критериев были проведены межгрупповые и внутригрупповые сравнения потребления глюкозы.

В ходе проведенного исследования было выявлено, что уровень потребления глюкозы у эмбрионов 1-го класса в 1,75 раза больше по сравнению со 2-м классом, и в 2 раза больше по сравнению с 3-м классом. Отличий по данному параметру между 2-м и 3-м классом не наблюдалось (критерии Манна-Уитни с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$ ) (рисунок 9).

Достоверных отличий потребления глутамата в исследуемых и контрольной группах зафиксировано не было, что может быть связано с его относительно низкой концентрацией (46 мкМ) в питательной среде и недостаточной чувствительностью используемого метода регистрации (рисунок 10).

Внутригрупповой анализ в потреблении глюкозы не выявил достоверных отличий между эуплоидными и ануэплоидными эмбрионами (рисунок 11), а также эмбрионами разного пола (рисунок 12).

Анализ изменений потребления глутамата эмбрионами разного генетического качества достоверных отличий не продемонстрировал (рисунок 13).

В ходе проведенного исследования было установлено, что применение предложенных методических подходов позволяет регистрировать различное потребление глюкозы эмбрионами 5-х суток культивирования.

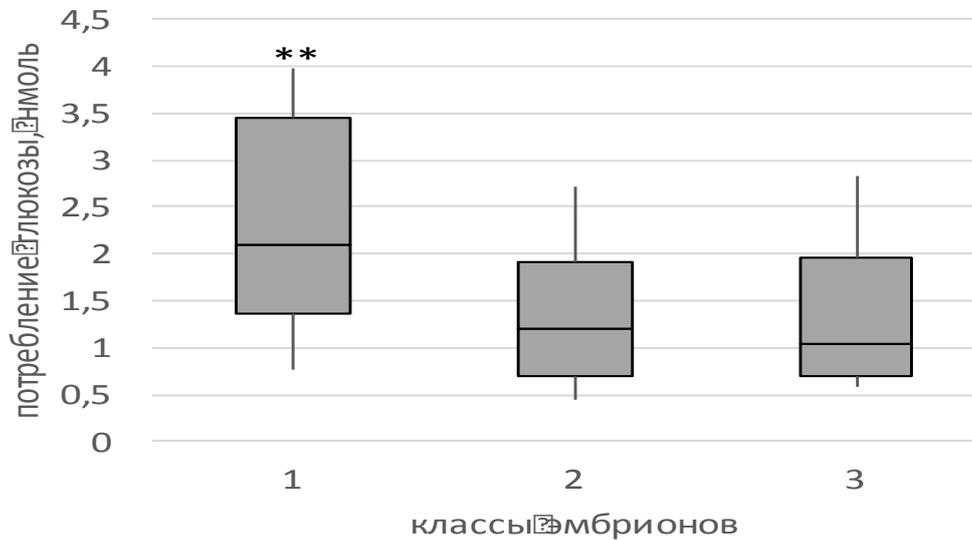


Рисунок 9. Межгрупповое сравнение потребления глюкозы эмбрионами 5-го дня культивирования. Линия в середине «ящика» представляет собой медиану (50-й перцентиль), границами ящика служат первый и третий квартили (25-й и 75-й перцентили). Концы «усов» соответствуют минимальному и максимальному значениям. Крайние точки (выбросы) – данные, выходящие за границы усов. \*\* –  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

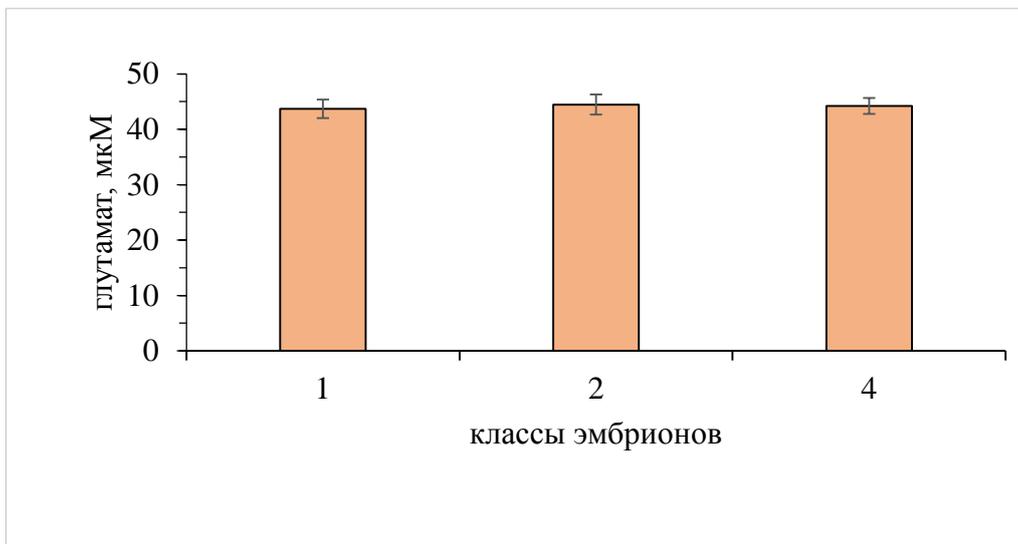


Рисунок 10. Потребление глутамата из отработанных сред культивирования эмбрионами различных морфологических классов (критерии Манна-Уитни,  $p < 0,05$ )

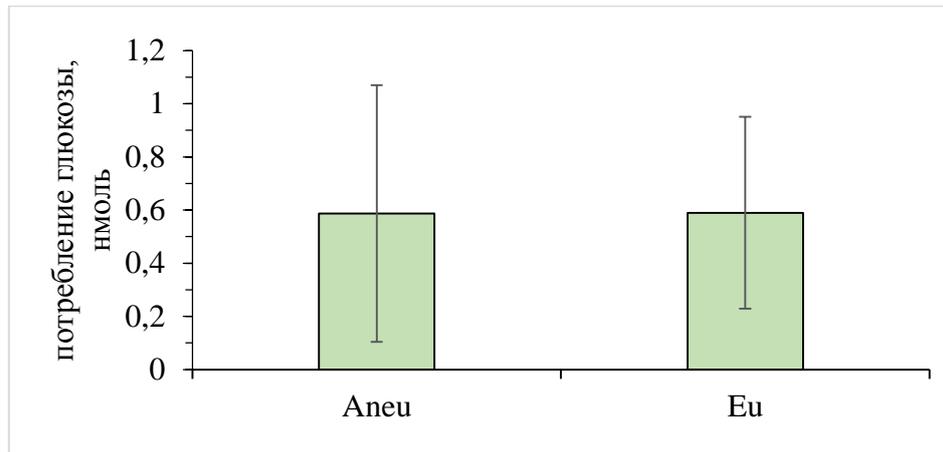


Рисунок 11. Потребление глюкозы эуплоидными и анеуплоидными эмбрионами (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ )

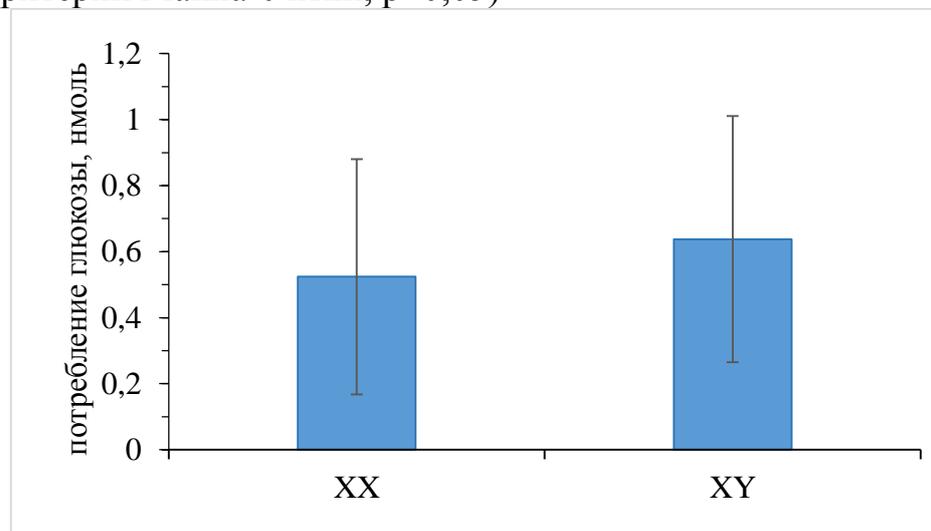


Рисунок 12. Потребление глюкозы эмбрионами разного пола (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ )

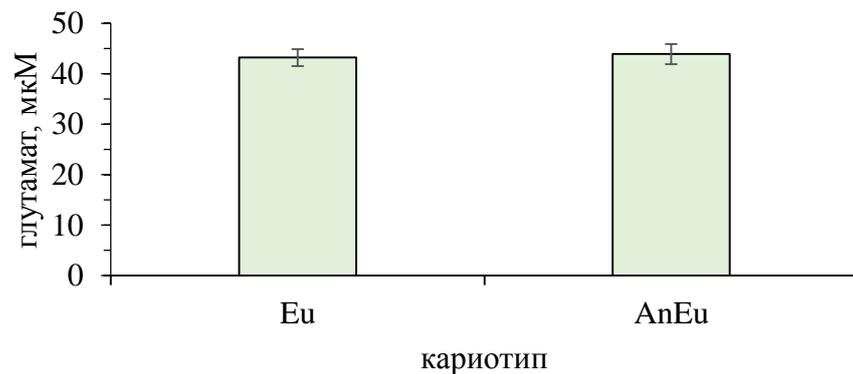


Рисунок 13. Потребление глутамата из отработанных сред культивирования эуплоидными и анеуплоидными эмбрионами (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ )

На следующем этапе был проведен анализ корреляции уровней потребления глюкозы у включенных в исследование пациенток с результатами программы ЭКО (ИКСИ) с ПГТ. Средние показатели потребления глюкозы из отработанных сред культивирования для имплантировавшихся эмбрионов составили 2,5 (2,0–3,4) нмоль, для неимплантировавшихся эмбрионов 0,75 (0–1,6) нмоль. Имплантировавшиеся эуплоидные эмбрионы потребляли в 3,4 раза больше по сравнению с эуплоидными неимплантировавшимися эмбрионами (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ) (рисунок 14).

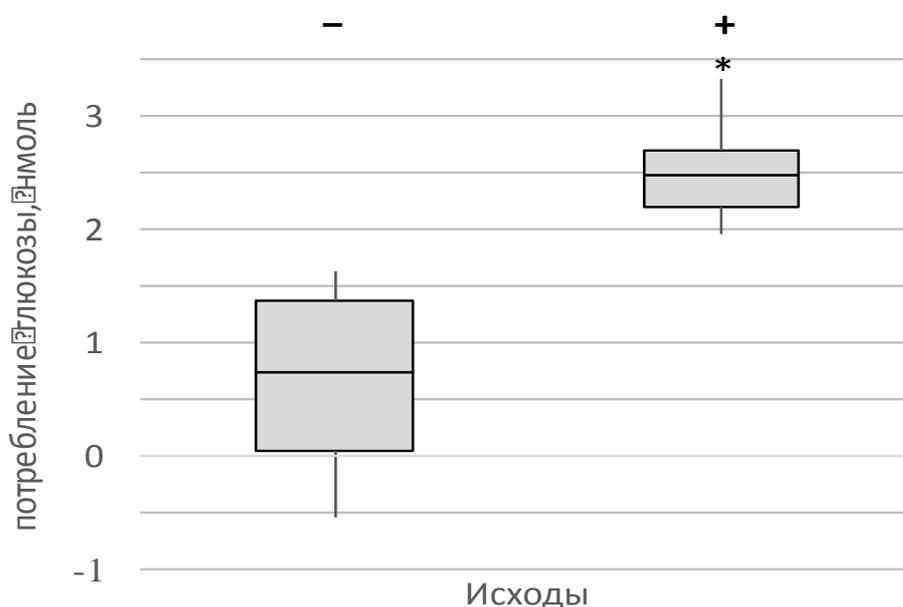


Рисунок 14. Потребление глюкозы имплантировавшихся (+) и неимплантировавшихся (-) эуплоидных эмбрионов 5-х суток развития. Линия в середине «ящика» представляет собой медиану (50-й перцентиль), границами ящика служат первый и третий квартили (25-й и 75-й перцентили). Концы «усов» соответствуют минимальному и максимальному значениям. Крайние точки (выбросы) – данные, выходящие за границы усов. \*– $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни).

Таким образом, при оценке содержания глюкозы в отработанных средах культивирования и вероятности имплантации было показано, что критерием удачной имплантации может служить повышенный уровень потребления глюкозы эмбрионами из питательной среды.

Итак, с целью оптимизации проведения программ ВРТ с ПГТ, криоконсервации и селекции полученных в программе ЭКО эмбрионов рекомендован неинвазивный анализ отработанных сред культивирования эмбрионов 5-х суток развития.

В настоящей работе было продемонстрировано, что применение флуоресцентной фотометрии и ВЭЖХ-МС для анализа питательных сред пятидневных эмбрионов может быть использовано для оценки их имплантационного потенциала и способствовать более точному отбору для селективного переноса эмбриона.

На основании полученных результатов разработан алгоритм оптимизации программ ВРТ при селективном переносе эмбрионов в зависимости от наличия исследуемых молекулярно-генетических предикторов (рисунок 15).

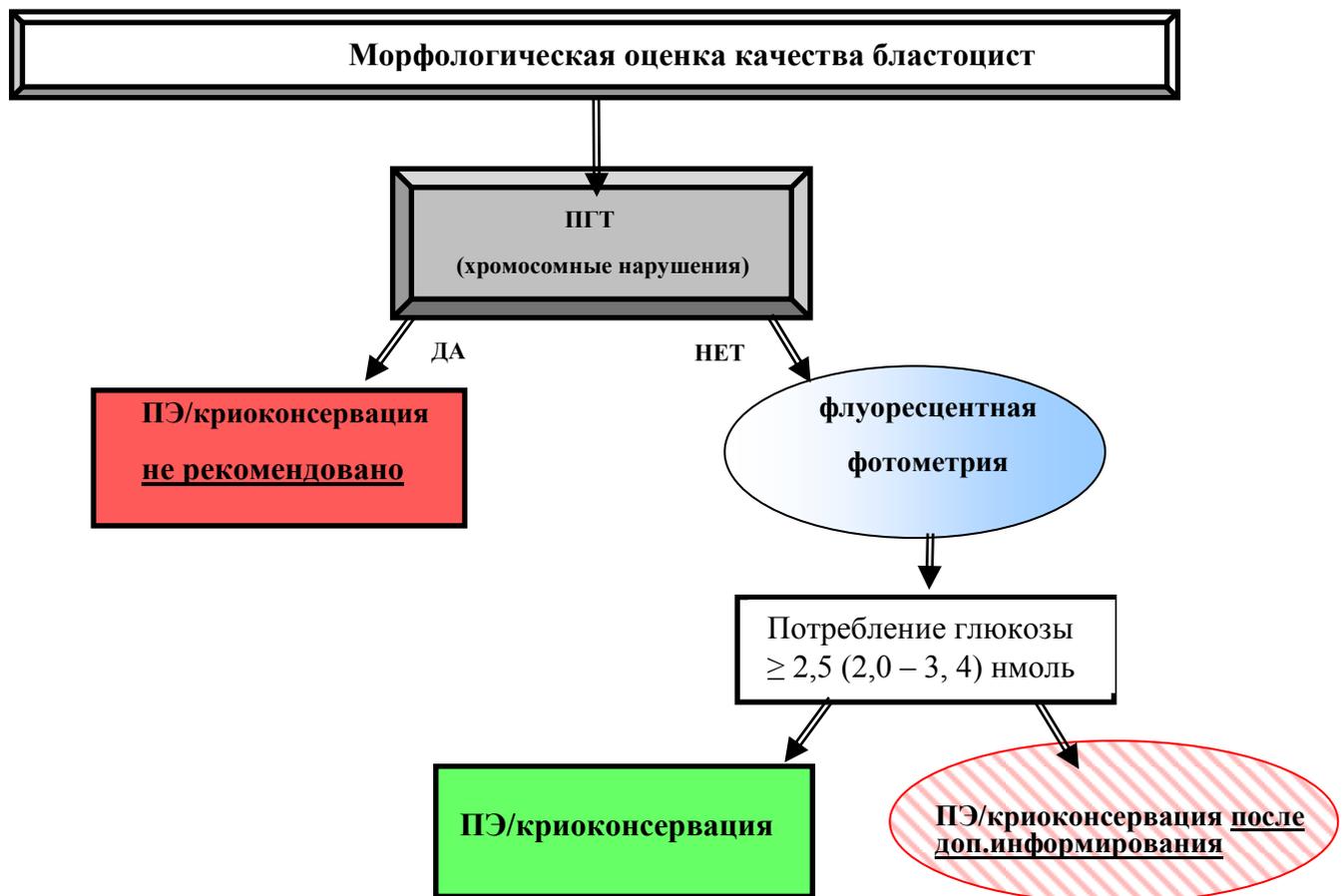


Рисунок 15. Алгоритм оптимизации программ ВРТ при селективном переносе эмбрионов с учетом молекулярно-генетических предикторов

## ВЫВОДЫ

1. Клинико–анамнестическими факторами, прогнозирующими морфологическое качество эмбрионов, являются: данные о прерывании беременности в анамнезе, фактор бесплодия, ИМТ на момент проведения стимуляции суперовуляции, оплодотворение методом ИКСИ и селекция сперматозоидов ПИКСИ, плоидность эмбрионов в предыдущих попытках ВРТ с ПГТ.

2. Факторами, предрасполагающими к получению анеуплоидных эмбрионов в программе ЭКО, являются возраст женщины старше 34 лет, верифицированный наружный генитальный эндометриоз I-II степени, вторичное бесплодие.

3. Качественная оценка профилей отработанных сред культивирования эмбрионов 5-х суток развития свидетельствует о специфических для каждого морфологического класса профилях метаболитов. Внутригрупповой сравнительный анализ профилей сред культивирования эмбрионов с нормальным и аномальным генетическим набором не выявил значимых отличий в исследуемых группах.

4. При оценке профилей метаболитов сред культивирования выявлены изменения содержания L–фенилаланина, L–валина, L–пролина, аланил–глутамин, фенилпирувата и  $\beta$ –L–фукоза–1–фосфата, позволяющие идентифицировать эмбрионы с высоким потенциалом к имплантации.

5. При оценке морфологического качества на 5-е сутки культивирования наблюдается уровень потребления глюкозы в 1,75 раза больше у эмбрионов отличного качества при сравнении с эмбрионами хорошего морфологического качества. Внутригрупповой анализ потребления глюкозы не выявил достоверных отличий между эуплоидными и анеуплоидными эмбрионами, а также эмбрионами разного пола.

6. Достоверных отличий потребления глутамата в исследуемых группах различного морфологического и генетического качества не получено.

7. Критерием удачной имплантации служит уровень потребления глюкозы эуплоидными эмбрионами из питательной среды 2,5 (2,0 –3, 4) нмоль, что в 3,4 раза больше по сравнению с эуплоидными неимплантировавшимися эмбрионами.

8. Выявленные сигнатуры, характеризующиеся высокой диагностической ценностью, применимы для прогнозирования наступления беременности в программе ЭКО с ПГТ с целью идентификации эмбриона с наибольшим потенциалом к имплантации.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При планировании проведения программы ВРТ следует обратить внимание на данные о прерывании беременности в анамнезе, фактор бесплодия, ИМТ на момент проведения стимуляции суперовуляции, тип оплодотворения (ИКСИ) и способ селекции сперматозоидов (ПИКСИ), плоидность эмбрионов, полученных в предыдущих программах ВРТ с ПГТ для прогнозирования получения эмбрионов отличного и хорошего морфологического качества.

2. При выявлении пациенток старше 34 лет, с вторичным бесплодием и верифицированным диагнозом наружного генитального эндометриоза I-II степени следует отнести их к группе риска получения анеуплоидных эмбрионов в программе ЭКО.

3. Женщинам, обратившимся для лечения бесплодия методом ВРТ, целесообразно проведение дифференциальной оценки молекулярного состава сред культивирования эмбрионов 5-х суток развития.

4. При наличии 2 и более эуплоидных эмбрионов на 5-е сутки культивирования после проведения преимплантационного генетического тестирования с целью повышения вероятности имплантации следует рекомендовать перенос эмбрионов с наибольшим уровнем потребления глюкозы из сред культивирования по данным флуоресцентной фотометрии.

5. При наличии на 5-е сутки культивирования эмбрионов с уровнем потребления глюкозы ниже 2,5 (2,0 –3,4) нмоль по данным флуоресцентной

фотометрии перенос эмбриона в полость матки и/или криоконсервацию рекомендовано производить после информирования супружеской пары о низкой вероятности наступления беременности.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изучение продуктов метаболизма эмбрионов в культуральных средах как инструмент определения потенциала к имплантации / **Зорина И.М.**, Смольникова В.Ю., Бобров М.Ю. // **Акушерство и гинекология**. – 2017. – №2. С. 11-16.
2. Профилирование метаболитов в питательных средах пятидневных эмбрионов человека / **Зорина И.М.** Эльдаров Ч.М., Ярыгина С.А., Макарова Н.П., Трофимов Д.Ю., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Бобров М.Ю. // **Биомедицинская химия** – 2017. – №5. С. 385-391.
3. Анализ потребления глюкозы и глутамата в питательных средах как метод оценки качества эмбрионов человека пятых суток развития / **Зорина И.М.** Смольникова В.Ю., Эльдаров Ч.М., Ярыгина С.А., Горшинова В.К., Макарова Н.П., Калинина Е.А., Бобров М.Ю. // **Акушерство и гинекология** – 2018. – №5. С. 64-69.
4. Metabolites profiling in culture mediums of day-5 human embryos / **Zorina I. M.**, Kulakova E., Bobrov M., Eldarov C., Makarova N., Trofimov D., Smolnikova V., Kalinina E., Zgoda V. // The 25th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI) – 2017. – P. 90.