

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное учреждение
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Смольникова В.Ю.

кандидат химических наук

Бобров М.Ю.

Москва - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| ГЛАВА 1. Современные возможности вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы)..... | 12 |
| 1.1 Доступные методы повышения эффективности программ ВРТ..... | 12 |
| 1.2 Морфологические критерии оценки качества эмбрионов..... | 16 |
| 1.3 Преимплантационное генетическое тестирование..... | 19 |
| 1.4 Анализ молекулярного состава питательных сред как инструмент определения потенциала эмбриона человека к имплантации..... | 27 |
| 1.4.1 Изучение изменения углеродного состава сред культивирования..... | 28 |
| 1.4.2 Изучение изменения аминокислотного состава сред культивирования | 36 |
| 1.4.3 Белковые биомаркеры сред культивирования эмбрионов..... | 41 |
| 1.4.4 Специфические микроРНК в культуральных средах как биомаркеры для селективного переноса эмбриона в полость матки..... | 45 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 51 |
| 2.1 Материал исследования..... | 51 |
| 2.2 Дизайн исследования..... | 52 |
| 2.3 Методы исследования..... | 58 |
| 2.3.1 Общеклинические методы исследования..... | 60 |
| 2.3.2 Гормональное исследование..... | 61 |
| 2.3.3 Ультразвуковое исследование органов малого таза..... | 62 |
| 2.3.4 Спермиологическое исследование эякулята..... | 63 |
| 2.3.5 Специальные методы исследования..... | 64 |
| 2.3.6 Протокол стимуляции функции яичников..... | 66 |

| | |
|---|-----|
| 2.3.7 Трансвагинальная пункция яичников..... | 67 |
| 2.3.8 Метод оплодотворения и культивирования дробящихся эмбрионов in vitro..... | 68 |
| 2.3.9 Преимплантационное генетическое тестирование..... | 69 |
| 2.3.10 Перенос эмбрионов в полость матки..... | 71 |
| 2.3.11 Поддержка лютеиновой фазы и посттрансферного периода..... | 71 |
| 2.3.12 Диагностика наступления беременности..... | 71 |
| 2.3.13 Статистический анализ полученных данных..... | 72 |
| Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ..... | 74 |
| 3.1 Клинико-anamnestическая характеристика включенных в исследование пациенток..... | 74 |
| 3.2 Особенности лечения в программе ЭКО у женщин, включенных в исследование..... | 81 |
| 3.3 Анализ изменения состава сред культивирования эмбрионов, полученных в программах исследованных пациенток..... | 90 |
| 3.3.1 Ассоциация профиля метаболитов сред культивирования с качеством развивающихся эмбрионов..... | 90 |
| 3.3.2 Ассоциация профиля метаболитов сред культивирования с вероятностью наступления беременности..... | 93 |
| 3.3.3 Ассоциация уровня потребления глюкозы и глутамата с качеством развивающихся эмбрионов..... | 95 |
| 3.3.4 Ассоциация уровня потребления глюкозы и глутамата с вероятностью наступления беременности..... | 98 |
| Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 100 |
| ВЫВОДЫ..... | 111 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | 113 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 114 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 117 |

ВВЕДЕНИЕ

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» [1, 3, 4, 5, 6, 7, 124].

Непрерывное усовершенствование препаратов, персонификация 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 [9, 47].

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) [13]. 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 [14, 15, 126]. 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 [56]. И наоборот, эмбрионы с неудовлетворительными показателями согласно рутинной классификации приводят к живорождению [56].

Крупномасштабные мировые исследования сообщают, что 10% беременностей прерываются в связи с наличием хромосомной патологии эмбриона: отсутствие в диплоидном наборе хромосом или наличие дополнительных хромосом [18, 19, 20, 21, 22, 23]. 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 [16]. 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 [32, 33, 34]. 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 [9]. Кроме того, диагностика генома не исключает наличие сбалансированных хромосомных aberrаций, точечных мутаций, которые в известной мере влияют на имплантацию эмбриона и развитие врожденных пороков [24, 25, 26, 127, 173, 174].

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 euploidных эмбрионов [9, 53, 101], а также развитие актуальных неинвазивных методов оценки жизнеспособности эмбрионов человека в программах ЭКО [102, 119, 120]. Возможно, из-за недостаточной изученности молекулярной физиологии половых клеток, эмбрионов, эндометрия, выявлены не все принципиальные причины повторных неудач имплантации [121, 122].

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 [9, 52]. 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-anamнестические 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 клиничко – 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 blastocyst 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 β – 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, Россия, 2017) и XXV Конгрессе «Контroversии в акушерстве, гинекологии и репродукции» (Вена, Австрия, 2017).

Работа обсуждена на межклинической конференции отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия (15.11.2018 г) 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. и лаборатории молекулярной патофизиологии ФГБУ «НМИЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России.

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

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 131 странице, состоит из 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.

Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ (обзор литературы)

1.1. Доступные методы повышения эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий

Если пара, активно живущая половой жизнью, не использует никакой контрацепции, но в течение 1 года не может добиться наступления беременности, то по определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в данной ситуации правомочен диагноз бесплодие. К критериям первичного бесплодия ВОЗ относит неспособность женщины родить ребенка из-за отсутствия возможности наступления и дальнейшего вынашивания беременности. Для вторичного бесплодия характерны те же условия, но если у женщины уже была предыдущая беременность или она смогла ранее доносить и родить живого ребенка.

Стимуляция суперовуляции в программах экстракорпорального оплодотворения позволяет аспирировать при трансвагинальной пункции яичников адекватное количество зрелых ооцитов, после оплодотворения которых получают эмбрионы, пригодные для переноса в полость матки пациентки. Влияние на результативность основных этапов в лечении методами ВРТ оказывают и состояние овариального резерва пациентки, ее возраст, фактор бесплодия, сопутствующие гинекологические и соматические заболевания [1, 3, 4, 4, 6]. Существенное значение полноценности диалога между перенесенным эмбрионами и эндометрием имеет его морфологическое состояние, достоверное определение «окна имплантации», своевременная диагностика и лечение внутриматочной патологии [7, 124].

В этой связи, четкое взаимодействие между пациентом, лечащим врачом, специалистом лаборатории клинической эмбриологии, оптимизация всех этапов лечения увеличивают шансы наступления беременности и рождения здорового ребенка.

Развитие программ ВРТ состоит не только в усовершенствовании применяемых препаратов, индивидуализации используемых лечебных

протоколов, но и модификации методов культивирования полученных эмбрионов, а также во внедрении особых методик оплодотворения, позволяющих достигнуть успеха в терапии мужского и женского бесплодия.

Метод введения сперматозоида в цитоплазму ооцита – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ) – был впервые применен в клинической практике в 1992 году под руководством профессора Van Steirteghem [138, 139]. Данный способ оплодотворения полученных ооцитов позволяет преодолеть мужское бесплодие при снижении количества и подвижности сперматозоидов в эякуляте, при наличии патологических форм сперматозоидов, выявлении антиспермальных антител (АСАТ), при получении сперматозоидов с помощью инвазивных методов, небольшое количество полученных ооцитов и нарушение оплодотворения стандартным методом в предыдущих попытках. Метод ИКСИ является альтернативой классическому ЭКО, когда цитоплазматическая мембрана сперматозоида сливается с мембраной ооцита, как это происходит при естественном зачатии.

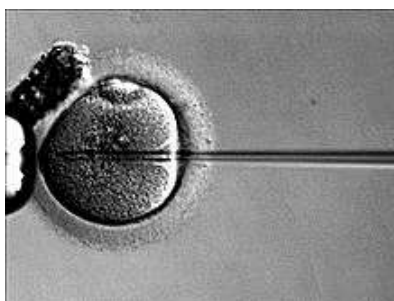


Рисунок 1. Инъекция сперматозоида внутрь яйцеклетки

Процедура производится эмбриологом в условиях лаборатории с использованием микроинструментов: визуально отбирается самый подвижный и морфологически нормальный сперматозоид, обездвиживается, засасывается в микроиглу, а затем вводится внутрь яйцеклетки (рисунок 1). Разработка ИКСИ значительно расширила возможности лечения бесплодия, продемонстрировав отличные показатели наступления беременности у пар, которые раньше без использования донорской спермы были обречены на бездетность [140].

Поскольку во время выполнения данной манипуляции исключаются физиологические этапы оплодотворения, а морфологический отбор сперматозоида осуществляется субъективно эмбриологом, ряд исследователей подчеркивают возможность оплодотворения ооцита сперматозоидом с нарушениями генетического или функционального характера [141, 142], вызывающими нарушения кариотипа полученных эмбрионов и невынашивание беременности [144]. Кроме того, имеются результаты исследований, демонстрирующие увеличение частоты количественных и структурных хромосомных aberrаций, анеуплоидий и дисомий половых хромосом в эмбрионах, полученных при оплодотворении методом ИКСИ [145].

Некоторая несостоятельность методологии породила дальнейший поиск оптимальных методов оплодотворения. Обычная процедура ИКСИ предполагает проведение манипуляций при оптическом увеличении сперматозоидов в 200-400 раз. Для большей эффективности оплодотворения израильскими учеными в 1999 году был разработан метод интраплазматической инъекции морфологически отобранных сперматозоидов - ИМСИ (IMSI), позволяющий проводить анализ на уровне микроструктур под увеличением более чем в 6000 раз, что позволяет обнаружить самые тонкие структурные изменения в сперматозоиде (рисунок 2).



Рисунок 2. Селекция сперматозоидов в процедурах ИКСИ и ИМСИ под увеличением $\times 400$ и $\times 4700$ соответственно

Основоположник процедуры профессор Бенъямин Бартов в собственной лаборатории клиники «Гарцлия» за десятилетия клинического использования этого метода оплодотворения в сравнительных исследованиях показал, что при

ИМСИ процент успешного зачатия удвоился, а количество самопроизвольных прерываний беременности в течение первого триместра снизилось на 60%. Результаты исследования Valaban В. с соавторами показывают разницу в частоте имплантации при применении ИМСИ и ИКСИ соответственно 28,9% и 19,5%, наступления клинической беременности 54,0% и 44,4%, процента живорождения 43,7% и 38,3% [146].

Chelli М. Н. же с соавторами в свою очередь статистически значимых различий в эффективности методик ИКСИ и ИМСИ не получили, о чем сообщается в их клиническом исследовании в 2011 году [148]. На данный момент вопрос определения абсолютных показаний для проведения ИМСИ остается дискуссионным, единственной рекомендацией для предпочтения ИМСИ является повторная неудача после стандартного оплодотворения с использованием ИКСИ [149].

Механизмы оплодотворения, усовершенствованные эволюцией, в условиях естественного зачатия позволяют отобрать сперматозоид лучшего качества. На основании этого появилась дополнительная методика физиологической селекции зрелых сперматозоидов (ПИКСИ) по связыванию с гиалуроновой кислотой, как попытка максимально приблизить отбор сперматозоида вне организма к физиологической селекции и имитировать его взаимодействие с блестящей оболочкой ооцита и участками связывания гиалуроновой кислотой [8].

Однако, данные об эффективности физиологической селекции сперматозоидов в доступной литературе весьма противоречивы. Так, например, сообщается об отсутствии различий в оплодотворении ооцитов сперматозоидами, связавшимися с гиалуроновой кислотой, по сравнению с оплодотворением сперматозоидов без дополнительного физиологического отбора [150].

Virro М. R. с соавторами, напротив, показывает статистически значимое снижение частоты прерывания беременности на ранних сроках при оплодотворении методом ПИКСИ [151], что говорит о возможности селекции функционально лучшего сперматозоида для исключения негативного влияния отцовского генома в развитие эмбриона [152].

Коллеги в Соединенных Штатах Америки практикуют перенос двух и более эмбрионов в полость матки. Считается, что это позитивно влияет на вероятность наступления беременности, о чем говорят данные за 2013 год: живорождение 34% при селективном переносе одного эмбриона в полость матки и 43% при переносе двух и более эмбрионов. Однако, такая тактика увеличивает риск развития многоплодной беременности, приводит не только к невынашиванию и преждевременным родам, но и к рождению маловесных детей, антенатальной гибели плода, к развитию преэклампсии [10, 11, 124].

В связи с этой тенденцией Американским Обществом Репродуктивной Медицины (ASRM) были разработаны руководящие принципы определения количества эмбрионов для переноса [12]. В России за последние 5 лет наблюдается устойчивая тенденция к уменьшению числа переносимых эмбрионов без потери показателей частоты наступления беременности [1].

1.2 Морфологические критерии оценки качества эмбрионов

Оптимальность условий культивирования и выбора переносимого эмбриона составляют две основные проблемы для успешного лечения в программе ЭКО.

Оценка качества эмбрионов согласно морфологическим критериям (по системе Gardner D.R., 1999) является наиболее распространенным методом выбора для селективного переноса [13], но имеет недостаточную прогностическую ценность для определения вероятности наступления и прогрессирования беременности [14]. Кроме того, данная методика носит субъективный характер, поскольку эмбрионы получают оценку на основании скорости развития и количества клеток, симметрии и степени фрагментации, наблюдаемых клиническим эмбриологом, а изменение морфологии быстрого раннего развития эмбриона происходит однократно и не отражает истинный потенциал развития каждого эмбриона [15, 126]. Как показывает клиническая практика, в дальнейшем не все эмбрионы «отличного» и «хорошего» морфологического качества успешно имплантируются и, кроме того, могут иметь

анеуплоидный набор хромосом [56], а эмбрионы с удовлетворительными показателями приводят к живорождению [56].

В соответствии с классификацией D. Gardner на 5-е сутки культивирования оценивается степень экспансии бластоцисты, параметры внутриклеточной массы и трофэктодермы [16]:

Степень экспансии бластоцисты:

- 1 – ранняя бластоциста, бластоцель менее 50% объема эмбриона;
- 2 – бластоцель 50% и более объема эмбриона;
- 3 – полная бластоциста, бластоцель полностью заполняет эмбрион, блестящая оболочка не истончена;
- 4 – экспандированная бластоциста, блестящая оболочка истончена;
- 5 – вылупляющаяся бластоциста, трофэктодерма выходит через блестящую оболочку (хетчинг);
- 6 – вылупившаяся бластоциста, полностью освобождена от оболочки, готова к имплантации.

Внутриклеточная масса:

- А – большое количество клеток, упакованы плотно.
- В – среднее количество клеток, упакованы менее компактно;
- С – количество клеток малое.

Трофэктодерма

- А – плотный эпителий формируется из большого количества клеток;
- В – рыхлый эпителий формируется из незначительное количество клеток;
- С – количество клеток малое.

Использование клинического прибора, представляющего совокупность биологического инкубатора с системой микроскопического наблюдения и фотографии – time – lapse imaging (TLI), позволяет получать последовательные изображения эмбрионов во время культивации, используя микроскоп и камеры, и уточнять оценку уже известных морфологических параметров. Двумя испытаниями о развитии эмбрионов, проведенными с использованием одной и той же установки, подтверждена безопасность TLI [153, 154].

Являясь сравнительно новшеством в лаборатории ВРТ, данный метод в исследовательских целях десятилетиями использовался в изучении развития эмбрионов различных видов животных или реже – «избыточных» эмбрионов человека [155].

Wong С.С. в 2010 году совместно с коллегами, наблюдая развитие 4-клеточных эмбрионов, сообщают о высокой чувствительности (93%) и специфичности метода временной визуализации (94%). В их модели исследовались морфокинетические параметры (длительность цитокинеза, интервал между первым и вторым митозом, интервал между вторым и третьим митозом) для прогнозирования остановки развития эмбриона и успешного развития до стадии бластоцисты [156]. Полученные данные перепроверила исследовательская группа Conaghan J., но для эмбрионов 5-х суток развития (бластоцист, пригодных для переноса в полость матки или криоконсервации на 5-е сутки). Примечательно, что итоговый результат прогнозирования не достиг чувствительности и специфичности исследования, описанного выше. Однако, при проведении исследования на большей выборке удалось идентифицировать эмбрионы с меньшей способностью к развитию до стадии бластоцисты (специфичность 84,7%, чувствительность 38,0%) [157].

Только в единичных исследованиях были изучены морфокинетические параметры для прогнозирования беременности, но и эти исследования продемонстрировали противоречивые результаты. Вышеупомянутая модель эмбриологического развития была испытана на большой выборке эмбрионов, перенесенных в полость матки. Эффективность программы несколько увеличилась в тестируемой группе, но не соответствовала данным общей когорты эмбрионов, перенос которых привел к наступлению беременности, что подчеркивает ограниченность метода только в предсказании бластуляции [158].

Hlinka D. и соавторы в своем исследовании морфокинетического метода показали, что только 26, 4% бластоцист привели к успешной имплантации, что не превышает имеющиеся показатели успешности программы ЭКО [159]. Более того, научные группы Kirkegaard K. и Chamoyou S. представили несколько

морфокинетических предикторов развития бластоцисты, но и эти параметры оказались неспособны предсказать имплантацию эмбрионов после переноса в полость матки [160, 161].

Временная визуализация динамики роста и развития эмбрионов представляется перспективным методом отбора по сравнению с общепринятой морфологической оценкой, но необходимость дальнейших исследований абсолютна очевидна. Для того, чтобы использовать динамику развития бластоцисты в прогнозировании имплантации крайне важно активное изучение, разработка единых алгоритмов, интерпретация полученных результатов.

1.3 Преимплантационное генетическое тестирование

Одной из важнейших задач репродуктивной медицины является не просто рождение долгожданного ребенка в семье, но и предупреждение появления детей с генетическими заболеваниями. При прогрессирующей беременности данные патологические состояния способна выявить пренатальная диагностика, а на этапе до осуществления переноса эмбрионов в полость матки аномалии позволяет выявить преимплантационное генетическое тестирование [9].

Преимплантационный генетический скрининг проводится не одно десятилетие, показывая превосходство над критериями морфологии при отборе эмбриона [16].

Соматические клетки содержат 46 хромосом: 22 пары аутомосом (обозначаются номерами 1-22) и одна пара половых хромосом (XY или XX). Эмбрионы с нормальным количеством хромосом называются эуплоидными, содержащие нетипичное число хромосом – анеуплоидные.

По данным мировых исследований 10% беременностей прервались в связи с моносомией эмбрионов (отсутствие в диплоидном наборе одной хромосомы) или трисомией эмбрионов (наличие дополнительной хромосомы), что является наиболее частой причиной потери беременности, приближаясь к 50% в у женщин старшего репродуктивного возраста [18, 19, 20, 21, 22, 23]. То есть хромосомная патология – одна из основополагающих неудачных попыток лечения.

Согласно Международному Глоссарию терминологии в лечении бесплодия преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) проводится для определения генетических аномалий или HLA – типирования ооцитов (полярных тел) или эмбрионов, в когорте полученных во время цикла ЭКО, и включает в себя ПГТ – А для определения анеуплоидий и изменений количества хромосом, ПГТ – М для определения моногенных и/или одиночных генных дефектов [184]. По результатам исследования эмбрион без патологии может быть перенесен в полость матки или криоконсервирован для переноса в другом лечебном цикле.

В практике генетического исследования эмбриональных клеток применяется флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), полимеразная цепная реакция (ПЦР/PCR), сравнительная геномная гибридизация с использованием микроматриц (array comparative genomic hybridization – a – CGH) и метод секвенирования нового поколения (next-generation sequencing – NGS). Показания для проведения преимплантационного генетического тестирования доступными методами можно разделить на 6 групп различных пациентов (таблица 1) [146].

Таблица 1 - Показания к проведению преимплантационной генетической диагностики (Корсак В.С. и соавторы, 2015)

| Показания для проведения диагностики | | Вид диагностики |
|--|---|---------------------------------------|
| Группа высокого риска передачи генетической патологии потомству | носительство мутаций, вызывающих моногенные заболевания (аутосомно-рецессивное и –доминантное типы наследования; наследование, сцепленное с полом); | ПЦР, NGS |
| | носительство числовых и структурных хромосомных aberrаций; | FISH, ПЦР, a – CGH, SNP – arrays, NGS |
| Группа высокого риска образования анеуплоидных половых клеток при эуплоидном кариотипе | - когорта пациентов старшего репродуктивного возраста и старше; - привычное невынашивание и/или повторные неудачи в программах ВРТ в анамнезе; - тяжелый мужской фактор бесплодия: <ul style="list-style-type: none"> ▪ олигоастенотератозооспермия, ▪ тяжелая олигозооспермия, ▪ азооспермия; | FISH, ПЦР, a – CGH, SNP – arrays, NGS |
| Группа высокого риска развития у потомства тяжелой болезни с поздней манифестацией | - носительство генных мутаций, приводящих к увеличению рисков развития онкологических заболеваний и заболеваний с поздней манифестацией; | ПЦР, NGS |

Продолжение таблицы 1

| | | |
|---|---|----------------|
| Необходимость пересадки стволовых гемопоэтических клеток донора для продолжения жизни ребенка с гематологической болезнью в семье | - носительство наследуемых заболеваний крови; - спорадические случаи гематологических заболеваний в семье у ребенка; | ПЦР, NGS |
| Группа высокого риска тяжелого течения митохондриальной болезни у потомства | - специфическое носительство мутации мтДНК у женщины; | ПЦР, NGS |
| Планирование пола | - объективные причины для рождения ребенка определенного пола в семье. | FISH, ПЦР, NGS |

Процедура диагностики состоит из трех этапов [146]:

1. биопсия клеточного материала;
2. подготовка биопсированных клеток к генетической диагностике: при проведении ПЦР, а – CGH, NGS – перенос исследуемых клеток в эппендорфовские пробирки с лизирующим буфером; при проведении FISH – фиксация исследуемых клеток на предметном стекле;
3. молекулярно-генетическая или молекулярно-цитогенетическая диагностика единичных клеток.

Некоторые группы ученых выступают за проведение биопсии полярных тел (PB) ооцитов М II и/ или зигот, что исключит удаление бластомеров из развивающегося эмбриона и позволит получить эквивалентную информацию. [27, 28, 29]. Получение информации о генетическом статусе таким способом главным образом производится в странах, где юридически запрещена биопсия эмбрионов, и составляет 10-15% всех процедур, проводимых в Европе в последнее десятилетие. Однако, доступные публикации сообщают об отсутствии влияния биопсии PB на дальнейшую имплантацию эмбрионов. В свете этого безопасность процедуры по-прежнему остается спорным моментом [167]. Caralbo A. с коллегами сообщают о негативной стороне ложноположительных результатов данного метода, а также о невозможности определения анеуплоидий,

передающихся с отцовской стороны и возникающих в процессе митоза [166]. Levin I. сообщает, что на 3 день эмбрионального развития наблюдается снижение скорости развития эмбриона и более высокая его фрагментация, учащение остановки развития эмбрионов и низкое среднее число бластомеров при предварительном проведении биопсии на стадии РВ. К сожалению, в ходе работы не оценивался дальнейший потенциал эмбриона к имплантации [168].

Метод биопсии трофоэктодермы (ТЕ) эмбриона на стадии морулы технически подобен вышеописанному и имеет схожие недостатки, однако, преимуществом является анализ более, чем одной полученной клетки, что обеспечивает надежность молекулярного исследования [169].

Впервые о биопсии эмбриона на стадии бластоцисты было доложено de Boer К. А. и его коллегами в 2004 году [170], а в 2005 году исследовательская группа Kokkali G. [171], а также группа Mc. Arthur S. [172] сообщили о живорождении после применения этого метода.

На данном этапе метод FISH позволяет рутинно определить только 9–12 хромосом исходя из их значимости для пренатального и постнатального развития. Целесообразно тестирование числа хромосом - 8, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y [163, 164]. Интересно отметить необходимость проведения ПГТ – М методом FISH в рамках программы ВРТ у эмбрионов супружеских пар с мутацией AZF локуса хромосомы Y, поскольку высокий уровень мутации (59,7%) не снижает потенциал к имплантации и дальнейшему развитию, а также не имеет взаимосвязи с морфологической характеристикой эмбриона [6].

Достоверное определить число всех хромосом человека и выявить несбалансированность по отдельным хромосомным сегментам позволяет метод сравнительной геномной гибридизации (a – CGH) [165].

В ходе анализа спектра и частоты выявления хромосомной патологии на доимплантационных стадиях развития эмбрионов было установлено, что доля эуплоидных эмбрионов среди успешно амплифицированных образцов при анализе методом a – CGH составила 47% (1488 из 3156 образцов), а при анализе методом NGS 46% (314 из 688 образцов). Доля изолированных сегментарных

нарушений при анализе биопсийного материала методами а – CGH и NGS также статистически не отличалась и составила 5% (172 образца) и 4% (28 образцов) соответственно. Однако при оценке уровня мозаицизма, определяемого методами а – CGH и NGS, было получено статистически значимое различие. Доля мозаичных эмбрионов, определяемых с помощью NGS, выше, чем при проведении исследования методом а – CGH и составляет 10% (72 образца) и 3% (103 образца) соответственно [1].

Первоначальная демонстрация техники генетического скрининга для выявления анеуплоидных эмбрионов была представлена Munne S. и соавторами [30, 31], а через некоторое время было зарегистрировано увеличение частоты имплантации и живорождения, снижение показателей невынашивания беременности в группе циклов ЭКО с ПГТ по сравнению с результатами в группе стандартного ЭКО [32, 33, 34].

Однако, данный метод имеет ряд некоторых ограничений, а именно потенциальное воздействие на эмбрион при проведении биопсии [24], вероятность мозаицизма при интерпретации результатов [25]. Мозаицизм эмбрионов – состояние, при котором хромосомный набор отличается между blastomeres одного и того же эмбриона, что вполне может быть важной причиной неэффективности ПГТ. Клинические исследования влияния мозаицизма на интерпретацию результатов ПГТ обычно фокусируются на показателях «неправильного диагноза», то есть ложноотрицательных и ложноположительных показателях анализа, а не на влиянии мозаицизма на частоту наступления беременности или уровень рождаемости [172, 174]. Диплоидно-анеуплоидный мозаицизм эмбриона, состоящего из нормальных и анеуплоидных blastomeres, может быть причиной низких показателей рождаемости после генетического тестирования. Аспирация анеуплоидных blastomeres из диплоидно-анеуплоидных эмбрионов приводит к отмене переноса или криоконсервации этих эмбрионов, хотя они потенциально жизнеспособны, поскольку содержат и нормальные blastomeres. И наоборот, аспирация нормальных blastomeres из диплоидно-анеуплоидных эмбрионов приводит к переносу или криоконсервации

их, хотя доля нормальных бластомеров снижается, что потенциально препятствует успешной имплантации [41].

Недавний систематический обзор литературы показал, что 46% из 107 развивающихся эмбрионов, которые были проанализированы на восемь или более хромосом, имели диплоидно-анеуплоидный мозаицизм, со средним значением нормальных бластомеров 47% [174]. Это означает, что у 24% всех эмбрионов будет аспирирован анеуплоидный бластомер, что приведет к их исключению из потенциально жизнеспособных, а у 22% всех эмбрионов нормальный бластомер аспирируется во время биопсии, что приведет в дальнейшем к переносу или криоконсервации эмбрионов с относительно меньшим количеством нормальных бластомеров. Несмотря на неопределенность в отношении точных процентов, явление мозаицизма важно в неэффективности генетического тестирования.

Диагностика генома не исключает наличие сбалансированных хромосомных aberrаций, точечных мутаций, которые в известной мере влияют на имплантацию эмбриона и развитие врожденных пороков [127]. Кроме того, важно отметить явление селективного апоптоза и способность эмбрионов ранних стадий развития к самокоррекции [26], высокую стоимость исследования и невозможность диагностики на небольшом количестве материала.

Многообещающие результаты предсказывали регулярное использование генетического тестирования в рамках циклов ЭКО, а к настоящему времени данный метод вошел в рутинную клиническую практику [35, 36].

Рандомизированные контролируемые испытания (РКИ), проведенные независимо различными исследователями, продемонстрировали, что показатели имплантации перенесенных эмбрионов после ПГТ и ранних потерь беременности существенно не отличались от контрольной группы, где ПГТ не проводилось [37, 38]. Группа ученых, возглавляемых Mastenbroek S. и Twisk M., подтвердила полученные данные, проводя систематический обзор и метаанализ испытаний о влиянии ПГТ на вероятность живорождения после программы ЭКО. ПГТ значительно снизила коэффициент рождаемости после ЭКО для женщин старшего репродуктивного возраста (разность рисков: -0,08, доверительный интервал 95%:

от 0,13 до -0,03). После ЭКО без ПГТ живорождение составило 26%, после ЭКО с ПГТ составляет 13 – 23%. Испытания, в которых ПГТ было проведено пациенткам с хорошим прогнозом, женщинам с повторными неудачами имплантации, продемонстрировали аналогичные результаты. Таким образом, необходима тщательная оценка эффективности ПГТ перед внедрением в рутинную клиническую практику, поскольку абсолютных доказательств положительного эффекта нет. Напротив, у женщин старшего репродуктивного возраста проведение ПГТ значительно снижает уровень рождаемости [39, 40, 41, 42, 43, 44].

Yang Z. с коллегами в свою очередь провели РКИ, в котором в исследуемой группе из 55 женщин, обратившихся для проведения программы ЭКО (ИКСИ), на 5 сутки эмбрионального развития проводилась биопсия трофэктодермы бластоцисты для проведения ПГТ методом сравнительной геномной гибридизации (CGH), селекция эмбрионов для трансфера в полость матки производилась по совокупности морфологических и генетических характеристик. В контрольной группе, состоящей из 48 женщин, селекция эмбриона для переноса в полость матки определялась только морфологией. В результате продолжительность беременности свыше 20 недель была выше в исследуемой группе (69,1%) по сравнению с контрольной (41,7%), демонстрируя, что выбор эмбриона для переноса в полость матки на основании совокупности морфологического качества и генетического набора более эффективен [45].

Forman E. с соавторами в подобном исследовании пришел к выводу, что селективный перенос одного эуплоидного эмбриона снижает риск развития многоплодной беременности, не влияя на частоту прогрессирующих беременностей [46].

Абсолютная значимость ПГТ на данном этапе сомнительна, так как отбор эмбрионов не только по общепринятым критериям морфологии, но и по генетическим критериям полностью не решает актуальную проблему безуспешных исходов программ ВРТ в клинике. Известно, что частота наступления беременности при условии УЗ-картины нормальных параметров прегравидарного эндометрия при переносе эуплоидного эмбриона составляет 50-

70 % [9, 45, 46, 48], что в очередной раз подчеркивает не 100% эффективность тестирования эмбрионов.

Исследование, проведенное Capalbo A. с соавторами, показало, что имплантационный потенциал эуплоидных эмбрионов был одним и тем же, несмотря на различные морфологические классы и скорости развития. Таким образом, ни один из параметров, используемых для обычной оценки эмбриона на стадии бластоцисты (морфологические критерии и скорость развития), абсолютно не указывает на потенциал эуплоидного эмбриона к имплантации [58].

По-видимому, наличие анеуплоидий вносит несущественный вклад в процесс имплантации. Их негативное влияние может проявиться на ранних этапах внутриутробного развития, приводя к снижению количества положительных исходов.

С 1995 по 2015 г. комитетом по Регистру Российской Ассоциации Репродукции Человека были собраны и проанализированы сведения о 747 396 циклах ВРТ, выполненных в России, т.е. 765 циклов ВРТ на 1 млн населения. Можно констатировать, что в России 2017 г. является годом миллионного лечебного цикла ВРТ. Доля циклов ЭКО составила 30,8%, ИКСИ — 36,8%; смешанный способ оплодотворения ЭКО+ИКСИ применяли в 6,6% циклов; перенос размороженных эмбрионов — 22,9%, донорство ооцитов — в 6,5%, преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) — 3,0%. ПГД была проведена в 3344 циклах, перенос эмбрионов был выполнен в 1880 случаях, беременность наступила в 776 (42,0%) случаях, родами в срок 22 нед и больше завершилось 579 (78,3%) беременностей.

В связи с этим возникает необходимость в развитии и внедрении в широкую клиническую практику новых неинвазивных методов диагностики потенциала эмбрионов к имплантации, улучшающих показатели лечения в программе ЭКО, а также снижающих воздействие на эмбрион и стоимость исследования, позволяющих провести дифференцировку двух эуплоидных эмбрионов, а также идентифицировать аналитические профили или отдельные биомаркеры эмбрионов с лучшим потенциалом развития [9, 49, 50, 51, 128, 129, 130].

Как уже указывалось ранее, питательные среды различных стадий эмбрионального развития представляют собой уникальный объект для исследований, так как они содержат данные об активности сигнальных систем, метаболизма и энергетического обмена эмбриона [9, 52]. Оценка молекулярного состава питательных сред может лечь в основу неинвазивного метода выявления специфических маркеров успешной имплантации. Понимание особенностей изменения профилей метаболитов может способствовать развитию нового направления оценки качества эмбрионов и его потенциала к имплантации. Использование данного подхода в совокупности с имеющимися методами представляется перспективным для повышения вероятности развития клинической беременности и рождения здорового ребенка.

1.4 Анализ молекулярного состава питательных сред эмбрионов человека

Появление «омиксных» технологий (геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика) делает возможным получение информации о физиологии биологических систем при относительно низких затратах и усилиях, что может быть введено в практику вспомогательных репродуктивных технологий для определения молекулярных особенностей клеток и тканей репродуктивной системы, а именно сперматозоидов, яйцеклеток, зернистых клеток, эмбрионов и эндометрия, продуктов их обмена веществ в семенной плазме, фолликулярной жидкости, средах культивирования [123]. Такой подход системной биологии поможет найти лучшие сперматозоиды и яйцеклетки, оплодотворение которых приведет к развитию лучшего эмбриона, который успешно имплантируется и приведет к живорождению, что принесет ощутимый практический вклад и позволит эффективно проводить лечение методами ВРТ.

Роджер Вильямс, изучая показатели профилирования мочи и слюны у больных шизофренией, высказал научное предположение об индивидуальном «метаболическом профиле», отражающем состав биологических жидкостей [135]. Когда же в 1971 году было показано, что газовая хромато-масс-спектрометрия может применяться для определения соединений, представленных в моче и

других биологических жидкостях человека, был введен термин «метаболический профиль» [134, 136].

Базы данных метаболома человека содержит информацию о 2500 метаболитах, 1200 лекарствах и 3500 пищевых веществ. Первая версия программы «Метаболом человека» была завершена 23 января 2007 года под руководством Дэвида Уишартома [137]. Для анализа клеток или тканей используются самые разные биохимические и технологические подходы. На сегодняшний день «омиксные» технологии остаются самыми развивающимися и перспективными. Дальнейший их прогресс связан как с развитием аналитических способов исследования, так и с пополнением имеющихся баз данных и широким изучением биологических жидкостей.

1.4.1. Изучение изменения углеродного состава сред культивирования

Активно набирает популярность анализ метаболизма эмбрионов, культивированных в условиях лаборатории, с использованием высокочувствительных методов для установления связи с морфологией, успешной имплантацией, развитием клинической беременности и рождением ребенка. Основное внимание ученых сосредоточено на изучении метаболизма главных субстратов: аминокислот, глюкозы и пирувата. при помощи точного обнаружения специфических молекул [9, 84].

Генетическая программа преимплантационного развития содержит информацию, регулирующую метаболизм эмбриона от стадии дробления до образования бластоцисты. Основной его механизм заключается в переходе от метаболизма карбоновых кислот к метаболизму глюкозы между пре- и посткомпактизацией, что является показательной характеристикой эмбриональной метаболической регуляции [91]. Метаболизм карбоновых кислот преобладает на ранних стадиях развития эмбриона, когда пируват и лактат являются основными источниками энергии для синтеза АТФ, тогда как потребление глюкозы на этом этапе минимально [92].

Существует два основных пути синтеза аденозинтрифосфата (АТФ), необходимого для реакций метаболизма эмбриона: аэробный гликолиз (цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса) и анаэробный гликолиз (путь Эмбдена — Мейергофа — Парнаса). По мере развития эмбриона, начиная со стадии бластоцисты, потребление глюкозы неуклонно возрастает. Это может быть связано с тем, что анаэробное и аэробное расщепление глюкозы повышает продукцию АТФ, обеспечивая растущие потребности развивающегося эмбриона. Данное явление наблюдалось при исследовании этапов развития эмбрионов многих млекопитающих, включая мышей, крыс, коров, овец, свиней и человека [92, 93].

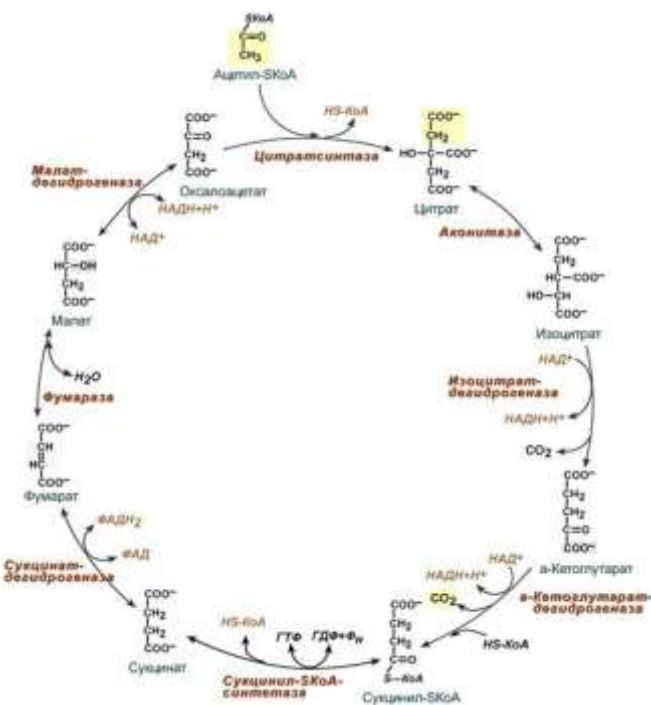


Рисунок 3. Аэробный гликолиз, цикл Кребса (цикл трикарбоновых кислот)



Рисунок 4. Анаэробный гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса)

Еще в 1970 года Menke T. и Mc Laren A. [85] при культивировании бластоцист мышей наблюдали нарушение окисления глюкозы некоторыми из них,

а в последующих исследованиях была показана связь этих изменений в метаболизме глюкозы и нарушении развития эмбрионов *in vitro* [86].

В начале 1980 году Renard J.P. с соавторами показали, что уровень потребления глюкозы из сред культивирования у перспективных бластоцист крупного рогатого скота, полученных через 10 дней после эструса, был выше, но не имел связи с морфологическим качеством эмбрионов [87]. Подобные исследования проводились на эмбрионах разных биологических видов [88].

Используя неинвазивную микрофлуоресценцию, Gardner D.K. и Leese H.J. в 1987 году измеряли скорость потребления глюкозы 4-дневными эмбрионами мышей до осуществления переноса: уровень потребления глюкозы был значительно выше у развивающихся бластоцист [89]. Полученные Gardner D.K. и соавторами данные так же подтвердила научная группа, возглавляемая Lane M. [90].

Gardner D.K. с соавторами наблюдал повышение скорости потребления пирувата и глюкозы у эмбрионов на стадии бластоцист. Кроме того, потребление глюкозы у бластоцист отличного морфологического качества было более высокое в отличии от других классов [9, 55, 94].

В своей работе в 2008 году Gardner D.K. с соавторами продемонстрировал взаимосвязь скорости потребления компонентов питательных сред культивирования эмбрионами человека и потенциалом к имплантации, дальнейшему развитию после их переноса в полость матки [9, 95]. Интересно отметить тот факт, что полученные данные говорят о различности физиологии мужских и женских человеческих эмбрионов, существуют половые различия в метаболизме глюкозы на стадии раннего эмбрионального развития: увеличение потребления глюкозы на 28% эмбрионами женского пола (92.5 ± 7.1 пмоль/эмбрион/ч) по сравнению с эмбрионами мужского пола (72.0 ± 6.3 пмоль/эмбрион/сек; $p < 0.05$) [9]. Необходимо отметить, что половая принадлежность детей определялась после родоразрешения.

Исследование потребления глюкозы проводилось методом микрофлуориметрия и показало, что высокий уровень потребления глюкозы был

из сред культивирования эмбрионов, после переноса которых развилась беременность, но, в свою очередь, не зависел от морфологических критериев качества эмбрионов [9].

К сожалению, выполнение исследования микрофлуорометрическим методом является сложным в рутинной практики, требуя специализированного оборудования, подготовленного технического персонала, однако, может быть потенциальным средством анализа небольших объемов культуральных сред.

Urbanski J. [96], в свою очередь, для преодоления имеющихся сложностей, разработал специализированную установку, позволяющую проводить анализ сред в суб-микролитровых объемах для точного количественного определения потребления питательных веществ и измерения уровня метаболитов [97, 98].

Целью этого исследования была разработка автоматизированной системы для неинвазивной оценки метаболизма эмбрионов. Одним из стандартных оценочных методов является изучение потребления и производства нескольких ключевых энергетических субстратов (глюкоза, пируват и лактат) с использованием микрофлуорометрических ферментативных анализов. Оценка выполняется вручную, с использованием специализированных пипеток, что значительно ограничивает полезность этой системы. На основании многослойной литографии группа разработала микрожидкостное устройство, выполняющее анализ автоматическим способом. После ручной загрузки образцов и реактивов с ферментами эта система выполняет исследование аликвот образцов и ферментов, смешивание реагентов, сбор данных и анализ данных без вмешательства оператора. Оптимизация схем проектирования и эксплуатации устройства позволила выполнить последовательные измерения уровня глюкозы, пирувата и лактата трехкратно в субмикролитровых объемах образцов в течение 5 минут. Текущее устройство анализатора позволяет автоматизировать исследование 10 образцов и их калибровку в течение трех часов. Стандартные кривые, генерируемые для каждого метаболита, имеют коэффициенты корреляции, которые обычно превышают 0,99. При использовании стандартный эпифлуоресцентный микроскоп и прибор с зарядовой связью (ПЗС – камера),

получены концентрации метаболитов в области низких микромолей (низкие фемтомоли общего анализата). Кроме того, это устройство можно использовать в качестве автономного, в которое образцы загружаются или интегрируются в микрофлюидные системы культивирования для линейной метаболической оценки в режиме реального времени.

На рисунке 5 изображена техника анализа.

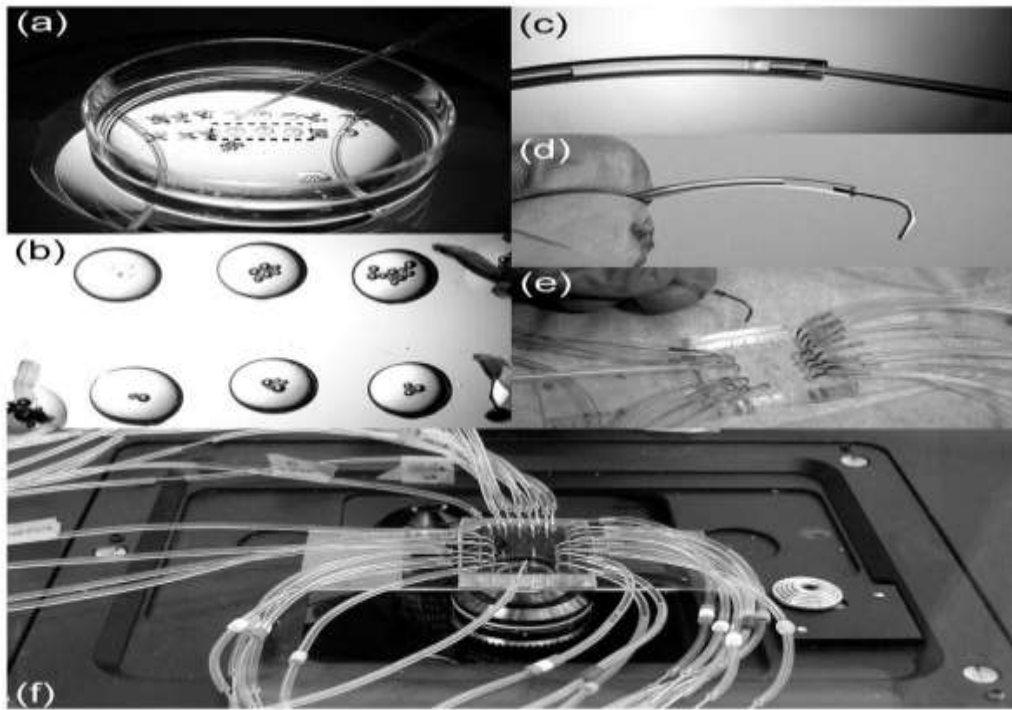


Рисунок 5. Изображение процесса загрузки

Последовательная загрузка образцов культуральных сред эмбрионов (a, b), предварительно хранившихся в чашке Петри (35 мм) под маслом для предотвращения испарения (c). Отдельные образцы среды (обычно 1-5 мкл рабочего объема) переносятся наконечником пипетки непосредственно в трубку Tygon длиной 500 мкм. (d). Конец трубки разрезан (e), все образцы подключены к детекторной микросхеме, которая в свою очередь подключена к управляющему коллектору, а затем (f) смонтирована на инвертированном микроскопе для эксперимента. Авторы сообщают, что в целом значения измеряемых показаний согласуются с опубликованными ранее литературными данными. При проведении дальнейших работ для улучшения пропускной способности и функциональной

гибкости этой системы, возможно, устранить многие препятствия в оценке метаболизма эмбрионов и отдельных клеток.

Используя ЯМР-спектроскопию, как неинвазивный инструмент, Rudakalakatti S. M. и соавторы изучали метаболизм эмбрионов человека, чтобы определить конкретные биомаркеры оценки потенциала к имплантации [176]. Исследование основывалось на оценке уровней пирувата, лактата и аланина в средах культивирования 127 эмбрионов от 48 пар, обратившихся для проведения программ ЭКО/ИКСИ. В результате эмбрионы, перенесенные на 3-й день (после 72 часов культивации *in vitro*), с успешной имплантацией (наступившей клинической беременностью) показали значительно ($p < 10^{-5}$) более низкий индекс пируват/аланин по сравнению с теми, которые не имплантировались. Уровни лактата в средах культивирования были одинаковыми для всех эмбрионов. Это означает, что в дополнение к производству лактата успешно имплантированные эмбрионы используют пируват для производства аланина. В настоящем исследовании подчеркивается возможность комбинирования показателей уровня пирувата и аланина для обеспечения единого параметра, который действительно коррелирует с потенциалом к имплантации.

Раннее развитие некоторых эмбрионов млекопитающих защищено сложными системами, обеспечивающими поддержание геномной целостности. В свою очередь, некоторые метаболические пути модулируются в ответ на повреждения генома в клетках млекопитающих.

В масштабном исследовании отработанных сред культивирования, выполненном группой ученых во главе с Fiona D'Souza на мышах, продемонстрирована взаимосвязь между изменением уровней метаболитов эмбрионов и их генетической целостностью, а так же со способностью к развитию эмбрионов до преимплантационной стадии. Целью исследования стала неинвазивная идентификация ранних биомаркеров, способных предсказать генетическую целостность эмбриона, с использованием профилирования выделенной среды с помощью ЯМР-спектроскопии [177]. Значительное увеличение поглощения глюкозы ($p < 0,05$) и пирувата ($p < 0,01$) на 3 сутки

культивирования наблюдалось в контрольной группе эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, по сравнению с эмбрионами, остановившимися в развитии на стадии компактизации. Эти наблюдения показывают, что уровень метаболической активности непосредственно связан со стадией развития эмбрионов.

Затем стабильно развивающиеся эмбрионы и эмбрионы с замедленным ростом были дополнительно культивированы до 5-х суток. Относительные уровни метаболитов и поглощение пирувата ($p < 0,01$) на 3 сутки были значительно выше у эмбрионов, которые развивались стабильно, по сравнению с задержавшимися в развитии.

Для экспериментального моделирования повреждения ДНК производилось воздействие 3 мкМ противоопухолевого препарата Цисплатин на 2-х клеточные эмбрионы (группа эмбрионов с индуцированными ДНК-повреждениями – IDL – эмбрионы). Было отмечено, что на 3 и 5 сутки культивирования метаболический профиль IDL – эмбрионов существенно не отличался от эмбрионов с замедленным ростом. Возможно, это связано с более широким спектром пролиферации, наблюдаемой у IDL – эмбрионов.

Для дальнейшего изучения изменений в метаболизме, вызванных повреждением ДНК, пролиферативный индекс (labelling index – LI) рассчитывался у отдельных эмбрионов на 3 и 5 сутки культивирования. Хотя LI у IDL – эмбрионов на третьи сутки не отличался от контрольной группы, на пятые сутки он почти удваивался, а отличия были статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,0001$).

Исследователи попытались понять взаимосвязь между генетической нестабильностью, проявляющейся как апоптоз у эмбрионов 5 – х суток развития, и метаболической сигнатурой отработанных сред культивирования эмбрионов 3 – х суток развития. Наблюдалась поразительное изменение картины обмена веществ между контрольной группой и IDL – эмбрионами с пролиферативным индексом $> 12\%$, которые в свою очередь демонстрировали повышенную потребность в энергетических субстратах: лактате ($p < 0,001$), пирувате ($p < 0,01$) и глюкозе (p

<0,001) по сравнению с контрольной группой. Корреляционный анализ показал достоверную связь поглощения лактата ($p < 0,05$), пирувата ($p < 0,001$) и глюкозы ($p < 0,05$) с увеличенным LI.

Таким образом, оценка изменения углеводного состава отработанных культуральных сред может быть использована для определения качества эмбриона и его потенциала к имплантации, однако, основной причиной ограниченного количества данных об эмбриональном метаболизме по-прежнему является проблема измерения метаболитов в небольших объемах сред, которые используются для культивирования отдельных эмбрионов.

1.4.2. Изучение изменения аминокислотного состава сред культивирования

Безусловно, существенным дополнением к классическим морфологическим критериям в выборе эмбриона для переноса в полость матки или криоконсервации станет неинвазивный метод, основывающийся на оценке физиологии эмбрионов с использованием метаболических параметров одних из главных химических элементов организма, выполняющих важную роль в жизнедеятельности клеток. Анализ биосинтеза аминокислот используется в экспериментальных работах для оптимизации программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Масс-спектрометрия (МС) наиболее часто используется для анализа состава биологических образцов по качественным и количественным критериям, а в совокупности с новейшими методами хроматографии становится высокочувствительным методом, позволяющим детектировать в образце метаболиты в низких концентрациях [9, 86]. Метаболомика – изучение уникальных «отпечатков пальцев» биологических процессов живых клеток. Говоря научным языком, изучение низкомолекулярных метаболических профилей [133]. Активное внедрение метаболомики для оценки жизнеспособности эмбриона свидетельствует о поиске неинвазивного метода диагностики жизнеспособности эмбриона.

Помимо участия в построении белков глутамат можно считать промежуточным продуктом энергетического метаболизма, так как его метаболом

тесно связан с функционированием цикла трикарбоновых кислот [100]. Так же в организме глутамат используется всеми клетками для синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований, его амидные производные являются транспортными формами аммиака, а γ – аминomásляная кислота является медиатором в ЦНС. Кроме этого, глутаминовая кислота входит в состав глутатиона – вещества, выполняющего две различные функции – перенос аминокислот через мембрану и регуляция антиоксидантной системы клетки.

При глобальном метаболическом профилировании образцов эндометрия, собранных у пациенток с неактивным генитальным туберкулезом, было выявлено увеличение содержания глутамата в тканях и корреляция с исходом программ ЭКО [131]. Концентрация аминокислот, аммиака и мочевины подверглись измерению в фолликулярной жидкости и периферической крови для понимания процессов транспорта веществ фолликулярных клеток: в доовуляторной фолликулярной жидкости происходит накопление глутамата и аммиака, а уровень мочевины согласуется с пассивной диффузией, без каких-либо признаков активного цикла мочевины в фолликулах [132].

С помощью протонного ядерно – магнитного резонанса (ЯМР) в работе Seli E. с соавторами в 2008 году был показан репродуктивный потенциал эмбриона и данные метаболомного профилирования сред 3-х суток развития [9, 99].

Исследователями была показана корреляция репродуктивного потенциала эмбрионов с ЯМР – профилем метаболитов культуральных сред. Таким образом, концентрация глутамата была значительно выше в средах имплантировавшихся эмбрионов. Кроме того, по показателям глутамата и аланин/лактата был произведен расчет индекса жизнеспособности, который, в свою очередь, был выше для эмбрионов, после переноса которых развилась беременность и произошли роды [9, 99].

В уже описываемом выше исследовании Fiona D'Souza [177] уровни метаболитов в среде анализировались двумя различными способами с использованием ЯМР. В одном случае непосредственно сравнивали относительные уровни метаболитов в отработанной среде на 3 сутки

культивирования между эмбрионами с нормальным и замедленным ростом, как в контрольной, так и в группе IDL – эмбрионов. Во втором подходе индекс LI у эмбрионов 3 – х и 5 – х суток культивирования сравнивался с метаболическим профилем отработанной среды для оценки метаболических изменений, вызванных повреждениями ДНК.

Поглощения аланина ($p < 0,01$), валина ($p < 0,05$), изолейцина ($p < 0,05$) и тимины ($p < 0,01$) на 3 сутки культивирования наблюдалось в контрольной группе эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, по сравнению с эмбрионами, замедлившихся в развитии на стадии уплотнения. Значительное поглощение отмечалось только в отношении тимины ($p < 0,05$) между нормально и замедленно развивающимися эмбрионами на 3 сутки. Эти наблюдения показывают, что уровень метаболической активности связан со стадией развития эмбрионов. Затем стабильно развивающиеся эмбрионы и эмбрионы с замедленным ростом были дополнительно культивированы до 5-х суток. Относительные уровни валина ($p < 0,05$) и тимины ($p < 0,05$) на 3 сутки были значительно выше у эмбрионов, которые развивались стабильно, по сравнению с задержавшимися в развитии эмбрионами. Кроме того, вылупляющиеся на 5 сутки культивирования бластоцисты демонстрировали увеличение поглощения тимины ($p < 0,01$) на 3 сутки. Интересно отметить, что интенсивность расщепления тимины ($p < 0,05$), пролина ($p < 0,05$) и лизина ($p < 0,01$) была значительно ниже в группе IDL – эмбрионов, несущих ДНК-повреждения. Эти наблюдения показывают, что метаболомика может предсказать эмбриональный апоптоз неинвазивно.

Корреляцию между морфокинетическими параметрами и метаболизмом аминокислот у эмбрионов человека попытались выявить ученые из Чехии под руководством Drabkova P. [178]. Было проанализировано 48 образцов сред культивирования эмбрионов 3 – х суток: группа из 14 образцов остановившихся в развитии эмбрионов и группа из 34 образца нормально развивающихся эмбрионов. Морфокинетические показатели фиксировались с использованием микроскопа TLI, измерение изменения аминокислотного состава производилось с помощью хроматографического метода. Статистически значимые различия в

концентрации аминокислот в культуральных средах до и после инкубации наблюдались в обеих группах. Было обнаружено, что концентрации только двух аминокислот (аспартат и аспарагин) в группе развивающихся эмбрионов изменились статистически несущественно, тогда как концентрации аспартата, аспарагина, серина, глицина, таурина не изменились в группе эмбрионов, остановившихся в развитии на стадии 8 – ми клеток.

В конце инкубационного периода были зафиксированы высокие уровни концентрации аргинина в обеих исследуемых группах соответственно (8,9 мкмоль / л и 8,1 мкмоль / л), затем лейцина (6,1 мкмоль / л и 5,2 мкмоль / л), треонина (5,5 мкмоль / л и 5,2 мкмоль / л), валина (5,4 мкмоль / л и 5,5 мкмоль / л), изолейцина (5,3 мкмоль / л и 4,7 мкмоль / л), гистидина (3,8 мкмоль / л и 2,9 мкмоль / л), тирозина (2,9 мкмоль / л и 2,7 мкмоль / л), фенилаланина (3,4 мкмоль / л и 2,6 мкмоль / л), триптофана (1,5 мкмоль / л и 1,4 мкмоль / л). Подавляющее большинство аминокислот было высвобождено в культуральную среду, а не потреблялись из нее. Необходимо подчеркнуть и случаи, когда в образцах были идентифицированы новые аминокислоты, которые не были включены в известный состав коммерческой культуральной среды.

Общее количество производимых и потребляемых аминокислот была выше в культуральных средах нормально развивающихся эмбрионов (84,5 пмоль / эмбрион / час) по сравнению с группой остановившихся в развитии (59,1 пмоль / эмбрион / час). Однако, и эти результаты были статистически незначимыми, поскольку для развивающихся эмбрионов стандартное отклонение (Standard deviation, SD) составило 86,9 пмоль / эмбрион / час и стандартная ошибка среднего (Standard error of the mean, SEM) 14,9 пмоль / эмбрион / час. Для эмбрионов, остановившихся в развитии, величины составили SD 47,7 пмоль / эмбрион / час и SEM 12,7 пмоль / эмбрион / час.

Корреляцию между морфокинетическими параметрами и метаболизмом аминокислот у эмбрионов человека авторы представили в виде упрощенной схемы (рисунок б), где область данных «а» для развивающихся эмбрионов, «б»

для остановившихся в развитии эмбрионов, степень корреляции представлена символом «*», положительная корреляция «+», отрицательная корреляция «-».

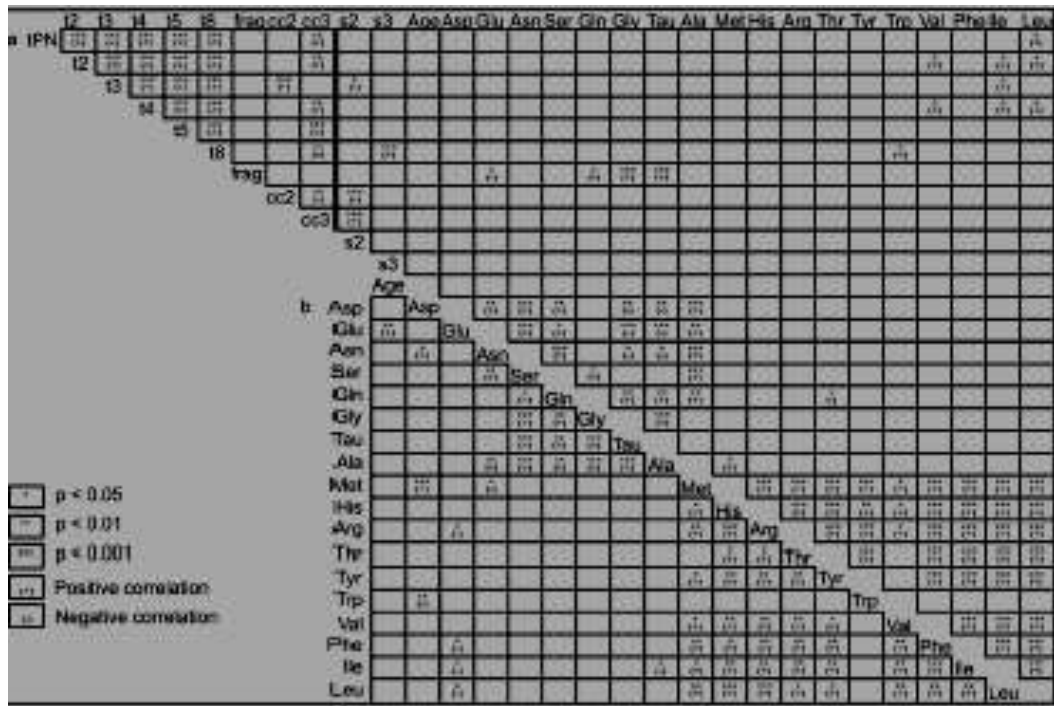


Рисунок 6. Корреляция между морфокинетическими параметрами и метаболизмом аминокислот у эмбрионов человека

Примечателен тот факт, что при исследовании изменения аминокислотного состава отработанных сред культивирования результаты отдельных групп авторов отличаются. Это объясняется не только использованием различных аналитических методов и методологией при подготовке проб, но и составами коммерческих культуральных сред, выбранными эмбриологическими лабораториями.

Gardner D. K. в 1997 году отметил, что присутствие неэссенциальных аминокислот во время инкубации необходимо и способствует делению клеток, а добавление незаменимых аминокислот в свою очередь напротив может оказать ингибирующий эффект. Важно подчеркнуть, что на метаболизм аминокислот эмбрионов влияют и условия инкубации, главным образом, уровень кислорода. Wale P.L. и Gardner D. K. [179] наблюдали, что в условиях культивирования при 20 % насыщения кислородом скорость метаболизма аминокислот эмбрионов мыши отличаются от скорости метаболизма при 5% насыщении кислородом. Уровни аланина и глутамина увеличились после инкубации в культуральных

средах всех эмбрионов, независимо от стадии развития. Возможно, более высокие уровни этих аминокислот связаны с накоплением аммиака, но эмбрионы, для предотвращения этого, используют пируват для превращения в аланин.

Pudakalakatt S. и соавторы [176] показали, что в средах культивирования успешно имплантировавшихся эмбрионов более высокий уровень аланина и низкий коэффициент пируват/аланин в культуральной среде, но Houghton F. в своей работе обнаружил, что статистически значимые высокие уровни концентрации аланина были на 2 – 3 сутки развития у эмбрионов, остановившихся в развитии до стадии бластоцисты.

Отбор эмбрионов по морфологическим критериям для переноса в полость матки или для криоконсервации является самым распространенным методом, но очень субъективным. По этой причине неинвазивное изучение метаболизма аминокислот эмбрионов в отработанных средах культивирования может стать одним из альтернативных или дополнительных способом. 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 метаболизм аминокислот как критерий пригодности эмбриона для селективного переноса в полость матки с последующим развитием беременности и требует дальнейшего изучения.

1.4.3. Белковые биомаркеры сред культивирования эмбрионов

Так же представляется целесообразным изучение белковых молекул во время эмбрионального развития, так как большинство биологических функций организма выполняют белки. Клиническая протеомика позволяет провести поиск биомаркеров по профилям белков, которые помогут диагностировать патологические состояния человека. Применение молекулярного подхода в лечении бесплодия позволит улучшить возможности диагностики, прогнозирования результата, разработать стратегии для выбора лучших гамет и эмбрионов.

В 2008 году проведено исследование, в ходе которого применялись аналитические микрочипы, содержащие более ста антител молекул белков, потребляемых или секретированных бластоцистами человека. Dominguez F. и соавторы в образцах сред культивирования бластоцист зафиксировали значительное снижение концентрации CXCL13 (хемоаттрактант В-лимфоцитов), SCF (фактор роста стволовых клеток), TRAILR3 (цитокин семейства факторов некроза опухоли), MIP-1b (макрофагальный воспалительный белок-1b) и MSP-a (белок, стимулирующий макрофаги) по сравнению с образцами сред, культивирование в которых не производилось. Напротив, показатели концентрации фактора некроза опухоли-1 (ФНО-Ф) и интерлейкина-10 (IL-10) значительно увеличились в данных образцах сред. При анализе сред культивирования эмбрионов с различными исходами после переноса в полость матки определено, что CXCL13 и GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) содержатся в меньших концентрациях в средах имплантировавшихся эмбрионов [9, 101].

В недавнем исследовании Seidler E. проводилась оценка отработанных сред культивирования для измерения содержания про- и противовоспалительного интерлейкина-6 (IL-6), а затем данные сопоставлялись с данными об имплантации. Было обнаружено, что среды культивирования от 71 неимплантировавшейся бластоцисты, имели существенное различие по сравнению со средами культивирования 60 имплантировавшихся эмбрионов (среднее значение + стандартное отклонение) [104]. Совсем недавно экспериментальная группа Cortezzi S. [183] определила 15 белков, находящихся в средах культивирования эмбрионов с положительной имплантацией.

О том, что содержание интерлейкина – 8 (IL-8), одного из основных провоспалительных хемокинов, может быть независимым предиктором эффективности программы ЭКО, заявляет Guanyou Huang. Результаты его исследования показали, что у группы пациентов с перенесенными эмбрионами с «положительным результатом на ИЛ-8» (положительная группа IL-8) в средах культивирования, частота имплантации, развития клинической беременности и

живорождение был выше, чем у пациентов с «отрицательной средой для ИЛ-8» (ИЛ-8 отрицательная группа), т.е. для групп без содержания ИЛ-8 в средах культивирования. При получении эмбрионов равного качества частота развития клинической беременности была выше в группе с содержанием ИЛ-8 в средах культивирования [105].

Противоречивые данные представлены о наличии в культуральных средах эмбрионов лейкоцитарного антигена человека (HLA-G) и его ассоциации с морфологическим качеством, а так же успешным родоразрешением [9, 110]. В ином многоцентровом исследовании, напротив, значимая связь между успешной имплантацией и содержанием HLA-G в средах культивирования эмбрионов не была установлена [9, 111].

В свою очередь Kotze D. с соавторами в 2010 году так же не установили связи между уровнем HLA-G и успешной имплантацией, но частота прерывания беременности в первом триместре была значительно ниже при отборе эмбриона по уровню HLA-G и морфологическим критериям по сравнению только с морфологическим отбором [9, 111].

Группой ученых из Китая был проведен масштабный анализ десяти проспективных и пяти ретроспективных исследований, включающих 6170 случаев, по определению присутствия HLA-G в культуральной среде для предсказания клинических исходов при лечении в программах ЭКО. Значительно более высокая частота имплантации и развития клинической беременности были характерны для отработанных эмбриональных сред, содержащих HLA-G. Частоту развития многоплодной беременности и прерывания беременности по данному маркеру предсказать не удалось. Однако, авторы работы подчеркивают необходимость дальнейших клинических исследований с использованием более точного метода определения HLA-G, а так же исследований, направленных на изучение физиологических и молекулярных механизмов положительного эффекта HLA-G на ранние этапы эмбрионального развития и дальнейшей успешной имплантации.

Масс-спектрометрическое исследование сред культивирования Mandy G. Katz-Jaffe говорит об уникальном секретном профиле для каждого последующий этапа эмбрионального развития. Предположительно, убиквитин, вещество с массой 8,5 кДа, содержится в высоких концентрациях в средах культивирования активно развивающихся бластоцист, а в образцах дегенеративных эмбрионов отсутствует, что несомненно указывает на связь данного биомаркера с имплантационным потенциалом [9, 106].

Gonzalez R.R. с соавторами, изучая процессы имплантации и взаимодействия между эмбрионом и внутриматочным эпителием, в средах культивирования бластоцист определил пептид лептин (молекулярная масса 16-кДа) [107]. Существует мнение, что лептин в период «окна имплантации» участвует в инициации и установке молекулярных связей с его рецепторами в эндометрии, а эмбрионы человека на стадии бластоцисты производят лептин в более высоких концентрациях [9, 108, 109].

Неинвазивный анализ секретируемых веществ не только расширит уже имеющиеся данные о физиологии эмбрионов разных этапов развития, но и станет основой для разработки принципиально нового метода определения жизнеспособности эмбрионов. Вышеперечисленные исследования проводились на образцах отработанных культуральных среды эмбрионов, после переноса которых беременность наступила или нет [114, 115, 116], исследовательские технологии включали протонный ядерно-магнитный резонанс, рамановскую спектроскопию и спектрометрию в ближней инфракрасной области (БИК-спектрометрия) [117, 118, 119].

Все технологии показали корреляцию с жизнеспособностью эмбриона, оценивавшейся *in vitro*, с наступлением беременности. После серии первоначальных перспективных исследований такая оценки каждого эмбриона могла быть успешно введена в клиническую практику. Однако, из-за различной чувствительности, представленной линейки приборов в создании единых алгоритмов методологии возникли трудности. Так, например, два исследования, в которых селективный перенос эмбриона осуществлялся на основании показателей

профилирования отработанных эмбриональных культуральных сред, не показали различий в частоте имплантации и наступления клинической беременности [119, 120].

Исследования метаболизма на биологических моделях показывает несомненную значимость маркёров успешной имплантации после переноса эмбрионов. На следующем этапе необходимо рассмотреть характерные особенности метаболизма эмбриона человека, как они влияют на обмен питательных веществ, каким образом эти данные определяют способность эмбриона к успешной имплантации [9, 53].

1.4.4. Специфические микроРНК в культуральных средах как биомаркеры для селективного переноса эмбриона в полость матки

Существенная роль микроРНК в формировании эмбриона была продемонстрирована на животных моделях с мышами, в которых показан уровень их экспрессии, увеличивающийся на стадии бластоцисты [59].

Несомненно, детекция микроРНК культуральных сред необходима для создания уникальных маркеров имплантационного потенциала эмбриона [60]. Однако, несмотря на общеизвестное предположение о секретировании во внеклеточную среду человеческими эмбрионами специфических микроРНК, на основании этих данных до настоящего времени не создан способ прогнозирования успешной имплантации [9].

Малые некодирующие молекулы микроРНК (англ. microRNA, miRNA) представляют собой последовательность из 18—25 нуклеотидов. Данные РНК, обнаруженные у растений, животных и некоторых вирусов, отвечают за транскрипционную и посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов путём РНК-интерференции [9, 61, 62, 63]. Это особый тип сигнальных молекул, которые регулируют экспрессию определенных генов, буквально выступая дирижёром огромного внутриклеточного оркестра.

МикроРНК были открыты Амбросом В., Ли Р. и Фейнбраум Р. в 1993 году, а к настоящему моменту описаны уже тысячи микроРНК человека и других видов,

разработаны различные методы их изучения, созданы онлайн-базы данных последовательностей микроРНК (например, miRBase) [64].

Специфические молекулы идентифицированы во многих биологических жидкостях, например, грудное молоко, амниотическая жидкость, слезы и слюна, спинномозговая, плевральная и перитонеальная жидкости, кровь, сперма и моча. Биологическая роль микроРНК связана с развитием, ростом и дифференцировкой клеток [9]. Кроме того, отличительная экспрессия отдельных молекул напрямую связана с развитием онкозаболеваний, сахарного диабета, а также бесплодием [65, 66, 67]. Кроме того, продемонстрирована биологическая роль микроРНК в регуляции функции яичников [68], заключающаяся в интенсивном обмене микроРНК между клетками ооцита и гранулезы [69]. Изменение экспрессии микроРНК описано у пациентов с дисфункцией яичников: с синдром поликистозных яичников [70,71], преждевременной недостаточностью яичников [72], «бедным» ответом на стимуляцию [73].

Проводимые исследования лишней раз подчеркивают заметный интерес к поиску ранних биомаркеров заболеваний на основании определения микроРНК в биологических жидкостях. Не менее важно и полное понимание роли микроРНК в биологии раннего развития эмбриона человека [74]. В доступных публикациях сообщается об обнаружении в средах культивирования эмбрионов специфических микроРНК, имеющих взаимосвязь со способом оплодотворения (ЭКО или ИКСИ), генетическим статусом эмбриона и исходом программы ЭКО (живорождение) [9, 76].

McCallie В. в 2010 г. впервые были выявлены специфические микроРНК культивированных бластоцист, полученных от пациенток, обратившихся для лечения в программе ЭКО [75], а к настоящему времени описано более 130 микроРНК, экспрессирующих в бластоцисте человека [74, 75].

В последующих работах McCallie В. и Rosenbluth Е. с соавторами идентифицировали 135 микроРНК, секретлируемых человеческими бластоцистами [60, 67]. Особое внимание обращает тот факт, что 39 из уникальных микроРНК

соответствовали эуплоидным и анеуплоидным эмбрионам, а также были определены 21 микроРНК, определяющих половую принадлежность [9, 60].

Согласно результатам эксперимента Rosenbluth E. hsa-miR-191 определяется в средах культивирования анеуплоидных эмбрионов. В свою очередь, в средах культивирования неимплантировавшихся эмбрионов в высоких концентрациях находились микро-РНК-191, hsa-miR-372 и hsa-miR-645. Кроме того, обнаружено, что концентрация микроРНК в образцах сред 5 суток культивирования развития выше по сравнению с образцами 4 суток культивирования и зависела от метода оплодотворения (ЭКО или ИКСИ) [77].

Нарушение ранних этапов процесса имплантации ведет к бесплодию и повторным безуспешным попыткам лечения в программах ЭКО. Немаловажна и роль бластоцисты в этот период. Показано существенное изменение уровня экспрессии hsa-miR-661 в когорте индивидуальных образцов сред неимплантировавшихся эмбрионов, данные были подтверждены изолированным анализом образцов методом количественной ПЦР в режиме реального времени [9, 78].

Полученные данные повторно демонстрируют, что человеческие бластоцисты выделяют микроРНК, участвующие в регуляции процессов имплантации, что может быть использовано для выявления биомаркеров имплантационного потенциала эмбрионов [9].

В результате проведенного анализа образцов сред культивирования, собранных от эмбрионов, находящихся на разных этапах преимплантационного развития (стадия дробления, морула, бластоциста), был сделан вывод, что 96,6% микроРНК, обнаруженных в культуральных средах, были секретированы именно клетками трофобласта бластоцист, поскольку молекулярный состав индивидуальных образцов от зигот и морул не продемонстрировал значимых различий.

Профилирование микроРНК сред культивирования эуплоидных имплантировавшихся и неимплантировавшихся бластоцист выявил наличие специфических микроРНК, а существенное повышение экспрессии hsa-miR-20a и

hsa-miR-30c, в свою очередь, напрямую было связано с успешной имплантацией. Полученные профили специфических микроРНК в культуральных средах имплантировавшихся и неимплантировавшихся эуплоидных бластоцист использовались как биомаркеры для селективного переноса эмбриона в полость матки [9, 79].

Исследование, демонстрирующее, что бластоцисты человека выделяют большое количество микроРНК, играющих важную роль в формировании и развитии зародыша, провели Rosenbluth E. и соавторы. Было изучено 754 микроРНК, из них наибольшая концентрация определялась у hsa-miR-372, hsa-miR-720 и hsa-miR-302c [9, 78].

Интересно отметить, что эмбрионами мужского пола hsa-miR-518d-5P выделялась в среду в 5,6 раза больше по сравнению с эмбрионами женского пола, что не исключает некоторую степень половой дифференцировки на стадии бластоцисты. Эти данные можно использовать для раннего прогноза исхода программы ВРТ уже на 5-й день развития [9, 80].

Не менее интересна выраженная экспрессия 11 микроРНК, секретированных бластоцистами молодых женщин, в отличие от бластоцист, полученных в программе ЭКО от пациенток старшего репродуктивного возраста (hsa-miR-15b, hsa-miR-18a, hsa-miR-184, hsa-miR-195, hsa-miR-20b, hsa-miR-212, hsa-miR-222, hsa-miR-367, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-93) [9, 81].

В исследовании Edson Borges Jr., посвященном выявлению микроРНК в средах культивирования эмбрионов *in vitro* и определению их как потенциальных биомаркеров исходов программ ЭКО, был испытан набор реактивов для определения уровня экспрессии семи микроРНК: miR-21, miR-142-3p, miR-19b, miR-92a, miR-20b, miR-125a и miR148a), отобранных авторами согласно данным мировой литературы [82].

В результате эксперимента было показано увеличение экспрессии miR-142-3p в группе пациентов ЭКО (ИКСИ) с неимплантировавшимися эмбрионами. Потенциальная роль miR-142-3p доказана в регуляции биологических процессов и функции клеток, например, ингибировании клеточного цикла и подавлении

опухолей [83, 181], но по результатам исследования роль в раннем развитии эмбриона человека осталась неясна. В экспрессии других микроРНК наблюдались нестатистические различия.

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 [9, 101], а также развитие актуальных неинвазивных методов оценки жизнеспособности эмбрионов человека в программах ЭКО [102].

Вспомогательные репродуктивные технологии помогают преодолеть бесплодие, но их эффективность достигла определенного предела. Возможно, это связано с недостаточной изученностью молекулярной физиологии половых клеток, эмбрионов, эндометрия, что делает необходимым максимальное изучение причин неудач для исключения повторяющегося лечения без знания принципиальных причин [121, 122]. Ключевым моментом в успешном лечении является правильная оценка половых клеток, качества эмбрионов и эндометрия, но анализ полученного биологического материала в основном базируется на морфологических характеристиках. В этой связи возникает острая необходимость во введении новых диагностических и терапевтических инструментов.

В настоящее время морфологическая оценка эмбриона дополнена еще и морфокинетическими критериями, в широкой клинической практике используется технология ПГТ, позволяющая производить перенос эуплоидного эмбриона в полость матки. Нельзя не отметить перспективность этой методики, но измерение биологических молекул в отработанных средах культивирования позволяет определить эмбрион еще и с наибольшим потенциалом к имплантации и развитию.

Эпигеномика изучает наследственные изменения в экспрессии генов, происходящих без каких-либо изменений в их последовательности, геномика же изучает полный набор генов, отвечающих за экспрессию определенных типов

клеток. Изменения в экспрессии белковых молекул изучает протеомика, а белки, продуцируемые клетками в окружающую среду, и их метаболизм изучает секретомика. Метаболомика одновременно изучает концентрацию метаболитов и их колебание в определенной среде. «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.

Несмотря на это, данные подходы требуют дополнительного изучения и оптимизации для использования в клинической практике врача и эмбриолога. Одним из перспективных направлений, благоприятно влияющих на результативность лечения в программе ЭКО, является неинвазивное изучение отработанных сред культивирования эмбрионов.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

В соответствии с целью исследования и поставленными для ее решения задачами на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Леонова Б.В. (заведующий отделением – д.м.н., профессор Калинина Е.А.) и лаборатории молекулярной патофизиологии (заведующий лабораторией – к.х.н. Бобров М.Ю.) федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН Сухих Г.Т.), в период с сентября 2015 г. по декабрь 2017 г. осуществлялся набор пациенток.

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 ≤ 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.

В исследование всего было включено 96 супружеских пар, прошедших лечение в программе ЭКО/ИКСИ с проведением преимплантационного генетического тестирования, прошедшие предварительное обследование, строго соответствующие критериям включения/исключения. Исследование было одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НМИЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (протокол № 2 от 25.02.2016).

2.2. Дизайн исследования

Были изучены образцы отработанных сред культивирования эмбрионов от 96 пациенток, обратившихся для проведения программы ЭКО (ИКСИ) и ПГТ. Дизайн исследований представлен на рисунке 7.

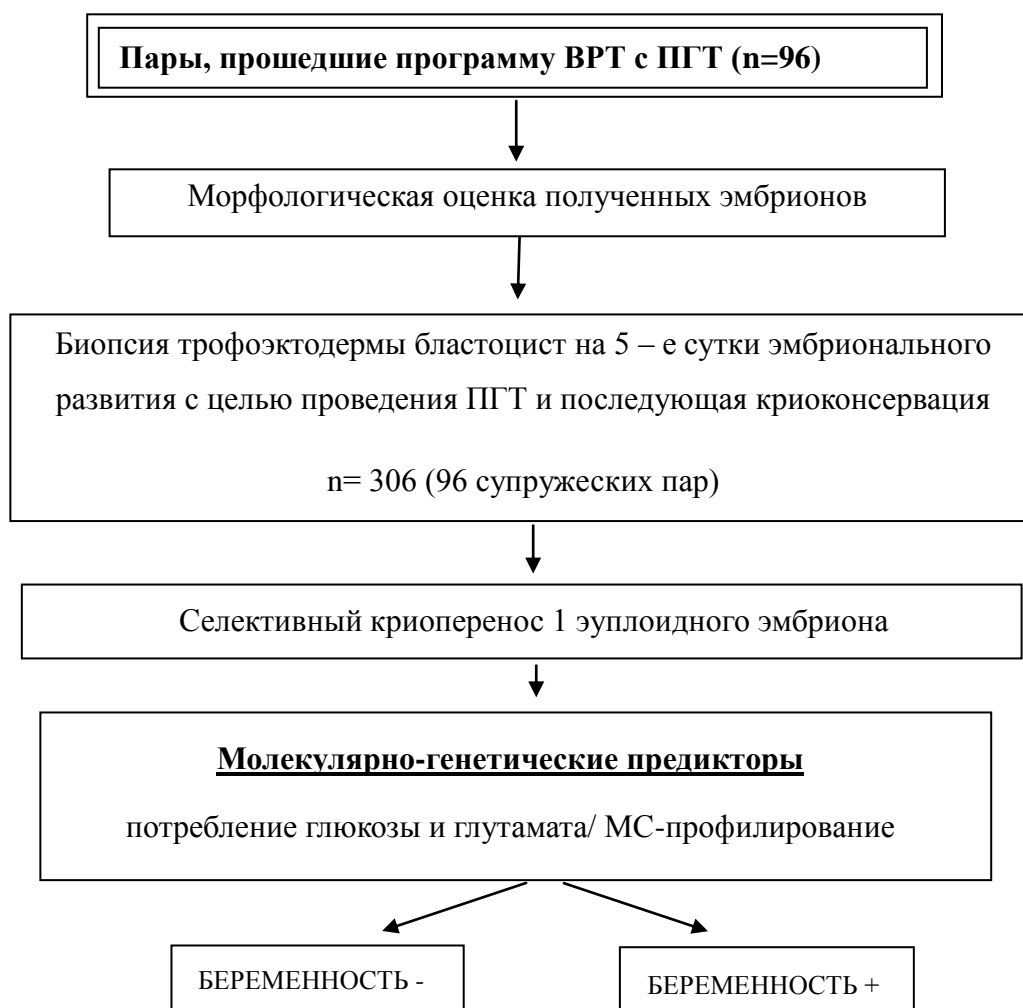


Рисунок 7. Дизайн исследования

В соответствии с классификацией D. Gardner на 5-е сутки культивирования оценивается степень экспансии бластоцисты, параметры внутриклеточной массы и трофэктодермы [16]:

Степень экспансии бластоцисты:

- 1** – ранняя бластоциста, бластоцель менее 50% объема эмбриона;
- 2** – бластоцель 50% и более объема эмбриона;
- 3** – полная бластоциста, бластоцель полностью заполняет эмбрион, блестящая оболочка не истончена;
- 4** – экспандированная бластоциста, блестящая оболочка истончена;
- 5** – вылупляющаяся бластоциста, трофэктодерма выходит через блестящую оболочку (хетчинг);

6 – вылупившаяся бластоциста, полностью освобождена от оболочки, готова к имплантации.

Внутриклеточная масса:

- **A** – большое количество клеток, упакованы плотно.
- **B** – среднее количество клеток, упакованы менее компактно;
- **C** – количество клеток малое.

Трофэктодерма

- **A** – плотный эпителий формируется из большого количества клеток;
- **B** – рыхлый эпителий формируется из незначительное количество клеток;
- **C** – количество клеток малое.

Для определения молекулярно-генетических предикторов качества развивающихся эмбрионов 510 образцов отработанных 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 2).

Таблица 2 - Условное деление эмбрионов по морфологическим группам в исследовании

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

Таким образом, в группу 1 класса («отличное» морфологическое качество) вошли бластоцисты 3АА, 4АА, 5АА, 6АА, 4АВ, 5АВ, 6АВ, 6ВА, в группу 2 класса («хорошее» морфологическое качество) были отнесены бластоцисты 1АА, 2АА, 2АВ, 3АВ, 3ВА, 4ВА, 5ВА, 2ВВ, 3ВВ, 4ВВ, 5ВВ, 6ВВ. Морулы и бластоцисты 1АВ, 1АС, 2АС, 3АС, 4АС, 5АС, 6АС, 1ВА, 2ВА, 1ВВ, 1ВС, 2ВС, 3ВС, 4ВС, 5ВС, 6ВС, 1СА, 2СА, 3СА, 4СА, 5СА, 6СА, 1СВ, 2СВ, 3СВ, 4СВ, 5СВ, 6СВ, 1СС, 2СС, 3СС, 4СС, 5СС, 6СС составили 3 класс («удовлетворительное» морфологическое качество). К 4 классу («плохое» морфологическое качество) в данной работе были отнесены эмбрионы, остановившиеся в развитии на ранних стадиях, например, 3а, 5с, а также контрольные питательные среды, в которых культивирования эмбрионов не производилось.

Для изучения потребления глюкозы и глутамата из сред культивирования было изучено 184 образца, из которых I группу составили среды культивирования эмбрионов отличного качества (92 образца), II группу – хорошего качества (48 образцов), III группу – удовлетворительного качества (6 образцов), IV группу составили среды культивирования эмбрионов плохого качества и контрольные образцы сред, в которых культивирование эмбрионов не производилось (38 образцов).

Для изучения профилирования сред культивирования было изучено 326 образцов, из которых I группу составили среды культивирования эмбрионов отличного качества (70 образцов), II группу – хорошего качества (86 образцов), III группу – удовлетворительного качества (40 образцов), IV группу составили среды культивирования эмбрионов плохого качества и контрольные образцы сред, в которых культивирование эмбрионов не производилось (130 образцов).

Дизайн исследований для задач 2 и 3 представлен на рисунке 8.

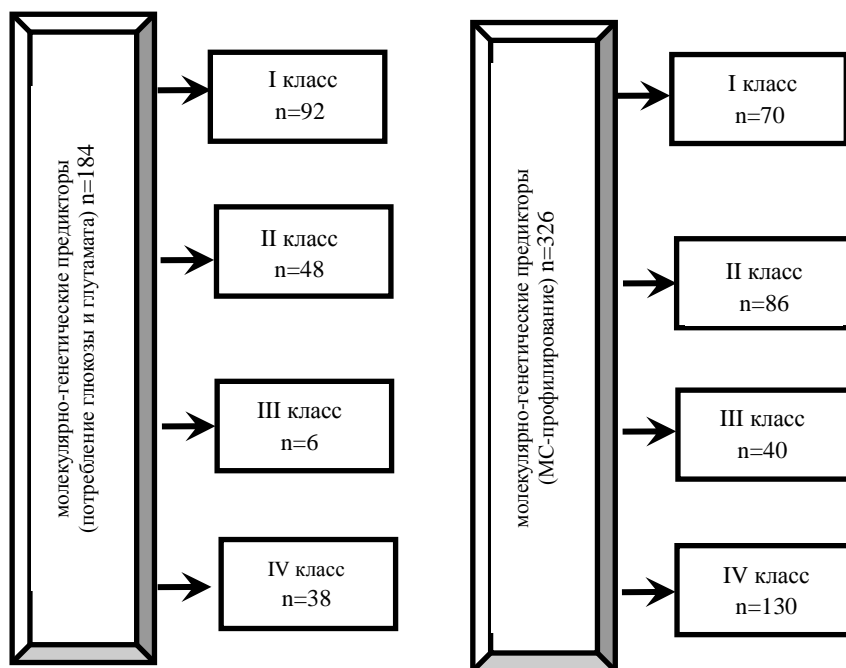


Рисунок 8. Дизайн исследований

Учитывая проведение преимплантационного генетического тестирования, на следующем этапе 130 образцов отработанных сред культивирования эмбрионов различного генетического качества были проанализированы для изучения потребления глюкозы. Все образцы были разделены на 2 группы сравнения в зависимости от хромосомного набора развивающихся в них эмбрионов: I группа – среды культивирования эмбрионов без хромосомных аномалий (эуплоидные эмбрионы) (64 образца), II группа – среды культивирования эмбрионов с хромосомными аномалиями (анеуплоидные эмбрионы) (66 образцов). При этом количество отработанных сред культивирования эмбрионов отличного качества составило 88 образцов, хорошего качества 42 образца.

В исследование по профилированию отработанных сред культивирования было включено 82 образца сред эмбрионов различного генетического качества. Все образцы были так же разделены на 2 группы сравнения в зависимости от хромосомного набора развивающихся в них эмбрионов: I группа – среды культивирования эмбрионов без хромосомных аномалий (эуплоидные эмбрионы)

(44 образца), II группа – среды культивирования эмбрионов с хромосомными аномалиями (анеуплоидные эмбрионы) (38 образцов). При этом количество отработанных сред культивирования эмбрионов отличного качества составило 38 образцов, хорошего и удовлетворительного качества 38 образцов и 6 образцов соответственно. Дизайн исследований представлен на рисунке 9.

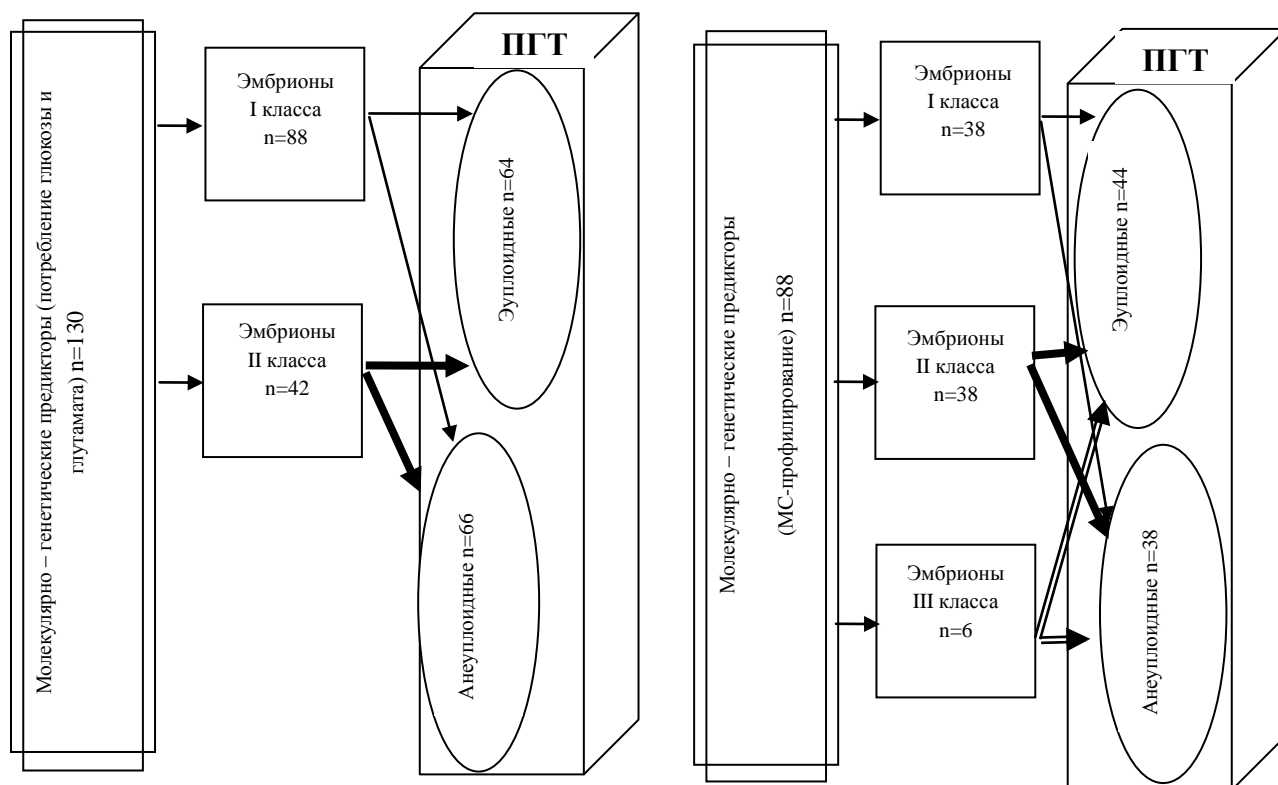


Рисунок 9. Дизайн исследования

Для определения влияния исследуемых показателей у эмбрионов 5 суток развития на исходы программ ВРТ (имплантацию) среды культивирования были разделены на группы сравнения в зависимости от результата лечения: I группа – 12 образцов отработанных сред культивирования эмбрионов, после переноса которых беременность наступила, II группа – 12 образцов отработанных сред культивирования эмбрионов, после переноса которых беременность не наступила, при изучении корреляции уровней потребления глюкозы.

При проведении профилирования отработанных сред культивирования образцы были разделены на группы сравнения в зависимости от результата лечения: I группа – 24 образца отработанных сред культивирования эмбрионов, после переноса которых беременность наступила, II группа – 26 образцов отработанных сред культивирования эмбрионов, после переноса которых беременность не наступила. Дизайн исследований представлен на рисунке 10.



Рисунок 10. Дизайн исследования

2.3. Методы исследования

Перед началом лечения бесплодия с применением методов ВРТ в амбулаторных условиях по месту жительства и/или в ФГБУ «НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ было проведено предварительное клиничко-лабораторное обследование супружеских пар в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 107н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению" от 23 августа 2012 г.

Для обоих супругов обязательными были исследования:

- 1) по определению антител класса G, M к вирусу иммунодефицита человека 1, 2 (ВИЧ 1,2), к антигену вирусного гепатита В и С (HBs-Ag, HCV) и суммарных антител к бледной трепонеме в крови (RW);

- 2) микроскопическое исследование отделяемого на определение микрофлоры мочеполовых органов и морфологического типа бактерий, количество и соотношение лейкоцитов и эпителия, а также на выявление специфических возбудителей рода *Candida*, трихомонад, гонококков;
- 3) исследование соскобов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на обнаружение вируса простого герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловируса и вируса папилломы человека (ВПЧ) 16,18 типов, хламидий, микоплазмы и уреаплазмы;
- 4) кариотипирование и проведение медико-генетического консультирования пары.

Для женщины обязательными были исследования:

- 1) проведение кольпоскопии и цитологического исследования соскоба эндо- и экзоцервикса;
- 2) бактериологический посев с определением чувствительности к антибиотикам отделяемого влагалища, уретры и цервикального канала;
- 3) гормональный статус: на 2-3 д.м.ц. измерялся уровень антимюллерова гормона (АМГ); фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), эстрадиола (Е2), пролактина (ПРЛ), свободного тестостерона (Тсв), дигидроэпиандростерона сульфата (ДГЭА-С), кортизола (К), тиреотропный гормона (ТТГ), свободного тироксина (Т4св), соматотропного гормона (СТГ), 17-оксипрогестерона (17-ОП), на 20-22 д.м.ц. измерялся уровень прогестерона (П);
- 4) молекулярно-биологическое исследование по определению в крови антител класса G и M к вирусу краснухи, токсоплазмы, цитомегаловирусу, вирусу простого герпеса 1 и 2 типов;
- 5) консультация врача-эндокринолога при обнаружении эндокринных нарушений, проведение ультразвукового исследования щитовидной железы и паращитовидных желез, почек и надпочечников;
- 6) клинический анализ крови;
- 7) биохимический анализ крови;

- 8) гемостазиограмма;
- 9) определение группы крови и резус-фактора;
- 10) общий анализ мочи;
- 11) заключение терапевта об отсутствии противопоказаний к проведению стимуляции суперовуляции, вынашиванию беременности и родам;
- 12) рентгенофлюорография;
- 13) электрокардиограмма (ЭКГ) покоя;
- 14) УЗИ молочных желез в возрасте до 35 лет, маммография в возрасте старше 35 лет или при выявлении патологии по данным УЗ-исследования;
- 15) УЗ-исследование органов малого таза на 5-8 день менструального цикла.

Для мужчины обязательным был:

- 16) анализ эякулята по нормативам ВОЗ, 2010 г.

2.3.1. Общеклинические методы исследования

Проведен сбор данных анамнеза с изучением наследственности, аллергоанамнеза, информации об инфекционных и соматических настоящих и перенесенных заболеваниях, сведений об оперативных вмешательствах по поводу экстрагенитальной патологии.

Проведен анализ менструального цикла (возраст менархе, характер менструаций, их болезненность и интенсивность, регулярность и продолжительность менструального цикла, «мажущие» выделения до и после менструации).

Оценена половая функция (дебют половой жизни, количество половых партнеров/браков, регулярность половой жизни, методы контрацепции). Проведен сбор данных о заболеваниях репродуктивной системы, их характере и клиническом течении, примененных лечебных методах на основании медицинской документации, предоставляющей полную информацию об объеме произведенных операций, особенностях послеоперационного периода и результатах гистологического исследования.

Изучены данные о состоянии репродуктивной функции женщины и мужчины (количество, исходы и осложнения беременностей, в каком браке и с каким партнером они наступили, количество, исходы и осложнения родов и послеродового периода, количество, развитие и здоровье детей).

Проанализированы данные о длительности и причинах бесплодия, проведенных методах лечения и программах ВРТ (организации и дата проведения процедуры, схема стимуляции суперовуляции, количество и качество, метод оплодотворения, полученных при трансвагинальной пункции ооцитов, применение дополнительных методов селекции сперматозоидов, количество и качество полученных эмбрионов, количество эмбрионов, перенесенных в матку, факт криоконсервации эмбрионов, исход программы). Уточнялись данные о проведении преимплантационного генетического тестирования полученных эмбрионов в предыдущих циклах лечения, анализировались результаты исследования.

Проведена оценка состояния органов и систем для выявления противопоказаний для проведения стимуляции суперовуляции. Уточнялись данные о привычном образе жизни, наличии вредных привычек, условиях труда и быта.

При подготовке к проведению программы ЭКО проводился расчет индекса массы тела (ИМТ (Формула Кетле) = $\text{масса тела} / \text{рост}^2$ (кг/м²)).

При гинекологическом осмотре проводилась оценка развития наружных половых органов, возможных анатомических особенностей. При бимануальном влагалищном исследовании органов малого таза оценивались размер, форма, подвижность матки и консистенция, вероятность болезненности при пальпации, признаки спаечного процесса и образований в области придатков матки.

2.3.2. Гормональное исследование

С целью анализа гормонального фона женщины перед вступлением в программу ЭКО/ИКСИ производилась оценка концентрации следующих гормонов в плазме крови: на 3-5 день менструального цикла (д.м.ц.) ФСГ, ЛГ, АМГ, Е2,

ПРЛ, К, Тсв, ДЭА-С, ТТГ, Т4св, СТГ, 17-ОП, на 20-22-й д.м.ц. концентрацию П. Нормативные показатели концентрации гормонов в плазме крови у женщин репродуктивного возраста представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Нормативные показатели концентрации гормонов в плазме крови у женщин репродуктивного возраста

| Наименование показателя | Нормативные показатели |
|---------------------------|------------------------|
| ФСГ | 3,0-10,0 МЕ/л |
| ЛГ | 3,0- 8,0 МЕ/л |
| АМГ | 1,0- 4,5 нг/мл |
| Е ₂ | 150-450 пмоль/л |
| ПРЛ | 120-500 мМЕ/л |
| К | 200-500 нмоль/л |
| Тсв | 1,0-2,5 нмоль/л |
| ДЭА-С | 0,9-11,7 мкмоль/л |
| ТТГ | 1,0-3,0 мМЕ/л |
| Т4св | 10,0-25,0 пмоль/л |
| СТГ | 0,15-13,0 мМЕ/л |
| 17-ОП | 0,3-3,0 нмоль/л |
| П (лютеиновая фаза цикла) | 16-95 нмоль/л |

2.3.3. Ультразвуковое исследование органов малого таза

На 5-7 д.м.ц. пациенткам, обратившимся для лечения в программе ВРТ, проводилось ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза, исключающее вероятные противопоказаний для начала проведения лечения. Исследование проводилось с использованием одноразового презерватива для обеспечения стерильности при полном опорожнении мочевого пузыря на ультразвуковом аппарате компании «Brulle Kierre» (Siemens, Германия) с частотой трансвагинального датчика 7,5 МГц.

Оценивалось положение, форма и размеры тела матки, однородность структуры миометрия, состояние полости матки, толщина и структура эндометрия, эхоструктура яичников, их объем, положение и возможность доступа, состояние фолликулярного аппарата. Также производилась диагностика

внутриматочных патологий и объемных образований в малом тазу, степень выраженности спаечного процесса.

Кратность УЗ-мониторинга зависела от выбранной схемы стимуляции функции яичников. Первое исследование органов малого таза осуществлялось в день планируемого начала лечения на 2-5 д.м.ц., что определялось выраженностью фолликулярного аппарата пациентки. На 5-6 день стимуляции функции яичников под УЗ-контролем оценивалась динамика фолликулогенеза и роста эндометрия для внесения корректировки в дозирование вводимого препарата, назначения даты введения препарата ант-ГнРГ. Далее визуальная оценка проводилась однократно в 2-3 дня для УЗ-контроля динамики роста эндометрия, фолликулов и определения даты введения препарата хорионического гонадотропина (ХГ) в овуляторной дозе.

2.3.4. Спермиологическое исследование эякулята

Спермиологическое исследование эякулята проводилось дважды: при предварительном обследовании в рамках подготовки к программе ЭКО/ИКСИ и в день трансвагинальной пункции яичников (ТВП). Перед проведением исследования пациенты соблюдали предписанные рекомендации (режим полового воздержания в течение 3-5 дней, исключение спиртных напитков и перегреваний (баня, сауна, горячая ванна). Сбор материала производился в стерильный пластмассовый контейнер. Оценка параметров эякулята производилась в соответствии с нормативами ВОЗ от 2010 г. (табл. 4) по количеству эякулята, его цвету, консистенции, рН, количеству сперматозоидов в 1 мл и их общему количеству в эякуляте, характеру их подвижности, наличию незрелых половых клеток и патологических форм.

Нормативы спермограммы (ВОЗ, 2010)

| Показатель | Норматив, единицы измерения |
|---|--|
| Общий объем эякулята | $\geq 1,5$ мл |
| РН | $\geq 7,2$ |
| Концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята | ≥ 15 млн/мл |
| Общее количество сперматозоидов | ≥ 39 млн |
| Время разжижения | 10-60 минут |
| Подвижность сперматозоидов | |
| Общая подвижность сперматозоидов (А+В) | $\geq 40\%$ |
| Сперматозоиды с прогрессивным движением (А) | $\geq 32\%$ |
| Морфология | $\geq 4\%$ нормальных форм |
| Жизнеспособность сперматозоидов | $\geq 58\%$ живых сперматозоидов |
| Концентрация лейкоцитов | < 1 млн/мл |
| Агглютинация | отсутствует |
| Эритроциты | отсутствуют |
| Слизь | Небольшое количество |
| Амилоидные тельца | отсутствуют |
| Антиспермальные антитела (MAR- тест) | $< 50\%$ сперматозоидов, ассоциированных с антиспермальными антителами |

Критериями ВОЗ 2010 г. определены следующие патологии эякулята:

- аспермия – отсутствие эякулята;
- азооспермия – отсутствие сперматозоидов в эякуляте;
- олигозооспермия – снижение концентрации сперматозоидов ниже нормативного значения (общая подвижность $< 40\%$, сперматозоиды с прогрессивным движением $< 32\%$);
- тератозооспермия – повышение количества сперматозоидов с аномальной морфологией ($> 96\%$);
- олигоастенотератозооспермия – сочетание трех видов патозооспермии;
- астенотератозооспермия, олиготератозооспермия, олигоастенозооспермия – сочетание двух видов патозооспермии.

2.3.5. Специальные методы исследования

Культивирование эмбрионов производилось в индивидуальных каплях сред культивирования (CSC Irvine) одинакового объема (30 мкл). На 5 сутки

культивирования производилась морфологическая оценка полученных эмбрионов и биопсия трофобластической оболочки бластоцисты для проведения ПГТ, после чего эмбрионы были криоконсервированы. Образцы индивидуальных отработанных сред культивирования были отобраны в равных объемах для исследуемых групп, промаркированы и заморожены (-80°C).

Анализ отработанных сред культивирования производился в лаборатории молекулярной патофизиологии ФГБУ «НМИЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель лаборатории – к.х.н. Бобров М.Ю.).

Анализ параметров потребления компонентов культуральных сред эмбрионами пятых суток культивирования

Определение потребления питательных компонентов из сред культивирования проводилось на флуориметре Qubit 3.0 (Life technologies) в соответствии с инструкцией производителя коммерческих наборов реактивов Amplex Red Glucose Assay kit и Amplex Red glutamic Acid Assay kit (Molecular Probes Life technologies).

Принцип метода основан на сопряжении двух ферментативных реакций: окисления глюкозы ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) глюкозооксидазой с эквимольным образованием одного из продуктов – перекиси водорода (H_2O_2), которая, в свою очередь, используется ферментом пероксидазой для превращения реагента AmplexRed (10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин) во флуоресцирующее производное резорурфин. Соотношение образующегося резорурфина и перекиси равно 1:1. Таким образом, снижение флуоресценции резорурфина соответствует снижению концентрации глюкозы в исследуемом образце.

Оценка масс-спектрометрического профилирования культуральных сред эмбрионов пятых суток культивирования

При проведении высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс – спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) предварительно осуществлялась экстракция метаболитов путем добавления трех объемов

метанола (CH₃OH) к одному объему инкубационной среды. После перемешивания преципитат осаждали центрифугированием при 14000g, надосадок в дальнейшем использовали для анализа.

Далее в хроматографические флаконы со стеклянными вставками отбиралось 20 мкл экстракта каждого образца. Разделение проб проводилось на колонке Zorbax SB C18 (Agilent, USA) при помощи хроматографической системы Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Scientific, USA).

Элюирование компонентов образцов проводилось в градиенте подвижной фазы «В» 5-35 % в течение 20 минут при скорости потока 20 мкл/мин. Для промывки и уравнивания колонки концентрацию раствора «В» довели до 99 % в течение 5 мин, а затем промывали 5 мин (99 % раствора В) и 5 мин подвижной фазой «А». Общее время хроматографии одного образца составило 35 минут.

Детекция метаболитов проводилась на гибридном масс-спектрометре Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific, USA) в трех измерениях на один образец. Детекция пиков, удаление шумовых сигналов, обработка и анализ данных проводились программным пакетом Progenesis Q1 2.0 (Waters, Milford, США). Обработка и выравнивание масс-спектров были выполнены с параметрами: тип прибора - масс-спектрометр высокого разрешения; минимальная абсолютная интенсивность пика - 600 единиц; минимальная ширина пика – 0,02 минут. В качестве характеристических сигнатур были отобраны однозарядные ионы, достоверно отличающиеся между группами минимум в 2 раза. Достоверность проверялась с помощью теста ANOVA статистическим модулем, входящим в программный пакет, с порогом достоверности $p < 0,05$.

2.3.6. Протокол стимуляции функции яичников

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 (рисунок 11).

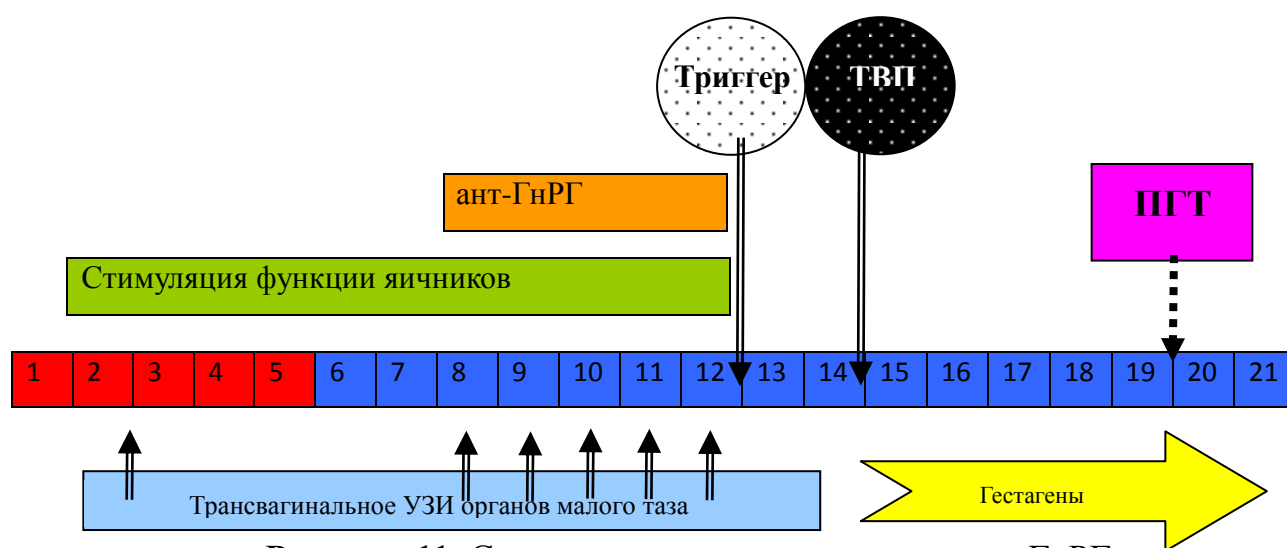


Рисунок 11. Схема применения протокола с антГнРГ

2.3.7. Трансвагинальная пункция яичников

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.

2.3.8. Метод оплодотворения и культивирования дробящихся эмбрионов *in vitro*

Сразу же после аспирации фолликулярной жидкости клиническим эмбриологом осуществлялась идентификация ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) и оценка степени зрелости ооцитов под стереомикроскопом Nikon на нагретой поверхности стерильного ламинарного бокса при поддержании стабильной температуры (+37⁰C) и показателей pH среды (7,5).

Образцы эякулята подвергали седиментационному разделению в градиенте плотности при центрифугировании, отмывали в буфере для гамет (Gamete buffer, СООК, Австралия) и ставили на флотацию.

Метод 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 HEPES, ооцит-кумулюсные комплексы вновь переносились в лунки для преинкубации. В завершении, через 30 минут, механическим путем осуществлялось удаление оставшихся клеток кумулюса.

Этапы ИКСИ:

1. ввод инъекционной пипетки для захвата сперматозоида;
2. выбор сперматозоида и его иммобилизация путем неполного перетирания хвоста сперматозоида о дно чашки Петри;
3. захват выбранного сперматозоида в инъекционную пипетку;
4. фиксация и поворот ооцита инъекционной пипеткой ICSI для расположения полярного тела в позиции 6 или 12 ч;

4. введение сперматозоида с аспирированной ооплазмой в ооцит.

При работе с каждым ооцитом все этапе повторялись. При завершении интрацитоплазматической инъекции оплодотворенные ооциты незамедлительно переносились в культуральную среду.

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.

2.3.9. Преимплантационное генетическое тестирование

На 5-е сутки культивирования после морфологической оценки эмбрионов проводилась биопсия клеточного материала (клеток трофэктодермы). После подготовки биопсированных клеток к генетической диагностике материал отправляли в лабораторию молекулярно-генетических методов исследования (заведующий – д.б.н. Трофимов Д.Ю.) для анализа хромосомных нарушений методом сравнительной геномной гибридизации. После проведения биопсии все эмбрионы витрифицировались.

В соответствии с классификацией D. Gardner на 5-е сутки культивирования оценивается степень экспансии бластоцисты, параметры внутриклеточной массы и трофэктодермы [16]:

Степень экспансии бластоцисты:

- 1** – ранняя бластоциста, бластоцель менее 50% объема эмбриона;
- 2** – бластоцель 50% и более объема эмбриона;
- 3** – полная бластоциста, бластоцель полностью заполняет эмбрион, блестящая оболочка не истончена;
- 4** – экспандированная бластоциста, блестящая оболочка истончена;
- 5** – вылупляющаяся бластоциста, трофэктодерма выходит через блестящую оболочку (хетчинг);

6 – вылупившаяся бластоциста, полностью освобождена от оболочки, готова к имплантации.

Внутриклеточная масса:

- **A** – большое количество клеток, упакованы плотно.
- **B** – среднее количество клеток, упакованы менее компактно;
- **C** – количество клеток малое.

Трофэктодерма

- **A** – плотный эпителий формируется из большого количества клеток;
- **B** – рыхлый эпителий формируется из незначительное количество клеток;
- **C** – количество клеток малое.

Показаниями к проведению ПГТ послужили наличие неэффективных попыток ЭКО и/или привычное невынашивание беременности в анамнезе, а также возраст супругов более 35 лет.

Для проведения исследования полученного генетического материала эмбрионов методом сравнительной геномной гибридизации (CGH) использовалось техническое оборудование компании Agilent (США).

Наборы реагентов для проведения WGA-PCR PicoPlex SingleCell WGA Kit (Rubicon Genomics, США) и для проведения MDA GenetiSure Pre-Screen Amplification and Labeling Kit (Agilent, США) применялись для выполнения полногеномной амплификации ДНК исследуемых клеток.

В процессе амплификации качество, а также количества полученной ДНК контролировалось посредством 1,2% агарозного электрофореза. Предварительно осуществлялось мечение ампликонов по инструкции, приложенной производителем к коммерческому набору SureTag DNA labeling Kit Agilent (США). После нанесения ампликонов на коммерческий биочип Sure Print G3 8x60 aCGH Agilent (США), проводилась 16-часовая гибридизация, отмывание и сканирование биологических чипов на сканере SureScan Microarray Scanner. Для интерпретации полученных результатов использовалась автоматическая платформа Agilent CytoGenomics.

2.3.10. Перенос эмбрионов в полость матки

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.

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 вагинально) 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.

2.3.11. Поддержка лютеиновой фазы

Учитывая отсутствие переноса эмбрионов в лечебном цикле вследствие проведения преимплантационного генетического скрининга через 24 часа после проведения ТВП назначался препарат микронизированного прогестерона в дозе 200 мг/сут. вагинально в течение 10 дней в целях поддержки лютеиновой фазы.

2.3.12. Диагностика наступления беременности

Беременность диагностировалась определением концентрации β -субъединицы ХГ в сыворотке крови через 14 дней после проведения программы переноса криоконсервированных/размороженных эуплоидных эмбрионов в полость матки. УЗ-мониторинг осуществлялся через 21 день после переноса

эмбрионов с целью визуализации плодного яйца, а затем при сроке 5-6 недель беременности с целью определения сердцебиения.

2.3.13. Статистический анализ полученных данных

Снижения вероятности ошибки выборки и информационной ошибки регулировалось строгими критериями отбора пациентов, выполнением лабораторных исследований одними и те же методы диагностики на базе одной лаборатории. Оценка воздействующего фактора и исхода так же была едина для всех пациентов.

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. Методом вариационной статистики для количественных данных определялись: среднее значение, среднеквадратическое отклонение, ошибка среднего, медиана, 95% доверительный интервал. Показатели частоты (%) определяли для качественных данных.

Для каждой исследуемой группы перед проведением сравнительного анализа при помощи критериев Колмогорова-Смирнова или Шапиро-Уилка определялся тип распределения количественных данных по размерам выборки, при помощи построения графиков распределения анализируемых данных. При нормальном типе распределения данных определяли среднее значение со стандартным отклонением. Для сравнения данных применяли методы параметрической статистики: t-тест для анализа данных в группах сравнения. В случае, когда количественные данные не подчинялись закону нормального распределения, применялись медиана и процентиля для описания. Для сравнения данных между группами в 2-х группах применялся тест Манна-Уитни, в трех и более группах применялся тест Краскела-Уоллиса.

Для описания качественных данных использовали частоты и доли, с которыми данные признаки встречались в выборке. Для сравнения качественных показателей и установления значимых различий между ними в 2-х и более

группах использовали тест χ^2 , для вычисления которого прибегали к построению таблиц сопряженности.

Корреляционный анализ с оценкой коэффициента корреляции при нормальном типе распределения данных проводился с использованием параметрического критерия Пирсона, при ненормальном типе распределения с использованием критерия Спирмена.

Для предсказания вероятности наступления анализируемого события создавались математические модели прогноза при помощи метода логистической регрессии с построением уравнения.

Различия при $p < 0,05$ (95% уровень значимости), при $p < 0,01$ (99% уровень значимости) считались статистически значимыми. Отношение шансов (ОШ) приведено с 95% доверительным интервалом (ДИ).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В соответствии с критериями включения/исключения (см. главу 2) было обследовано 96 пациенток, прошедших программу ЭКО/ИКСИ с проведением преимплантационного генетического тестирования по поводу бесплодия неясного генеза, а также обусловленного трубно – перитонеальным фактором, отсутствием овуляции, мужским фактором (при отсутствии выраженной патозооспермии) и сочетанным фактором. После ознакомления с целью и поставленными задачами исследования, всеми пациентками были подписаны информированное согласие.

3.1. Клинико-anamnestическая характеристика включенных в исследование пациенток

С целью минимизации систематической ошибки исследования для выявления возможных конфаундеров и их дальнейшего исключения была изучена клинико-anamnestическая характеристика обследуемых пациенток.

Возрастная характеристика пациенток, включенных в исследование, на момент начала стимуляции в программе ЭКО/ИКСИ и ПГТ представлена в таблице 5.

Таблица 5 -Возрастная характеристика включенных в исследование пациенток

| Показатель | Включенные в исследование пациентки (n=96) |
|---------------|--|
| Возраст, лет* | 35,50 (30 – 40,75) |

*данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля.

Таким образом, средний возраст пациенток, включенных в исследование, составил 35,50 (30 – 40,75) лет.

Все включенные в исследование пациентки имели женский тип телосложения и правильное развитие вторичных половых признаков.

Проведенный анализ **антропометрических данных** выявил, что средний рост пациенток составил 165,00 (161,25 – 168,00) см, вес 58 (53,25 – 64,75) кг, а индекс массы тела (ИМТ), в свою очередь, составил 22 (20 – 23) кг/м² (таблица 6).

Таблица 6 - Антропометрические характеристики пациенток, включенных в исследование

| Показатель | Включенные в исследование пациентки |
|---------------------------|-------------------------------------|
| ИМТ (кг/м ²)* | 22 (20 – 23) |
| Рост (см)* | 165,0 (161,25 – 168,00) |
| Вес (кг)* | 58 (53,25 – 64,75) |
| Общее число пациенток | 96 |

*данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля.

Данные по оценке **менструальной функции** пациенток (возраст менархе, продолжительность цикла, длительность менструальных выделений) представлены в таблице 7.

Таблица 7 -Характеристика менструальной функции включенных в исследование женщин

| Показатель | Включенные в исследование пациентки |
|---|-------------------------------------|
| Возраст менархе (лет)* | 13 (11 – 15) |
| Продолжительность менструального цикла (дней)* | 28 (28 – 30) |
| Продолжительность менструального кровотечения (дней)* | 5 (4 – 5) |
| Болезненные менструации** | 32% (30) |
| Безболезненные менструации** | 68% (66) |
| Интенсивность менструального кровотечения** | |
| Скудная | 3% (3) |
| Умеренная | 80% (77) |
| Обильная | 17 % (16) |
| Общее число пациенток | 96 |

*данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля;

**данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток.

При оценке **основных характеристик менструального цикла** включенных в исследование женщин было выявлено, что у большинства пациенток менархе наступило в 13 лет, самый ранний возраст менархе составил 11 лет, самый поздний – 15 лет. Медиана продолжительности менструального цикла составила 28 дней, а длительности менструального кровотечения – 5 дней, у большинства пациенток были безболезненные менструации (68%) с умеренной интенсивностью выделений (80%).

Данные **репродуктивного анамнеза** оценивались на момент начала проведения программы ЭКО/ИКСИ и представлены в таблице 8. Так, начало половой жизни отмечалось в возрасте 19 (18 – 19) лет.

Таблица 8 - Характеристика бесплодия включенных в исследование пациенток

| Показатель | Включенные в исследование пациентки |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Тип бесплодия* | |
| Первичное | 35,4 % (34) |
| Вторичное | 64,6 % (62) |
| Этиология бесплодия* | |
| Мужской фактор | 48% (46) |
| Трубно – перитонеальный фактор | 23% (22) |
| Отсутствие овуляции | 13% (12) |
| Бесплодие неясного генеза | 8% (8) |
| Сочетанный фактор | 8% (8) |
| Общее число пациенток | 96 |

*данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток.

Анализ данных о **типе бесплодия** у женщин, включенных в исследование, выявил преобладание случаев вторичного бесплодия (64,6%) по сравнению с первичным (35,4%). Результат представлен на рисунке 12.

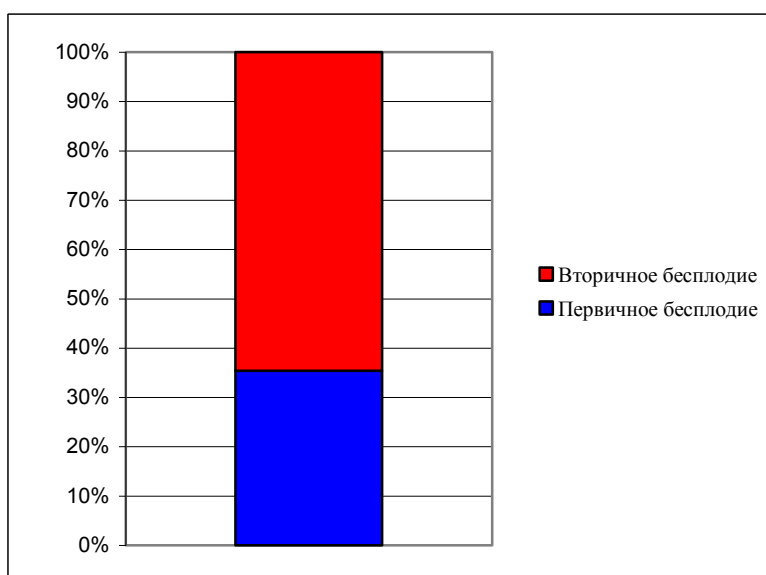


Рисунок 12. Распределение включенных в исследование женщин по типу бесплодия

В структуре представленной **этиологии бесплодия** преобладал мужской фактор, который составил 48%. Трубно – перитонеальный фактор бесплодия

выявлен у 23% женщин. Отсутствие овуляции встречалось у 13% пациенток, включенных в исследование. На долю сочетанного фактора и бесплодия неясного генеза пришлось по 8% (рисунок 13).

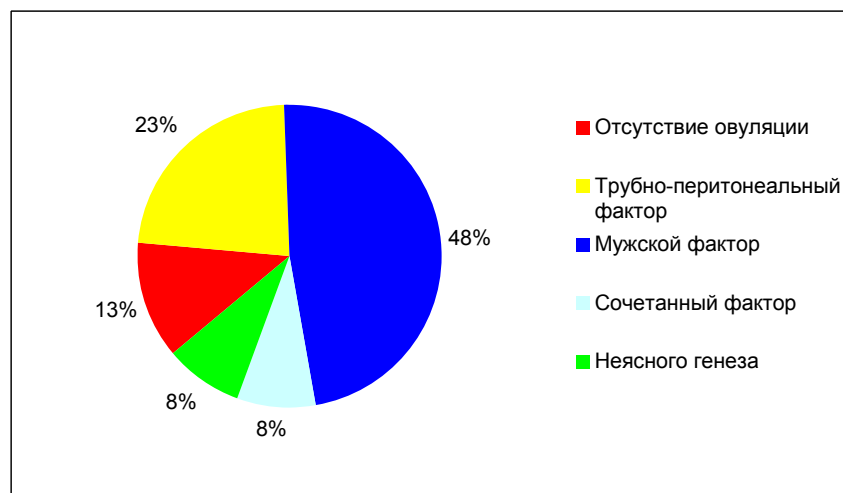


Рисунок 13. Распределение включенных в исследование женщин в зависимости от фактора бесплодия

Анализ репродуктивного анамнеза женщин с вторичным бесплодием (общее число беременностей, искусственных абортов, самопроизвольных выкидышей, неразвивающихся беременностей, преждевременных и своевременных родов) представлен в таблице 9.

Таблица 9 - Акушерский анамнез включенных в исследование женщин

| Показатель | Включенные в исследование пациентки |
|--|-------------------------------------|
| Общее число беременностей | 141 |
| Число попыток ЭКО в анамнезе* | 2 (1 – 3) |
| Общее число своевременных родов** | 29,8% (42) |
| Общее число искусственных прерываний беременностей** | 26,2% (37) |
| Общее число неразвивающихся беременностей** | 27% (38) |
| Общее число внематочных беременностей** | 11,3% (16) |
| Общее число самопроизвольных прерываний беременностей (до 22 недель гестации) ** | 5,7% (8) |

* данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля;

** данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток.

У 62 пациенток с вторичным бесплодием в 29,8 % случаев беременность завершилась своевременными родами, в 26,2 % случаев – аборт на малом сроке беременности, в 5,7 % случаев произошло самопроизвольное прерывание беременностей, в 27 % была диагностирована неразвивающаяся беременность, а внематочная беременность отмечалась в 11,3 % всех случаев беременности (рисунок 14).

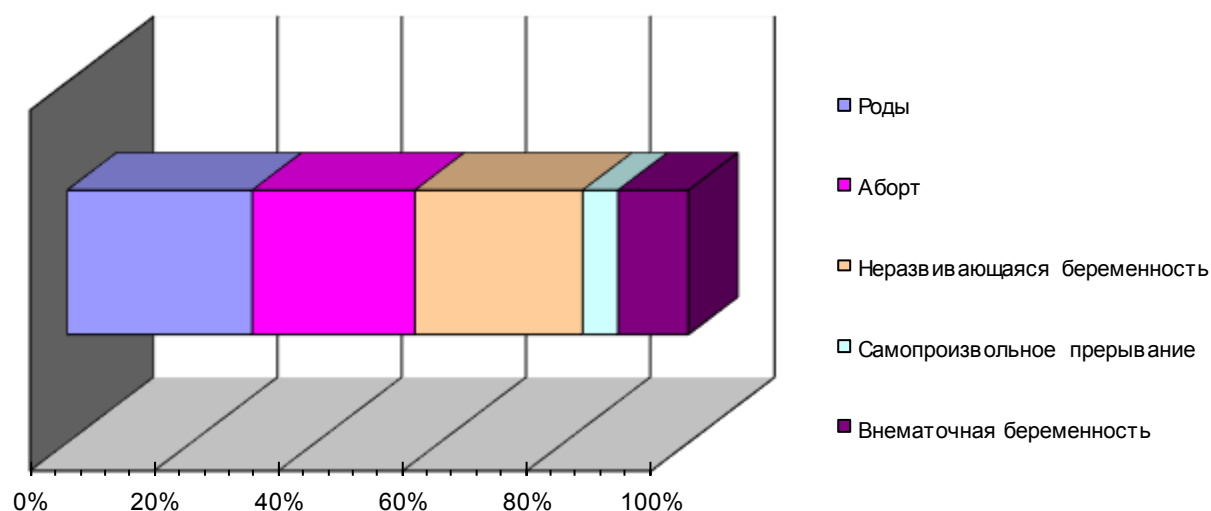


Рисунок 14. Акушерский анамнез женщин с вторичным бесплодием, включенных в исследование

Представленные данные о **перенесенных гинекологических заболеваниях** так же не подчиняются закону нормального распределения. Результат анализа наглядно представлен в таблице 10.

Таблица 10 -Перенесенные гинекологические заболевания включенных в исследование пациенток

| Показатель | Включенные в исследование пациентки |
|--|-------------------------------------|
| Хронический сальпингофорит** | 6,3% (6) |
| Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) 1-2 ст.** | 20,8% (20) |
| Аденомиоз** | 14,6% (14) |
| Миома матки** | 16,7% (16) |
| Полип эндометрия** | 18,8% (18) |
| ИППП** | 16,7% (16) |

** данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток

Оперативные вмешательства на органах малого таза в анамнезе имели 80 из 96 включенных в исследование пациенток (83%). Структура оперативных вмешательств пациенток представлена на рисунке 15.

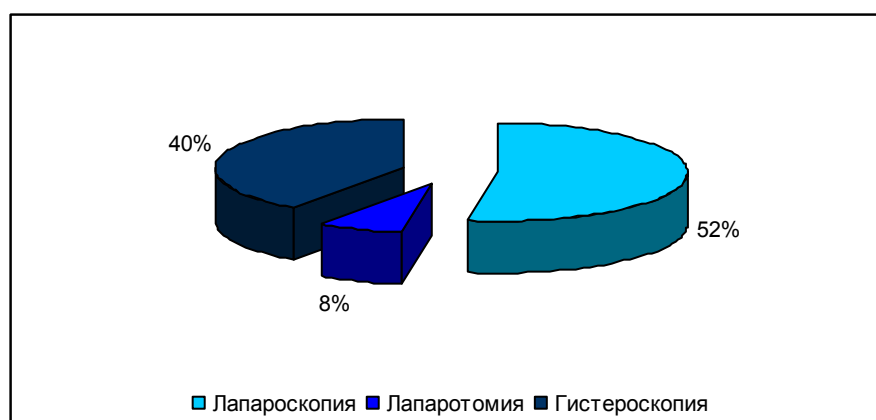


Рисунок 15. Структура оперативных вмешательств на органах малого таза среди пациенток, включенных в исследование

Данные о количестве и характере перенесенных оперативных вмешательств у женщин, включенных в исследование, представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Перенесенные оперативные вмешательства на органах малого таза

| Оперативные вмешательства | Включенные в исследование пациентки |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Диагностическая лапароскопия** | 31,6% (42) |
| Консервативная миомэктомия** | 4,5% (6) |
| Адгезиолизис** | 12% (16) |
| Пластика маточных труб** | 3% (4) |
| Односторонняя тубэктомия** | 9% (12) |
| Двухсторонняя тубэктомия** | 1,5% (2) |
| Гистероскопия, РДВ** | 24,8% (33) |
| Полипэктомия** | 13,5% (18) |
| Общее количество операций | 133 |

** данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток.

Среди **экстрагенитальной патологии** у исследуемых пациенток встречались заболевания желудочно – кишечного тракта (хронический гастрит, ремиссия), мочеполовой системы (хронический пиелонефрит или хронический

цистит, ремиссия), заболевания гепато – билиарной системы (хронический холецистит в стадии ремиссии и желчекаменная болезнь в анамнезе), дыхательной системы (хронический бронхит в стадии ремиссии и пневмония в анамнезе), ЛОР – патологии (хронический тонзиллит, хронический отит, ремиссия).

Также наблюдалась патология щитовидной железы в виде аутоиммунного тиреоидита, медикаментозно скорректированного до начала стимуляции суперовуляции.

3.1.6. Гормональный профиль пациенток, включенных в исследование

В рамках подготовки к лечению в программе ЭКО/ИКСИ для оценки функционального состояния репродуктивной и эндокринной систем всем пациенткам, включенным в исследование, в период ранней фолликулярной фазы (на 3 – 5 дни менструального цикла) была проведена оценка параметров гормонального профиля в одном из циклов, предшествующих стимуляции суперовуляции. (таблица 12).

Таблица 12 - Гормональный статус включенных в исследование женщин

| Показатель | Нормативные показатели | Включенные в исследование пациентки |
|----------------------|------------------------|-------------------------------------|
| ФСГ, МЕ/л | 3,0-10,0 МЕ/л | 6,23 (4,83– 7,5) |
| ЛГ, МЕ/л | 3,0- 8,0 МЕ/л | 4,2 (3,4 – 6,1) |
| Пролактин, мМЕ/л | 120-500 мМЕ/л | 235,5 (125,5– 326,6) |
| E2, пмоль/л | 150-450 пмоль/л | 150 (99,4– 210,5) |
| Тестостерон, нмоль/л | 1,0-2,5 нмоль/л | 0,69 (0,55 – 1,06) |
| Кортизол, нмоль/л | 200-500 нмоль/л | 221 (149,25 – 300) |
| ДЭА – С, мкмоль/л | 0,9-11,7 мкмоль/л | 4,4 (2,13 – 8,79) |
| СТГ, мМЕ/л | 0,15-13,0 мМЕ/л | 1,32 (0,6 – 4,43) |
| ТТГ, мМЕ/л | 1,0-3,0 мМЕ/л | 1,7 (1,16 – 2,25) |
| T4 св., пмоль/л | 10,0-25,0 пмоль/л | 13,32 (12 – 15,6) |
| 17-ОП, нмоль/л | 0,3-3,0 нмоль/л | 2,04 (1,56 – 3,27) |
| АМГ, нмоль/л | 1,0- 4,5 нг/мл | 2,97 (1,6 – 5,12) |
| Прогестерон, нмоль/л | 16-95 нмоль/л | 33,6 (17,45 – 45,53) |

*данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля

На основании коэффициента Спирмена выявлена значимая положительная корреляция уровней гормонов ФСГ ($\rho= 0,276$, $p=0, 007$), пролактина ($\rho= 0,235$, $p=0, 021$), эстрадиола ($\rho= 0,382$, $p<0, 005$) и значимая отрицательная корреляция уровней АМГ ($\rho= -0,416$, $p<0, 005$), тестостерона ($\rho= -0,208$, $p=0, 042$) и

прогестерона ($\rho = -0,224$, $p = 0,028$) с возрастом пациенток, включенных в исследование. Это соответствует известным данным об особенностях синтеза и содержания гормонов в крови женщин в рамках увеличения возраста.

3.2. Особенности лечения в программе ЭКО включенных в исследование пациенток

Всем пациенткам, включенным в исследование, был проведен протокол с использованием препаратов гонадотропинов и антагонистов гонадотропин – релизинг гормона (ант-ГнРГ) с последующим проведением преимплантационного генетического тестирования эмбрионов методом сравнительной геномной гибридизации. Стартовая доза препарата составила 150,0 (150,0 – 225,0) МЕ, а продолжительность стимуляции составила 9,0 (8,0 – 10,0) дней, суммарная доза препарата, затраченного на лечение составила 1598,0 (1228,8 – 2282,0) МЕ.

На основании критериев Колмогорова – Смирнова при оценке количества аспирированных ооцитов, качества оплодотворения и зигот было обнаружено, что данные параметры не подчинялись закону нормального распределения (таблица 13).

Таблица 13 - Основные характеристики лечения в программе ЭКО

| Показатель | Основные характеристики лечения |
|---|---------------------------------|
| Суммарная доза препарата на лечение (МЕ)* | 1598,0 (1228,8 – 2282,0) |
| Продолжительность стимуляции (дни)* | 9,0 (8,0 – 10,0) |
| Общее количество аспирированных ооцитов* | 9,0 (6,0 – 12,75) |
| Количество неоплодотворившихся ооцитов* | 0,0 (0,0 – 1,0) |
| Нормально оплодотворившиеся зиготы* | 7,0 (4,0 – 8,75) |
| Общее число пациенток | 96 |

*данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля.

При проведении трансвагинальной пункции фолликулов было аспирировано всего 876 ооцитов: 742 зрелых ооцитов (84,7%), 120 незрелых (13,7 %) и 14 дегенеративных ооцитов (1,6%) (рисунок 16).

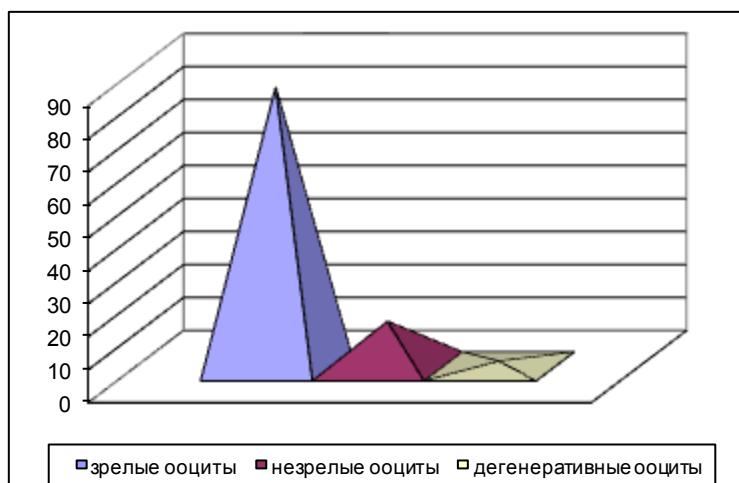


Рисунок 16. Структура аспирированных ооцитов у пациенток, включенных в исследование

На основании корреляционного коэффициента Спирмена обнаружено снижение количества полученных ооцитов ($\rho = -0,545$, $p < 0,005$) и общее количество оплодотворившихся ооцитов ($\rho = -0,445$, $p < 0,005$) с увеличением возраста пациенток, включенных в исследование.

Всем пациенткам, включенным в исследование, была проведена оценка параметров раннего эмбриогенеза в программе ВРТ.

В 88% случаев (660) оплодотворение производилось методом ИКСИ, в 12% (82) использовался метод селекции сперматозоидов ПИКСИ.

На следующие сутки после оплодотворения было получено 650 эмбрионов с нормальным оплодотворением. На основании коэффициента корреляции Спирмена была выявлена отрицательная корреляция возраста пациенток и количества эмбрионов с нормальным оплодотворением ($\rho = -0,445$, $p < 0,005$).

На 5-е сутки после оплодотворения проводилась морфологическая оценка качества эмбрионов (таблица 14).

Таблица 14 - Морфологическое качество эмбрионов на 5 сутки культивирования, полученных в программах у включенных в исследование пациенток

| Показатель | Включенные в исследование пациентки | P – уровень значимости | Итого |
|--|-------------------------------------|------------------------|-------|
| Эмбрионы отличного качества* | 1 (1,0 – 2,0) | <0,005 | 178 |
| Эмбрионы хорошего качества* | 1 (1,0 – 2,0) | <0,005 | 133 |
| Эмбрионы удовлетворительного качества* | 0,5 (0,0 – 1,75) | <0,005 | 122 |

*данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля.

Было обнаружено, что при увеличении возраста пациенток, включенных в исследование, снижается количество развившихся бластоцист на 5-е сутки культивирования ($\rho = -0,417$, $p < 0,005$), количество эмбрионов «отличного» и «хорошего» морфологического качества ($\rho = -0,296$, $p = 0,003$). Согласно критериям Спирмена была обнаружена положительная корреляция количества развившихся на 5-е сутки культивирования бластоцист с количеством развившихся эмбрионов хорошего и отличного качества ($\rho = 0,554$, $p < 0,005$), а в дальнейшем и с количеством зуплоидных эмбрионов ($\rho = 0,675$, $p < 0,005$).

Из общего числа развившихся на 5-е сутки эмбрионов 80,6% относились к группе пациенток с нормальным ИМТ, 6,7% к группе пациенток с дефицитом массы тела, в группу пациенток с нарушением жирового обмена: 11,3% с избыточной массой тела и 1,4% с ожирением.

При более детальной систематизации данных были получены статистически значимые ассоциации между отличной морфологической оценкой эмбрионов культивирования 5-х суток (3AA, 4AA, 5AA, 6AA, 4BA, 5AB, 6AB, 6BA) и оплодотворением методом ИКСИ (χ^2 , $p = 0,041$), отсутствием неразвивающихся беременностей в анамнезе пациентки (χ^2 , $p = 0,047$), а так же с нормальным ИМТ (χ^2 , $p = 0,009$). Кроме того, у пациенток с нарушением жирового обмена на 5-е сутки культивирования значительное количество эмбрионов дегенерализовались (χ^2 , $p = 0,001$).

Тщательный анализ данных позволил определить прямую взаимосвязь между морфологическим качеством эмбрионов на 5-е сутки культивирования (1AA, 2AA, 2AB, 3AB, 3BA, 4BA, 5BA, 2BB, 3BB, 4BB, 5BB, 6BB) и поздним менархе в 15 лет (χ^2 , $p = 0,001$), а так же с бесплодием неясного генеза (χ^2 , $p = 0,035$).

Взаимосвязь между морфологическим качеством полученных эмбрионов и типом бесплодия отсутствовала (χ^2 , $p = 0,671$).

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. По условиям статистической регрессии, коэффициенты не должны быть связаны между собой. В случае наличия выраженной связи коэффициент исключается из уравнения.

Многофакторный анализ позволил определить влияние независимых факторов на зависимую переменную. В качестве независимых факторов были определены: возраст женщин, возраст менархе и регулярность менструального цикла, ИМТ, анамнестические данные, тип и факторы бесплодия, номер попытки ЭКО (ИКСИ), стартовая доза препарата и длительность стимуляции суперовуляции, метод оплодотворения полученных ооцитов, качество и хромосомный набор эмбрионов. Пошаговое включение и исключение вышеперечисленных переменных позволило определить лишь влияющие на исход предикторы (таблица 15).

Таблица 15 - Прогнозирование морфологического качества эмбрионов

| Переменная | Шифр | Отличное качество | Хорошее качество |
|---|------|-------------------|------------------|
| Неразвивающаяся беременность в анамнезе | | | |
| -нет | 0 | 74,8 % | 63,2 % |
| -да | 1 | 25,2 % | 36,8 % |
| ИМТ на момент проведения стимуляции суперовуляции | | | |
| -16-18,5 | 0 | 5,6 % | 9,7% |
| -18,5-24,99 | 1 | 73,1 % | 78,9 % |
| -25-30 | 2 | 19,1 % | 11,3 % |
| -30-35 | 3 | 2,2% | 0% |
| Фактор бесплодия | | | |
| -связанное с отсутствием овуляции | 0 | 13,8 % | 17,6 % |
| -трубного происхождения | 1 | 13,2 % | 22,4 % |
| -связанное с мужскими факторами | 2 | 48,4% | 47,2 % |
| -сочетание трубного и мужского факторов | 3 | 9,4% | 6,4 % |
| -бесплодие неясного генеза | 4 | 15,1% | 6,4 % |
| Оплодотворение | | | |
| -ИКСИ | 1 | 92,5 % | 84,0 % |
| -ПИКСИ | 2 | 7,5 % | 16,0 % |
| Кариотип эмбриона: | | | |
| -эуплоидный | 0 | 58,2 % | 39,3 % |
| -анеуплоидный | 1 | 41,8 % | 60,7 % |

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:

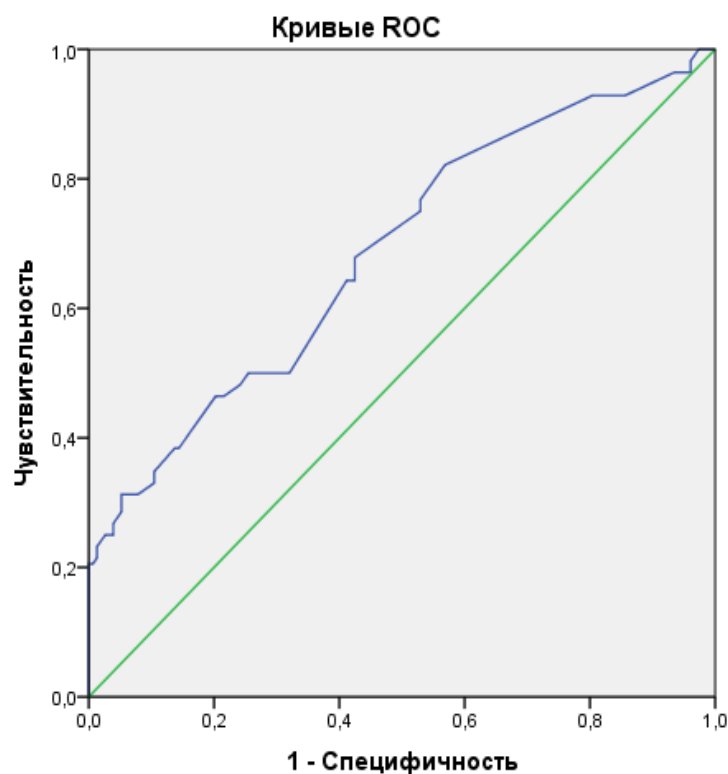
$$P = \left(\frac{1}{1 + e^{-z}} \right) * 100 \%,$$

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.

На следующем этапе 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 17).



Диагональные сегменты формируются совпадениями.

Рисунок 17. ROC – анализ полученной математической модели

Материал от 306 эмбрионов был отправлен на проведение преимплантационного генетического тестирования, при этом отличное морфологическое качество наблюдалось в 56,9 % случаев (174), хорошее морфологическое качество – в 37,9% случаев (116), удовлетворительное – в 5,2% случаев (16). В группе эмбрионов отличного качества в 40 % случаев (69) встречались хромосомные аномалии, в группе хорошего морфологического качества в 62% случаев (72), а в группе удовлетворительного качества в 23 % случаев (3). Другими словами в группе эмбрионов отличного морфологического качества наблюдалось меньшее количество случаев анеуплоидий по результатам ПГТ по сравнению с эмбрионами хорошего морфологического качества (χ^2 , $p=0,004$) (рисунок 18).

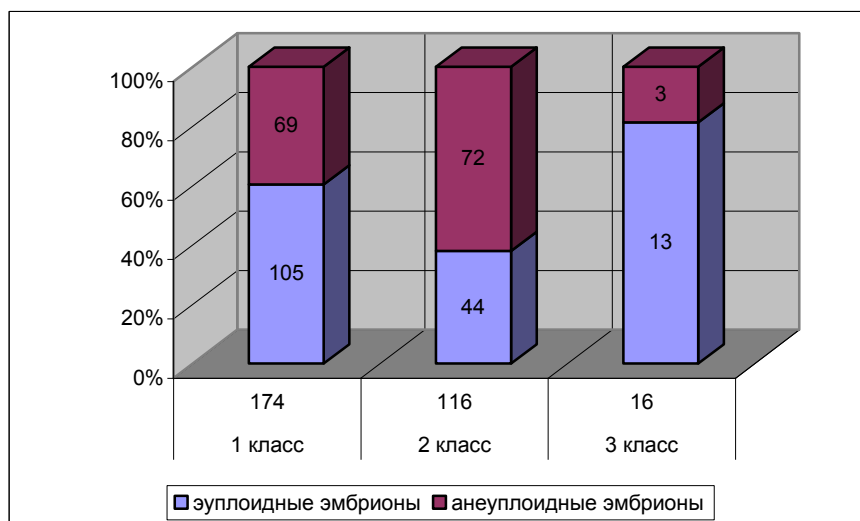


Рисунок 18. Ассоциация морфологического класса эмбрионов 5-х суток культивирования с наличием хромосомных аномалий в эмбрионе по результатам ПГТ

Из возрастной группы пациенток до 34 лет генетический скрининг проводился на 172 эмбрионах, эуплоидный кариотип имели 61 % эмбрионов (105). Из группы 35 – 39 лет ПГТ проводился 36 эмбрионам, эуплоидный кариотип имели 47 % эмбрионов (17). 98 эмбрионов, отправленных на ПГТ, от пациенток старше 40 лет, эуплоидный кариотип имели 40 % эмбрионов (40) (рисунок 19). Отмечается прямая зависимость плоидности полученных эмбрионов от возраста женщины (χ^2 , $p=0,008$).

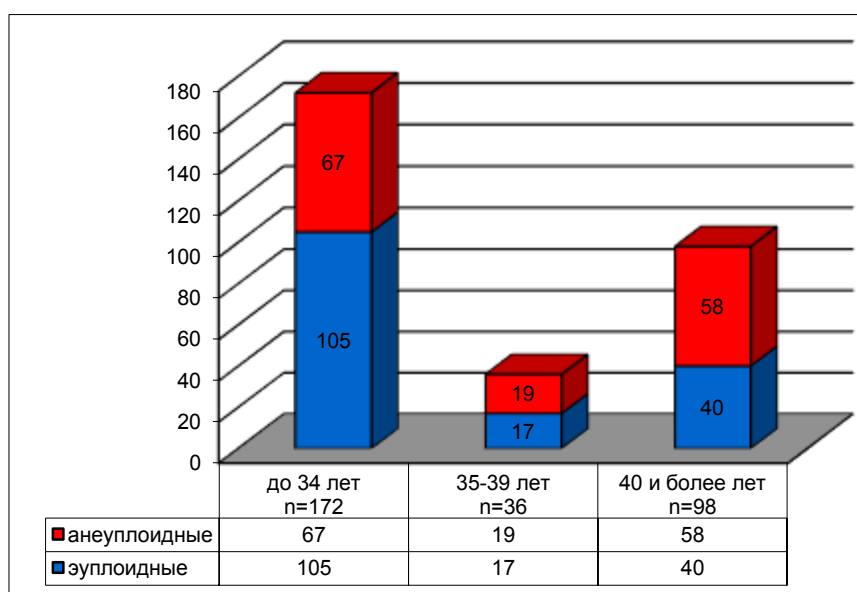


Рисунок 19. Структура плоидности эмбрионов, полученных у пациенток разных возрастных групп, включенных в исследование

Кроме того, была выявлена взаимосвязь между неправильным генетическим набором эмбрионов и наличием наружного генитального эндометриоза у пациентки (χ^2 , $p=0,006$) (рисунок 20), а так же типом бесплодия (χ^2 , $p=0,038$) (рисунок 21).

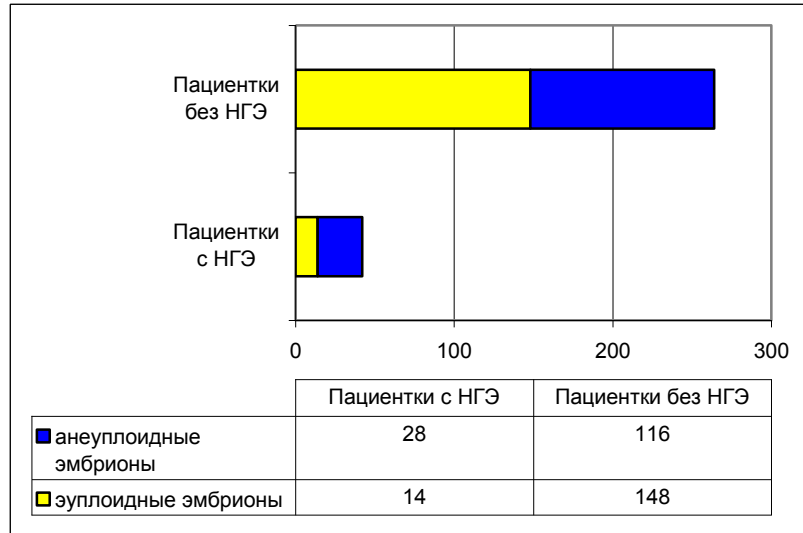


Рисунок 20. Структура плоидности эмбрионов, полученных у пациенток с наличием и отсутствием наружного генитального эндометриоза

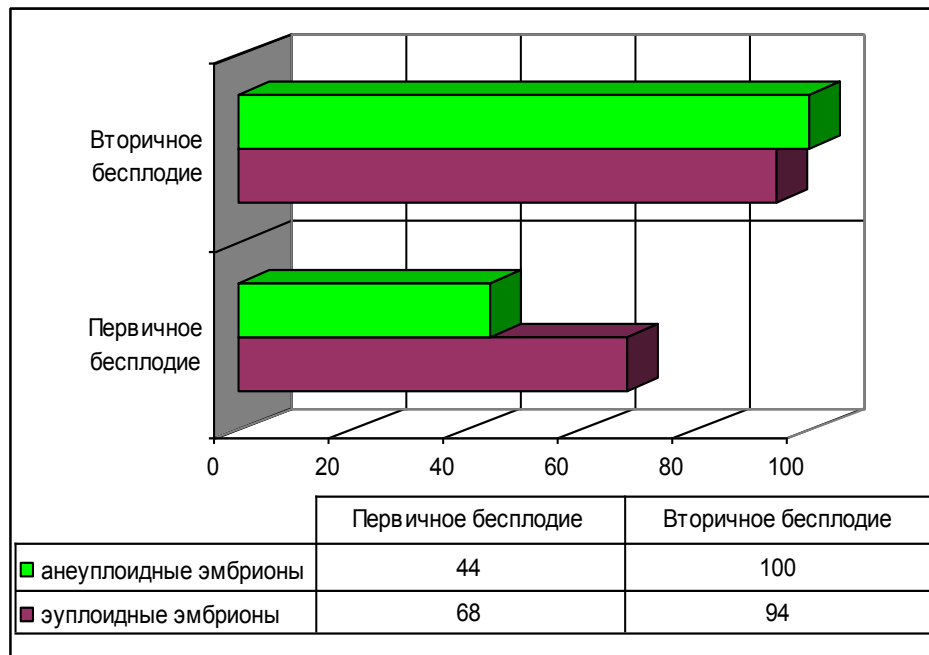


Рисунок 21. Структура плоидности эмбрионов, полученных у пациенток с первичным и вторичным бесплодием

3.3. Анализ изменения состава сред культивирования эмбрионов, полученных в программах исследованных пациенток

3.3.1 Ассоциация профиля метаболитов сред культивирования с качеством развивающихся эмбрионов

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. Для уменьшения размерности многокомпонентных наборов, данных и для визуализации кластеризации групп образцов по профилям метаболитов был применен анализ главных компонент (principal components analysis, PCA). Проведенный анализ выявил отличия в профилях метаболитов отработанных 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 22 приведены характерные диаграммы межгруппового сравнения.

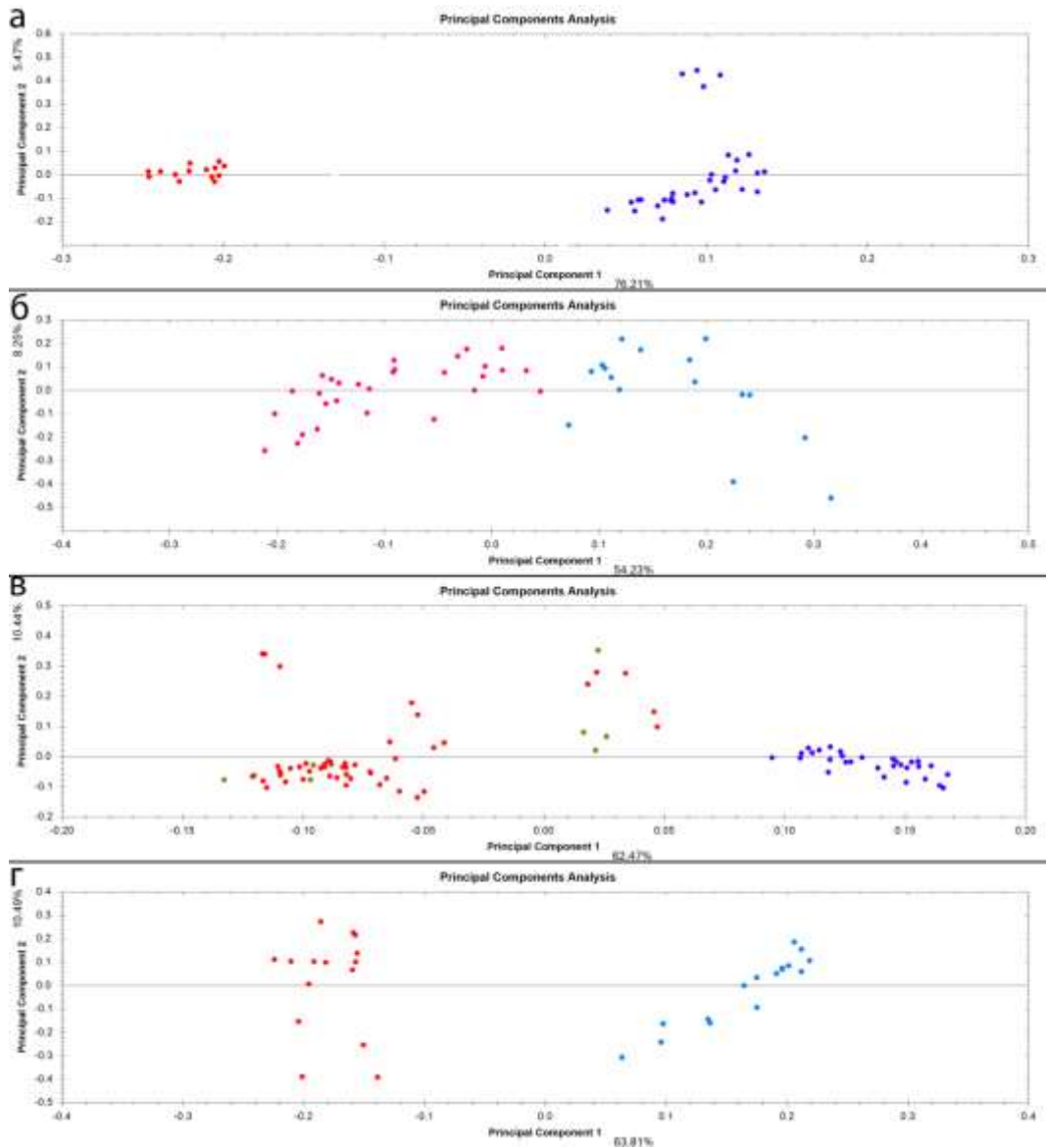


Рисунок 22. PCA-анализ. Межгрупповое сравнение профилей метаболитов эмбрионов разных морфологических классов: а - для 1 и 2 класс эмбрионов; б – для 1 и 3 класса эмбрионов; в – для 1 и 4 класса эмбрионов, а также контрольных сред без культивирования эмбрионов (р); г - для 2 и 3 класса эмбрионов

Также проводилось внутригрупповое сравнение эмбрионов одного класса, имеющих отличия в морфологических параметрах, которое не выявило достоверных отличий (рисунок 23).

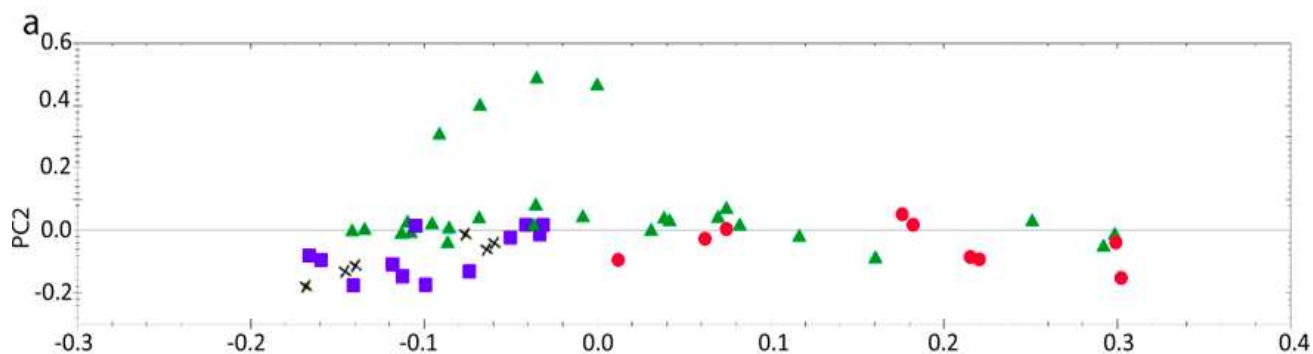


Рисунок 23. PCA-анализ. Внутригрупповое сравнение профилей метаболитов эмбрионов 1-го класса: ● - 6AA, ■ - 4AA, x - 4AB, ▲ – 3AA

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 24).

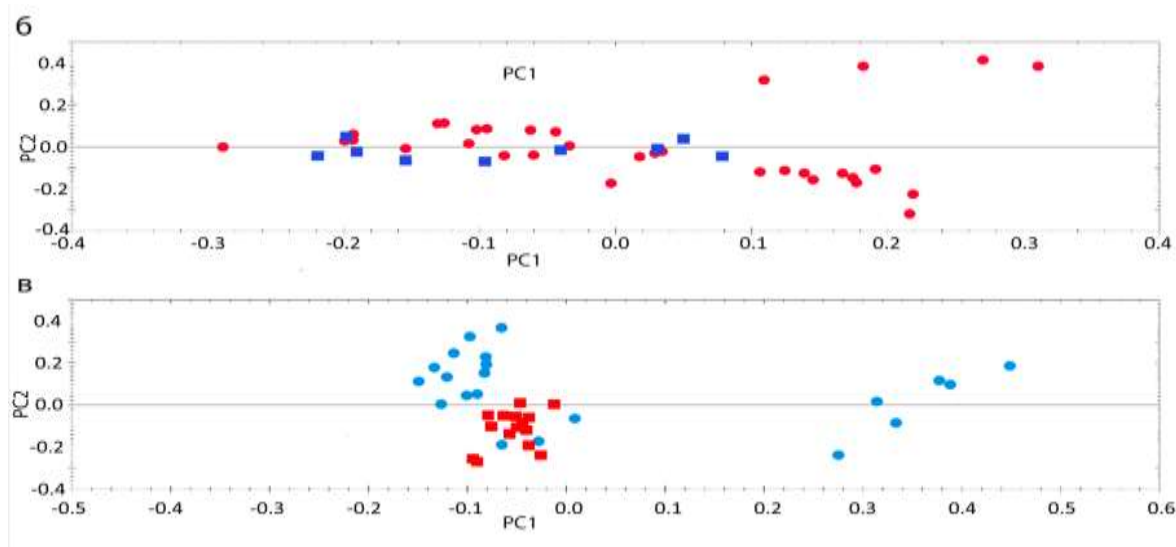


Рисунок 24. PCA-анализ. Сравнение профилей сред культивирования эмбрионов 1 – го морфологического класса (б) (● - euploidные эмбрионы, ■ - анеуплоидные эмбрионы) и 2 – го морфологического класса (в) (● - euploidные эмбрионы, ● - анеуплоидные эмбрионы)

3.3.2 Ассоциация профиля метаболитов сред культивирования с вероятностью наступления беременности

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 зуплоидного эмбриона в полость матки (рисунок 25).

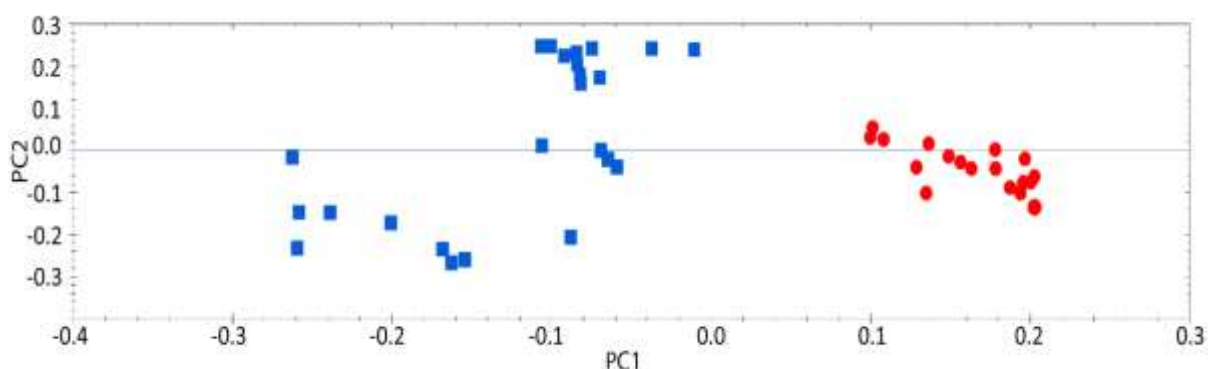


Рисунок 25. PCA-анализ. Оценка имплантационного потенциала по профилям метаболитов в культуральных средах эмбрионов: ■ - имплантация, ● - отсутствие имплантации

Дальнейшая обработка данных позволила обнаружить достоверные отличия между группами с различными исходами после переноса. Идентификация соединений проводилась по времени хроматографического удерживания, молекулярной массе и фрагментации соответствующего молекулярного иона.

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 – глутамина (218,1144 Да), фенилпирувата (165,0545 Да) и β -L-фукоза-1-фосфат (267,0257 Да) была меньше, а концентрация L – фенилаланина (166,0866 Да) больше по сравнению со средами культивирования неимплантировавшихся эмбрионов. Результат свидетельствует о важной роли

изменений метаболизма эмбрионов на стадии культивирования для последующей имплантации.

В таблице 16 представлены вещества с наибольшей предиктивной значимостью и их изменения в средах культивирования.

Таблица 16 - 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 | β – L – фукоза – 1 – фосфат | меньше в 3069 раз |

3.3.3 Ассоциация уровня потребления глюкозы и глутамата с качеством развивающихся эмбрионов

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.

Оценка потребления глюкозы выявила в каждом морфологическом классе эмбрионы, в питательных средах которых значения содержания глюкозы по данным флуориметрии не отличались от контрольных (максимальное падение не более 1%) или были выше таковых. В каждом классе насчитывалось порядка 30% подобных эмбрионов, и они были исключены из сравнительных расчетов потребления глюкозы, как условно «метаболически неактивные».

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 26).

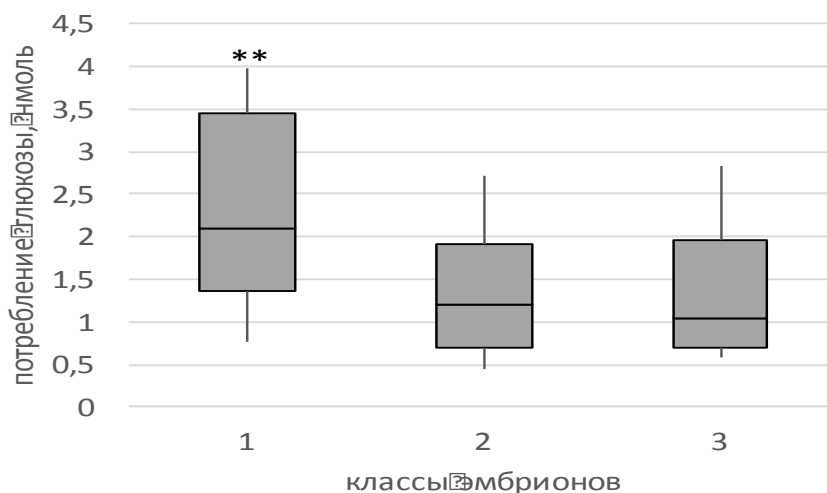


Рисунок 26. Межгрупповое сравнение потребления глюкозы эмбрионами 5-го дня культивирования

Линия в середине «ящика» представляет собой медиану (50-й процентиль), границами ящика служат первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля). Концы «усов» соответствуют минимальному и максимальному значениям. Крайние точки (выбросы) – данные, выходящие за границы усов. ** – $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

В данной работе был также проведен анализ изменений потребления глутамата, однако достоверных отличий 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 27).

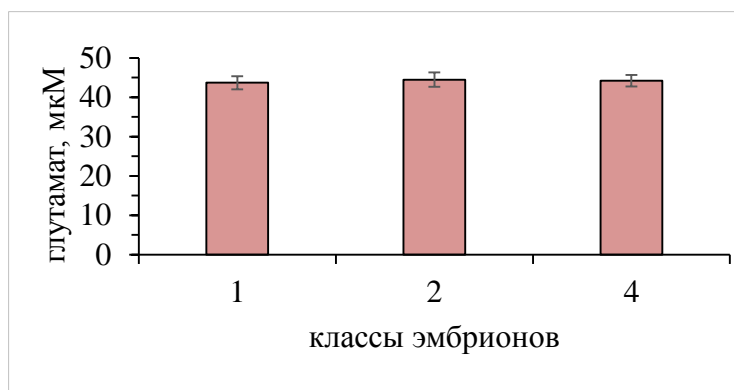


Рисунок 27. Потребление глутамата из отработанных сред культивирования эмбрионами различных морфологических классов (критерии Манна-Уитни, $p < 0,05$)

Проведенный анализ данных ПГТ показал, что среди полученных эмбрионов насчитывалось в среднем 50% анеуплоидных кариотипов с изменениями по одной и более парам хромосом. Сходное распределение эмбрионов наблюдалось и по полу.

Внутригрупповой анализ в потреблении глюкозы не выявил достоверных отличий между эуплоидными и анеуплоидными эмбрионами (рисунок 28), а также эмбрионами разного пола (рисунок 29).

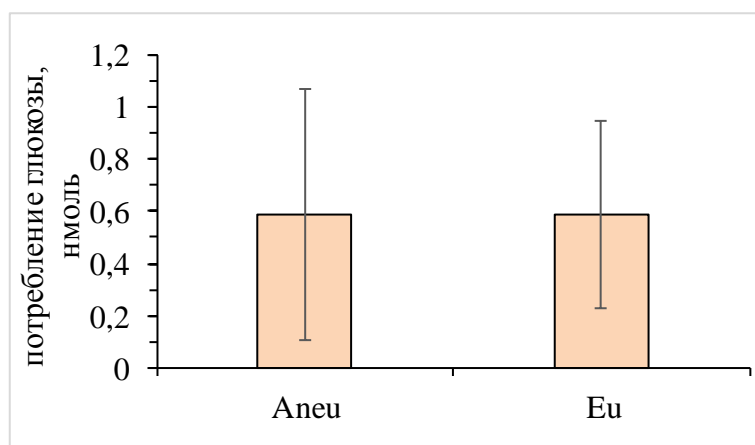


Рисунок 28. Потребление глюкозы эуплоидными и анеуплоидными эмбрионами (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$)

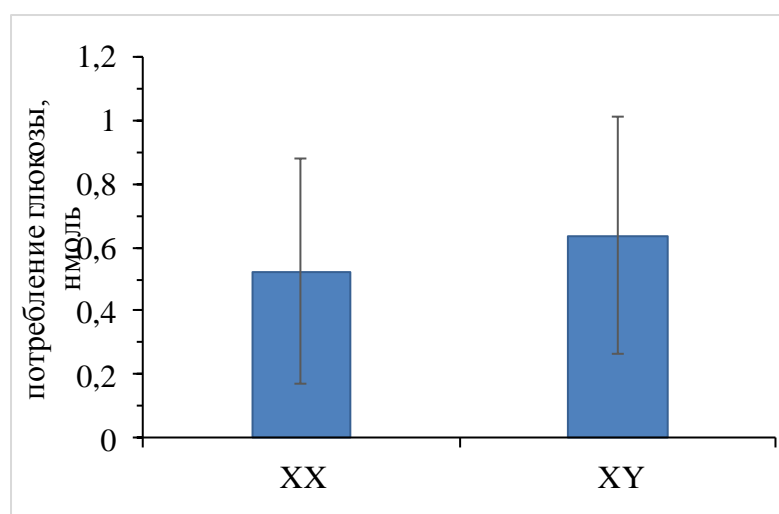


Рисунок 29. Потребление глюкозы эмбрионами разного пола (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$)

Анализ изменений потребления глутамата эмбрионами разного генетического качества достоверных отличий не продемонстрировал (рисунок 30).

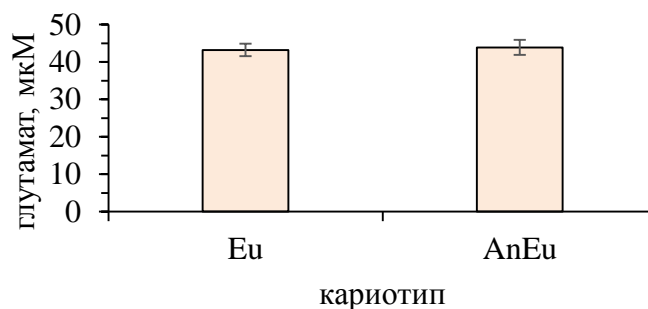


Рисунок 30. Потребление глутамата из отработанных сред культивирования эуплоидными и анеуплоидными эмбрионами (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$)

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

3.3.4 Ассоциация уровня потребления глюкозы и глутамата с вероятностью наступления беременности

На следующем этапе был проведен анализ корреляции уровней потребления глюкозы у включенных в исследование пациенток с результатами программы ЭКО (ИКСИ) с ПГТ.

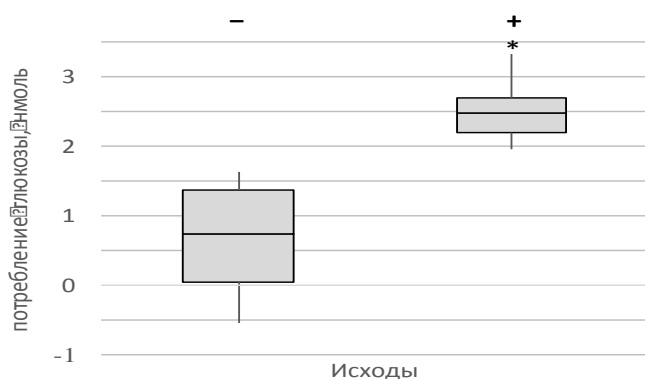


Рисунок 31. Потребление глюкозы имплантировавшихся (+) и неимплантировавшихся (-) эуплоидных эмбрионов 5-х суток развития

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).

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 глюкозы больше по сравнению с эуплоидными неимплантировавшимися эмбрионами (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) (рисунок 31).

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.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оптимизации всех этапов лечения в программе ВРТ, увеличения шансов наступления беременности и рождения здорового ребенка бесспорно необходимо четкое взаимодействие лечащего врача, клинического эмбриолога и пациента.

Слагаемыми успешного лечения являются состояние овариального резерва пациентки, ее возраст, фактор бесплодия, наличие сопутствующих гинекологических и соматических заболеваний, своевременное обнаружение внутриматочной патологии, морфологическое состояние эндометрия, определение «окна имплантации» [1, 3, 4, 4, 6, 7, 124].

Развитие программ ВРТ состоит не только в усовершенствовании применяемых препаратов, индивидуализации используемых лечебных протоколов, но и модификации методов культивирования полученных эмбрионов, а также во внедрении особых методик оплодотворения, позволяющих достигнуть успеха в терапии мужского и женского бесплодия.

Однократная визуализация при морфологической оценке перед переносом в полость матки не позволяет определить истинный потенциал развития каждого эмбриона, вероятность наступления и прогрессирования беременности: эмбрионы «отличного» и «хорошего» морфологического качества не всегда успешно имплантируются, могут иметь анеуплоидный набор хромосом, а эмбрионы с неудовлетворительными показателями согласно рутинной классификации приводят к живорождению [14, 15, 56, 126].

Преимплантационное генетическое тестирование позволяет выявить генетические аномалии эмбрионов до переноса их в полость матки, то есть до проведения пренатальной диагностики во время прогрессирующей беременности [16]. Доступные исследования сообщают об увеличении частоты имплантации и живорождения, снижении показателей невынашивания беременности в группе пациентов, которым проводились лечебные циклы ЭКО с ПГТ по сравнению со стандартным циклом ЭКО [32, 33, 34]. Несомненно, имеющийся метод показывает превосходство над стандартной морфологической оценкой, но нельзя не отметить 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 [9]. Важно отметить, что диагностика генома не исключает наличие сбалансированных хромосомных aberrаций, точечных мутаций, которые в известной мере влияют на имплантацию эмбриона и развитие врожденных пороков [24, 25, 26, 127, 173, 174].

Вспомогательные репродуктивные технологии помогают преодолеть бесплодие, но их эффективность недостаточна. Возможно, это происходит из-за неполной изученности молекулярной физиологии половых клеток, эмбрионов, эндометрия, что делает выявление принципиальных причин повторных неудач имплантации абсолютно необходимым [121, 122].

Критерии морфологической оценки эмбриона дополняются морфокинетическими параметрами, в широкой клинической практике используется технология выявления хромосомных и генных аномалий, позволяющая производить перенос эуплоидного эмбриона в полость матки. Новые «Омиксные» технологии являются новыми дисциплинами, позволяют расширить диагностические возможности в области вспомогательной репродукции, описывают молекулярные биомаркеры, связанные с бесплодием, изучать функционирование клеточных структур от ДНК и генов до метаболитов. В этой связи необходимо совершенствование современных подходов для обеспечения четкого понимания биологических процессов, лежащих в основе неудач имплантации эуплоидных эмбрионов [9, 101], а также развитие актуальных неинвазивных методов оценки жизнеспособности эмбрионов человека в программах ЭКО [102]. Так, среды культивирования эмбрионов различных стадий развития, являясь уникальным объектом исследования, несут в себе информацию о метаболической активности, энергетическом обмене и состоянии сигнальных систем эмбриона [9, 52].

Безусловно, существенным дополнением к классическим морфологическим критериям в выборе эмбриона для переноса в полость матки или криоконсервации

может стать неинвазивный метод, основывающийся на оценке физиологии эмбрионов с использованием метаболических параметров.

Для достижения поставленной цели в настоящей работе было проведено исследование, в котором оценивалась вероятность имплантации эмбрионов 5-х суток развития в программе ЭКО в зависимости от профиля метаболитов отработанных сред культивирования и потребления компонентов культуральных сред, а именно глюкозы и глутамата.

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

Медиана возраста пациенток составила 35,50 (30 – 40,75) лет. При трансвагинальной пункции аспирировано всего 876 ооцитов, из которых 742 зрелых ооцита (84,7%), 120 незрелых (13,7 %) и 14 дегенеративных ооцитов (1,6%). Было обнаружено снижение количества полученных и оплодотворившихся ооцитов с увеличением возраста пациенток, включенных в исследование ($p < 0,005$). На следующие сутки после оплодотворения было получено 650 эмбрионов с нормальным оплодотворением, зафиксирована отрицательная корреляция возраста пациенток и количества эмбрионов с нормальным оплодотворением ($p < 0,005$).

Для оценки функционального состояния репродуктивной и эндокринной систем всем пациенткам была проведена оценка параметров гормонального профиля, значимых отклонений выявлено не было. 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.

Антропометрические характеристики пациенток, включенных в исследование, соответствовали среднестатистическим нормам.

Данные о характере менструальной функции по средним характеристикам соответствовали общепопуляционным параметрам менструального цикла женщин репродуктивного возраста.

Данные о типе бесплодия у женщин, включенных в исследование, показывают преобладание случаев вторичного бесплодия (64,6%) по сравнению с первичным (35,4%). В структуре представленной этиологии бесплодия преобладал мужской фактор, который составил 48%, трубно – перитонеальный фактор выявлен в 23% случаев, отсутствие овуляции в 13% случаев, сочетанный фактор и бесплодие неясного генеза в 8% случаев бесплодия, что соответствовало заявленным критериям включения в исследование.

При более детальной систематизации данных были получены статистически значимые ассоциации между отличной морфологической оценкой эмбрионов культивирования 5-х суток (3АА, 4АА, 5АА, 6АА, 4ВА, 5АВ, 6АВ, 6ВА) и оплодотворением методом ИКСИ (χ^2 , $p=0,041$), отсутствием неразвивающихся беременностей в анамнезе пациентки (χ^2 , $p=0,047$), а также с нормальным ИМТ (χ^2 , $p=0,009$). Тщательный анализ данных позволил определить прямую взаимосвязь между морфологическим качеством эмбрионов на 5-е сутки культивирования (1АА, 2АА, 2АВ, 3АВ, 3ВА, 4ВА, 5ВА, 2ВВ, 3ВВ, 4ВВ, 5ВВ, 6ВВ) и поздним менархе в 15 лет (χ^2 , $p=0,001$), а также с бесплодием неясного генеза (χ^2 , $p=0,035$). Взаимосвязь между морфологическим качеством полученных эмбрионов и типом бесплодия отсутствовала (χ^2 , $p=0,671$).

Кроме того, в работе был проведен логистический регрессионный анализ, результатом которого стало составление формулы, позволяющей прогнозировать морфологическое качество эмбрионов в программе ВРТ на основании клинических и эмбриологических факторов (чувствительность 80%, специфичность 46 %). Переменными являлись данные о прерывании беременностей в анамнезе, ИМТ на момент проведения стимуляции суперовуляции, фактор бесплодия, оплодотворение методом ИКСИ, использование селекции сперматозоидов ПИКСИ, кариотип эмбрионов, полученных в предыдущих попытках ВРТ с ПГТ. Данная математическая формула

применима в отношении пациенток, планирующих проведение программы ВРТ, имеющих в анамнезе программы ВРТ с ПГТ.

На следующем этапе производилась биопсия трофэктодермы бластоцист с целью проведения преимплантационного генетического тестирования, из них эмбрионы 1 класса 56,9 %, 2 класса – 37,9% , 3 класса – 5,2% . В группе эмбрионов 1 класса хромосомные аномалии встречались в 40 %, в группе 2 класса в 62%. Другими словами, в группе эмбрионов отличного морфологического качества наблюдалось меньшее количество случаев анеуплоидий по результатам ПГТ по сравнению с эмбрионами хорошего морфологического качества (χ^2 , $p=0,004$).

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 прямая зависимость плоидности полученных эмбрионов от возраста женщины (χ^2 , $p=0,008$).

Кроме того, была выявлена взаимосвязь между неправильным генетическим набором эмбрионов и вторичным бесплодием (χ^2 , $p=0,038$), а так же наличием наружного генитального эндометриоза у пациентки (χ^2 , $p=0,006$), а), что в очередной раз подчеркивает опосредованное повреждающее воздействие факторов хронического воспаления на генетический аппарат получаемых ооцитов и эмбрионов у группы женщин с наличием эндометриозидных гетеротопий.

К выводу о необходимости присутствия неэссенциальных аминокислот во время инкубации пришел в 1997 году Gardner D.K. Бесспорна и важность физических факторов при инкубации: различная насыщенность кислородом влияет на скорость метаболизма эмбрионов, культивируемых в лабораторных условиях [86, 188].

В дальнейшем на основании морфологических и генетических критериев были проведены межгрупповые и внутригрупповые сравнения профилей метаболитов отработанных сред культивирования эмбрионов. В проведенном нами исследовании были использованы отработанные среды эмбрионов пятого

дня культивирования. На данном сроке наблюдается формирование бластоцисты, что позволяет давать более детальную морфологическую характеристику эмбрионов, по сравнению с третьим днем развития.

Примечательно, что РСА-анализ выявил отличия 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. Также проводилось внутригрупповое сравнение эмбрионов одного класса, имеющих отличия в морфологических параметрах, которое не выявило значимых отличий. Наблюдаемые различия могут быть связаны как с количеством и соотношением клеток развивающегося эмбриона, так и их специфической метаболической активностью, характерной для определенного уровня развития.

Внутригрупповой сравнительный анализ профилей сред культивирования эмбрионов с нормальным и аномальным генетическим набором не выявил значимых отличий в исследуемых группах. Можно предположить, что на данной стадии развития выявленные анеуплоидии либо не вносят существенного вклада в метаболическую активность эмбрионов, либо происходит адаптация к генетическим перестройкам, приводящая к сглаживанию общей картины состава метаболитов. Кроме этого, в нашем исследовании все образцы сред культивирования анеуплоидных эмбрионов были объединены в одну группу, что могло также препятствовать выявлению отличий.

Проведенный РСА – анализ позволил обнаружить достоверные отличия между группами с различными исходами после селективного переноса зуплоидного эмбриона в полость матки. При анализе параметров полученных пиков масс были рассчитаны молекулярные массы и идентифицированы молекулы веществ. Качественный сравнительный анализ параметров полученных пиков масс сред культивирования имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов выявил вещества с наибольшей предиктивной значимостью и их изменения в средах культивирования.

Уменьшение концентрация L – изомеры незаменимой аминокислоты валин с молекулярной массой и протеиногенной аминокислоты пролин с молекулярной

массой произошли в 18 и 4100 раз соответственно. Также зафиксировано снижение в 19 раз содержание аланил – глутамина, состоящего из L – аланина и L – глутамина, являющегося компонентом лабораторных питательных сред, что говорит о повышенном потреблении данного дипептида имплантировавшимися эмбрионами.

Следующим веществом, концентрация которых стала ниже в средах имплантировавшихся эмбрионов по сравнению с неимплантировавшимися, были фенилпировиноградная α – кетокислота и β – L – фукоза – 1 – фосфат.

Концентрация L – фенилаланина стала выше в 287 раз. Форма L – изомера является природной, то есть, не синтезирована химически, и играет значительную роль в фолдинге (укладке полипептидной цепи) и стабилизации белковых структур.

Дальнейший качественный и количественный анализ состава сред культивирования эмбрионов методом метаболомного профилирования может способствовать более точному отбору эмбриона для переноса на основании предиктивной значимости перечисленных веществ.

Подобные исследования по окислению глюкозы начались в 70-х годах XX века, но на моделях с животными [88, 89, 90].

Впервые неинвазивная микрофлуорисценция была применена Gardner D.K. для измерения скорости потребления глюкозы 4-х дневными эмбрионами мышей, которая была выше у активно развивающихся бластоцист [91]. В 2008 году этой же научной группой была продемонстрирована взаимосвязь потребления глюкозы из культуральной среды эмбрионами человека. Кроме того, отмечались половые различия в метаболизме глюкозы, однако, данные о половой принадлежности были получены после родоразрешения.

Fiona D'Souza с коллегами в модели на эмбрионах мышей 3-х суток развития для выявления взаимосвязи между изменениями уровня потребления питательных веществ и генетической целостностью выполняли экспериментальное повреждение ДНК, вводя противоопухолевый препарат. Наблюдалась поразительная картина изменения обмена веществ [186]. Urbanski

J.P. сообщает о результатах, полученных с помощью автоматизированной системы анализа, но согласующихся с уже опубликованными литературными данными [99, 100].

На основании мировых исследований известно, что пристальное внимание ученых обращено к изучению метаболизма основных химических субстратов: аминокислот и глюкозы [9, 86].

Основной механизм преимплантационного развития эмбрионов, от дробления до бластоцисты, характеризуется в переходе от метаболизма карбоновых кислот к метаболизму глюкозы на этапе между пре- и посткомпактизацией [9, 95]. На ранних стадиях развития основным источником энергии для синтеза молекул АТФ являются пируват и лактат, а расщепление молекул глюкозы минимально. Для обеспечения потребностей активно растущего эмбриона, со стадии бластоцисты, потребление глюкозы неуклонно растет [93, 94, 95].

Глутамат – промежуточный продукт энергетического обмена, тесно связан с процессами цикла трикарбоновых кислот, участвует в синтезе белков, пуриновых и пиримидиновых оснований, транспорте аммиака, аминокислот, а так же в регуляции работы антиоксидантной системы клеток [102].

Увеличение содержания глутамата в тканях и корреляция с исходом программы ЭКО были констатированы при глобальном метаболомном профилировании образцов эндометрия пациенток с неактивной формой генитального туберкулеза. Концентрация глутамата, определенная с помощью ЯМР, была выше у имплантировавшихся эмбрионов. На этом основании Seli E. определил индекс жизнеспособности эмбрионов по уровню глутамата и отношения аланин – лактат [101].

Значимых отличий потребления глутамата в группах разных морфологических классов и различных кариотипов зафиксировано не было, что может быть связано с его относительно низкой концентрацией (46 мкМ) в питательной среде и недостаточной чувствительностью используемого метода регистрации.

В ходе проведенного исследования было выявлено, что уровень потребления глюкозы у эмбрионов 1-го морфологического класса в 1,75 раза больше по сравнению с эмбрионами 2-го класса, и в 2 раза больше по сравнению с эмбрионами 3-го класса. Отличий по данному параметру между 2-м и 3-м классом не наблюдалось (критерии Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, $p < 0,05$). Повышение потребления глюкозы эмбрионами 1-го класса может быть вызвано увеличением объема клеточной массы и ускорением энергетического обмена на данной стадии развития.

Внутригрупповой анализ потребления глюкозы не выявил значимых отличий между эуплоидными и анеуплоидными эмбрионами, а также эмбрионами разного пола. Отсутствие потребления глюкозы такими эмбрионами может быть связано с нарушением переключения метаболизма карбоновых кислот, преобладающего на ранних стадиях развития эмбриона, на использование глюкозы в качестве энергетического субстрата.

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: 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 глюкозы больше по сравнению с эуплоидными неимплантировавшимися эмбрионами ($p < 0,05$).

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 оптимальный алгоритм проведения программ ВРТ при селективном переносе эмбрионов в зависимости от наличия исследуемых молекулярно-генетических предикторов (рисунок 32).



Рисунок 32. Алгоритм оптимизации программ ВРТ при селективном переносе эмбрионов с учетом молекулярно-генетических предикторов

Заключение

Несмотря на современные достижения в лечении бесплодия, по-прежнему актуальна необходимость оптимизации программ ВРТ, повышающая их эффективность, безопасность и вероятность рождения живого и здорового ребенка, при этом снижающая возможность развития осложнений, в том числе наступление многоплодной беременности, а также стоимость проводимого лечения.

В последние годы отмечается значительный прогресс в создании новых тактик, позволяющих уменьшить число неудачных исходов программ ЭКО. Для дальнейшего совершенствования этого направления необходим поиск оптимальных маркеров качества эмбрионов с помощью абсолютно новых методов исследования. Необходима коррекция стандартных подходов в использовании вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от индивидуальных особенностей конкретного пациента.

Сегодня помимо традиционных лабораторных исследований наука может предложить инновационные неинвазивные методы диагностики, которые без всякого вреда позволяют проследить динамику состояния, что применимо и для программ вспомогательных репродуктивных технологий. Однако, для решения проблем негативных исходов требуется продолжить поиск альтернативных неинвазивных методов анализа качества эмбриона и его способности к имплантации.

По результатам проведенной работы можно считать, что анализ отработанных сред культивирования бластоцист с целью предикции результатов программ ВРТ является ценным, актуальным и перспективным для науки и широкой клинической практики неинвазивным методом, позволяющим индивидуализировать и оптимизировать тактику лечения бесплодия.

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 – глутамина, фенилпирувата и β – 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 СОКРАЩЕНИЙ

17-ОП – 17-оксипрогестерон

аГнРГ – агонисты гонадотропного рилизинг-гормона

АМГ – антимюллеров гормон

антГнРГ – антагонисты гонадотропного рилизинг-гормона

АСАТ – антиспермальные антитела

АТФ – аденозинтрифосфат

БИК-спектрометрия – спектрометрия в ближней инфракрасной области

ВКМ – внутренняя клеточная масса

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВПЧ – вирус папилломы человека

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

д.м.ц. – день менструального цикла

ДГЭА-С – дигидроэпиандростерона сульфат

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Е2 - эстрадиол

ИКСИ – инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита

ИМСИ – инъекция морфологически отобранного сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки

ИМТ – индекс массы тела

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

К - кортизол

ЛГ – лютеинизирующий гормон

МС – масс-спектрометрия

микроРНК – некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты

НМИЦ АГиП – национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии

ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс

ОШ – отношение шансов

П - прогестерон

ПГТ – преимплантационное генетическое тестирование (на анеуплоидии - ПГТ-А, на моногенные заболевания - ПГТ-М)

ПГС – предимплантационный генетический скрининг

ПИКСИ – физиологическая инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита

ПРЛ – пролактин

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭ – перенос эмбриона

рФСГ – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон

СПКЯ – синдром поликистозных яичников

СТГ – соматотропный гормон

Т – тестостерон

Т4 – тироксин

ТВП – трансвагинальная пункция

ТЕ – трофэктодерма

ТТГ – тиреотропный гормон

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФНО – фактор некроза опухоли

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЧМГ – человеческий менопаузальный гормон

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

ASRM – American Society for Reproductive Medicine (Американское общество репродуктивной медицины)

CGH – Comparative Genomic Hybridisation (метод сравнительной геномной гибридизации)

CXCL13 - chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (хемоаттрактант В-лимфоцитов)

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology (Европейское общество по вопросам репродукции человека и эмбриологии)

FISH – fluorescence in situ hybridization (флуоресцентная гибридизация in situ)

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)

HLA-G – human leukocyte antigen-G (лейкоцитарный антиген человека)

IL-6 – interleukin 6 (интерлейкин 6)

IL-8 – interleukin 8 (интерлейкин 8)

IL-10 – interleukin 10 (интерлейкин 10)

LI – labelling index (пролиферативный индекс)

MII – metaphase II (метафаза второго деления мейоза)

MIP-1b – macrophage inflammatory protein (макрофагальный воспалительный белок-1b)

MSP-a – macrophage stimulating protein (белок, стимулирующий макрофаги)

NGS – next generation sequencing (секвенирование нового поколения)

SCF – stem cell factor (фактор роста стволовых клеток)

SD – standart deviation (стандартное отклонение)

SEM – standart error of the mean (стандартная ошибка среднего)

TRAILR3 – tumor necrosis-related apoptosis-inducing ligand (цитокин семейства факторов некроза опухоли)

TLI – time-lapse imaging (инкубатор с системой микроскопического наблюдения)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВРТ в России в 2015 Г. / В.С. Корсак [и др.] // Материалы XXVII международной конференции Российской ассоциации репродукции человека: тезисы докладов. – 2017. – С. 75–76.
2. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению / Под ред. Г.Т. Сухих, Т.А. Назаренко. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010.– 518с.
3. Эбзеева М. В., Калинина Е. А., Кузьмичев Л. Н. Современные подходы к стимуляции суперовуляции в программах ВРТ // Проблемы репродукции. – 2009. – № 4. – С. 47–49.
4. ЭКО при гинекологических и эндокринных заболеваниях / Под ред. Т.А. Назаренко. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016.– 176 с.
5. Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation. / M. Poli [et al.] // EMBO Mol. Med. – 2015. – Vol. 7 (11). – P. 1465–1479.
6. Беляева Н.А. Реализация программы вспомогательных репродуктивных технологий у пациентов с микроделецией AZF локуса хромосомы Y : дис. ... кандидата медицинских наук. - Москва, 2014.
7. Оценка значимости молекулярно-генетических маркеров в эндометрии в прогнозировании исхода беременности в программе экстракорпорального оплодотворения / М.А. Маслова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2015. – №3. – С. 26-32.
8. Федорова И.Д., Шильникова Е.М., Гзгзян А.М. Принципы отбора сперматозоидов по морфологическим, биохимическим и физиологическим признакам для проведения внутрицитоплазматической инъекции сперматозоидов в ооцит // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – № 3. – С. 123–131.
9. Зорина И.М., Смольникова В.Ю., Бобров М.Ю. Изучение продуктов метаболизма эмбрионов в культуральных средах как инструмент определения потенциала к имплантации // Акушерство и гинекология. – 2017. – №2. – С. 11 – 16.

10. Centers for Disease Control and Prevention. American Society for Assisted Reproductive Technology. Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, 2015.
11. Centers for Disease Control and Prevention. American Society for Assisted Reproductive Technology. Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, 2014.
12. Criteria for number of embryos to transfer: a committee opinion. / S. Pfeifer [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol.99 (1). – P. 44–46.
13. Burns using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. / E. Seli [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol. 90 (6). – P. 2031 – 2448.
14. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. / C.G. Vergouw [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol.23 (7). – P.1499–1504.
15. Nerenz R.D. Omics in reproductive medicine: application of novel technologies to improve the IVF success rate // *Adv. Clin. Chem.* – 2016. – Vol. 76. – P. 55 – 95.
16. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. / B. Balaban [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol.26 (6). – P.1270–1283.
17. Wong K.M., Repping S., Mastenbroek S. Limitations of embryo selection methods // *Semin Reprod. Med.* – 2014. – Vol.32 (2). – P.127–133.
18. Nagaoka S.I., Hassold T.J., Hunt P.A. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem // *Nat. Rev. Genet.* – 2012. – Vol.13. – P. 493–504.
19. Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy // *Nat. Rev. Genet.* – 2001. – Vol.2. – P. 280–291.
20. Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: a national prospective study. / A.M. Lintsen [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol.22 (9). – P. 2455–2462.

21. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. / J.M. Franasiak [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2014. Vol. 101 (3). – P. 656–663.
22. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. / B. Hodes-Wertz [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2012. Vol.98 (3). – P. 675–680
23. Stephenson M.D., Awartani K.A., Robinson W.P. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case–control study // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol.17(2). – P. 446–451.
24. The impact of biopsy on human embryo developmental potential during preimplantation genetic diagnosis. / D.Cimadomo [et al.] // *BioMed Research International.* – 2016. – Vol.4. – P. 1–10.
25. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. / J. Echten-Arends [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2011. – Vol.17 (5). – P. 620-627.
26. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. / L.E. Northrop [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2010. – Vol.16 (8). – P. 590–600.
27. Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening. / M.Montag [et al.] // *Reprod. Biomed.Online.* – 2009. – Vol. 18 (1). P. 6–11.
28. What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach! / J. Geraedts [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol.25 (3). – P. 575–577.
29. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. / J. Geraedts [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol.26 (11). – P. 3173–3180.
30. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. / S. Munne [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1993. – Vol.8 (12). – P. 2185–2191.

31. A fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. / S. Munne [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 1993. – Vol.10 (1). – P. 82–90.
32. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. / L. Gianaroli [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1999. – Vol.72 (5). – P. 837–844.
33. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. / S. Munne [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2003. – Vol.7 (1). – P. 91–97.
34. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. / S. Munne [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2006. – Vol.85 (2). – P. 326–332.
35. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. / Y. Verlinsky [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol.82 (2). – P. 292–294.
36. ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. / C. Moutou [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2014. – Vol.29 (5). – P. 880–903.
37. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. / C. Staessen [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2004. – Vol.19 (12). – P. 2849–2858.
38. Design and analysis of a randomized controlled trial studying preimplantation genetic screening. / S. Mastenbroek [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol.20 (8). – P. 2362–2363.
39. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. / S. Mastenbroek [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – Vol.357 (1). – P. 9–17.
40. Preimplantation genetic screening for abnormal number of chromosomes (aneuploidies) in in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. / M. Twisk [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2006. – Vol.25 (1).

41. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. / S. Mastenbroek [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2011. – Vol.17 (4). – P. 454–466.
42. No beneficial effect of preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age with a high risk for embryonic aneuploidy. M. Twisk [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol.23 (12). – P. 2813–2817.
43. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. / T. Hardarson [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol.23 (12). – P. 2806–2812.
44. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. / C. Staessen [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol.23 (12). – P. 2818–2825.
45. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. / Z. Yang [et al.] // *Mol. Cytogenet.* – 2012. – Vol.5 (1). – P. 24–34.
46. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. / E.J. Forman [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 100 (1). – P. 100–107.
47. Применение преимплантационного генетического скрининга у бесплодных супружеских пар: собственный опыт. / А.В. Зобова [и др.] // *Материалы XXVI международной конференции Российской ассоциации репродукции человека: тезисы докладов.* – 2016. – С.169-170.
48. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. / R.T. Scott Jr. [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 100 (1). – P. 697–703.
49. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. / Vergouw C.G. [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol.23 (7). – P. 1499–1504.

50. Leese H.J. History of oocyte and embryo metabolism // *Reprod. Fertil. Dev.* 2015. – Vol.27 (4) . – P. 567–571.
51. Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology. / R.L. Krisher [et al.] // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2015. – Vol.27 (4) . – P. 602–620.
52. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. / D. K. Gardner [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol.26 (8). – P. 1981–1986.
53. Gardner D. K., Wale P. L. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol.99 (4) . – P. 1062–1072.
54. The new technologies for the analytical examination of the embryonic metabolome and its prospects. / Crha I. [et al.] // *Ces. Gynek.* – 2012. – Vol.77 (6). – P. 502–506.
55. Botros L., Sakkas D., Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF // *Mol. Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 14(12). – P. 679–690.
56. Wong K., Repping S., Mastenbroek S. Limitations of embryo selection methods // *Semin Reprod. Med.* – 2014. – Vol.32 (3). – P. 127-133.
57. Transfer of blastocysts with deviant morphological and morphokinetic parameters at early stages of in-vitro development: a case series. / A. Stecher [et al.] // *Reprod. Biomed Online.* – 2014. – Vol.28 (4). – P. 424–435.
58. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. / A. Capalbo [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2014. – Vol.29 (6). – P. 1173–81.
59. Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. / Y. Yang [et al.] // *Dev. Dyn.* – 2008. – Vol.237 (9). – P.2315-2327.
60. Mc Callie B., Schoolcraft W.B., Katz-Jaffe M.G. Aberration of blastocyst micro-RNA expression is associated with human infertility // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol.93 (7). – P. 2374–2382.

61. Chen K., Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – Vol.8 (2). – P. 93–103.
62. Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease. / M. L. Finch [et al.] // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2000. – Vol.54. – P. 288–303.
63. Нуклеиновые кислоты: от А до Я / Аппель Б. [и др.]. – М.: Бином: Лаборатория знаний, 2013. – 413 с.
64. Trang P., Weidhaas J.B., Slack F.J. MicroRNAs as potential cancer therapeutics // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27. – P. 52–57.
65. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. / F. Tang [et al.] // *Genes Dev.* – 2007. – Vol.21 (6). – P. 644–648.
66. Carleton M., Cleary M., Linsley P. MicroRNAs and cell cycle regulation // *Cell Cycle.* – 2007. – Vol.6 (17). – P. 2127–2132.
67. MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. / U. Lakshmiathy [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2007. – Vol.16 (6). – P. 1003–1016.
68. Imbar T., Eisenberg I. Regulatory role of microRNAs in ovarian function // *Fertil. Steril.* – 2014. – Vol.101 (6). – P. 1524–1530.
69. Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. / S.D. Fiedler [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2008. – Vol.79 (6). – P. 1030 – 1037.
70. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. / Q. Sang [et al.] // *J. Clin. Endocrinol Metab.* – 2013. – Vol.98 (7). – P. 3068–3079.
71. Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. / L.W. Roth [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2014. – Vol.31 (3). – P. 355–362.

72. Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis. / X.Yang [et al.] // *Reproduction*. – 2012. – Vol.144 (2). – P.235–244.
73. Poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization is associated with altered microRNA expression in cumulus cells. / C.Karakaya [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol.103 (6). – P. 1469–76.
74. MicroRNA expression in the human blastocyst. / E.M. Rosenbluth [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol.99 (3). – P. 855–861.
75. Mc Callie B., Schoolcraft W.B., Katz-Jaffe M.G. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol.93 (7). – P. 2374–2382.
76. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. / A. Capalbo [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2016. – Vol.105 (1). – P. 227–235.
77. Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. / E.M. Rosenbluth [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2014. – Vol.101 (5). – P. 1493–1500.
78. Soluble ligands and their receptors in human embryo development and implantation. / G.A. Thouas [et al.] // *Endocrine Reviews*. – 2015. – Vol.36 (1). – P. 92–130.
79. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. / F. Tang [et al.] // *Genes. Dev.* – 2007. – Vol.21 (6). –P. 644–648.
80. Human blastocyst secreted microRNA regulate endometrial epithelial cell adhesion. / C. Cuman [et al.] // *EbioMedicine*. – 2015. – Vol.2 (10). – P. 1528–1535.
81. Human blastocysts exhibit unique microrna profiles in relation to maternal age and chromosome constitution. / Mc Callie B. [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2014. – Vol.31 (7). – P. 913–919.
82. MiR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure - a pilot study. / E. Borges [et al.] // *JBRA Assist. Reprod.* – 2016. – Vol. 20(4). – P. 200–205.

83. MicroRNA142-3p promotes tumor-initiating and radioresistant properties in malignant pediatric brain tumors. / Y.Y. Lee [et al.] // *Cell. Transplant.* – 2014. – Vol.23 (4-5). – P. 669–690.
84. Crha I., Mádr A., Musilová J., Glatz Z., Záková J., Ventruba P. The new technologies for the analytical examination of the embryonic metabolome and its prospects // *Česká gynekologie.* – 2012. – Bd.77. – S. 502-506
85. Menke T., McLaren A. Mouse blastocysts grown in vivo and in vitro: carbon dioxide production and trophoblast outgrowth // *J. Reprod. Fertil.* – 1970. – Vol.23. – P. 117–127.
86. Gardner D. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture // *Theriogenology.* – 1998. – Vol.49 (1). – P. 83–102.
87. Renard J., Philippon A., Menezo Y. In-vitro uptake of glucose by bovine blastocysts // *J. Reprod. Fertil.* – 1980. – Vol.58. – P. 161–164.
88. Sakkas D., Katz-Jaffe G. M., Sueldo C.E. Gamete and embryo selection: genomics, metabolomics and morphological assessment // *SpringerBriefs.* – 2014. – P. 1–13.
89. Gardner D., Leese H. Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake // *Exp. Zool.* – 1987. – Vol.242 (1). – P. 103–105.
90. Lane M., Gardner D. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol.11 (9). – P. 1975–1978.
91. Leese H.J. Metabolic control during preimplantation mammalian development // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol.1 (1). – P. 63–72.
92. Leese, H.J., Barton A.M. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos // *J. Reprod. Fertil.* – 1984. – Vol.72 (1). – P. 9–13.
93. Brison D.R., Leese, H.J. Energy metabolism in late preimplantation rat embryos // *J. Reprod. Fertil.* – 1991. – Vol.93 (1). – P. 245–251.

94. Noninvasive assessment of human embryonutrient consumption as a measure of developmental potential. / D. K. Gardner [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2001. – Vol.76 (6). – P. 1175–1180.
95. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. / D. K. Gardner [et al.] // *Hum. Reprod.* – Vol.26 (8). – P. 1981–1986.
96. Noninvasive metabolic profiling using microfluidics for analysis of singlepreimplantation embryos. / J.P. Urbanski [et al.] // *Anal. Chem.* – 2008. – Vol.80 (17). – P. 6500–6507.
97. Thouas G., Potter D.L., Gardner D.K. Microfluidic devices for the analysis of gametes and embryo physiology.
98. Gardner DK, Seli E, Wells D, Sakkas D, editors. Human gametes and preimplantation embryos: assessment and diagnosis. New York: Springer; 2013:281–99
99. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. / E. Seli [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol.90 (6). – P. 2031– 2448.
100. Соматоневрология: руководство для врачей / Под ред. А.А. Скромца. – СПб. : СпецЛит, 2009.– 90с.
101. Juneau C., Franasiak J., Treff N. Challenges facing contemporary preimplantation genetic screening // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* – 2016. – Vol.28 (3). – P. 151–157.
102. Katz-Jaffe M.G., Schoolcraft W. B., Gardner D. K. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos // *Fertil. Steril.* – 2006. – Vol.86 (3). – P. 678– 685.
103. Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. / F. Dominguez [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol.93 (3). – P. 774–782.

104. Utilization of a novel ultrasensitivedigital immunoassay platform to measure interleukin-6 in blastocyst culture media. / E. Seidler [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2017. – Vol.107 (3). – P. 16–26.
105. Evaluation of in vitro fertilization outcomes using interleukin-8 in culture medium of human preimplantation embryos. / G. Huang [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2017. – Vol.107 (3). – P. 649–656.
106. Mandy G. Katz-Jaffe, William B. Schoolcraft, David K. Gardner Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertility and Sterility*, Vol. 86, pp.678-685
107. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. /R. R. Gonzalez [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol.85 (12). – P. 4883–4888.
108. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. / A. Cervero [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2005. – Vol.10 (2). – P. 217–223.
109. Katz-Jaffe M.G., McReynolds S. Embryology in the era of proteomics // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol.99 (4). – P. 1073–1077.
110. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Soluble human leukocyte antigen-G and pregnancy success. / C. M. Warner [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2008. – Vol.17 (4). – P. 470–485.
111. Soluble HLA-G in IVF/ICSI embryo culture supernatants does not always predict implantation success: a multicentre study. / J. Tabiasco [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. – Vol.18 (3). – P. 374–381.
112. Embryo selection criteria based on morphology VERSUS the expression of a biochemical marker (sHLA-G) and a graduated embryo score: prediction of pregnancy outcome. / D. J. Kotze [et al.] // *Assist. Reprod. Genet.* – 2010. – Vol.27 (6). – P. 309–316.
113. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. / C. G. Vergouw [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol.23 (7). – P. 1499–1504.

114. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. / R. Scott [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol.90 (1). – P. 77–83.

115. Seli E, Botros L, Sakkas D, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008;90:2183–9. 56.

116. Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007;88:1350–7

117. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. / E. Seli [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol.94 (2). – P. 535–542.

118. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. / C. G. Vergouw [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol.23 (7). – P. 1499–504.

119. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. / C.G. Vergouw [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2012. – Vol.27 (8). – P. 2304–2311.

120. Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture media: a prospective randomized trial. / T. Hardarson [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2012. – Vol.27 (1). – P. 89–96.

121. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. / N. Garrido [et al.] // *Reprod. Biomed. Online* – 2008. – Vol.17 (6). – P. 855–865.

122. Emerging technologies for the molecular study of infertility, and potential clinical applications. / A.C. Varghese [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2007. – Vol.15 (4). – P. 451–456.

123. OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. / R. R. Egea [et al.] // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2014. – Vol.7 (2). – P. 73–92.
124. Edgell T. A., Rombauts L.J., Salamonsen L.A. Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test // *Reprod. Biomed. Online* . – 2013. – Vol.27 (5). – P. 486–496.
125. Bromer J., Seli E. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* – 2008. – Vol. 20 (3). – P. 234–241.
126. Макарова Н.П., Калинина Е. А. Критерии оценки качества ооцитов в циклах ИКСИ: взгляд клинического эмбриолога // *Гинекология*. – 2012. – № 14. – С. 24– 28.
127. Cohen J., Wells D., Munne S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates // *Fertil. Steril.* – 2007. – Vol. 87 (3). – P. 496–503.
128. Громенко Ю. Ю., Исхаков И. Р. Влияние факторов оценки качества перенесенных эмбрионов на прогнозирование частоты наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2012. – № 2. – С. 27–30.
129. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. / Z. Yang [et al.] // *Mol. Cytogenet.* – 2012. – Vol.5 (1). – P. 24–34.
130. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. / S. Alfarawati [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol.95 (2). – P. 520–524.
131. NMR-based metabolomics for understanding the influence of dormant female genital tuberculosis on metabolism of the human endometrium. / E. Subramani [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2016. – Vol.31 (4). – P. 854–865.

132. Amino acid, ammonia and urea concentrations in human pre-ovulatory ovarian follicular fluid. / M. Jozwik [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2016. – Vol.21 (11) . – P. 2776–2782.
133. Daviss B. Growing pains for metabolomics // *The Scientist.* – 2005. – Vol.19 (8). – P.25–28.
134. van der Greef J., Smilde A.K. Symbiosis of chemometrics and metabolomics: past, present, and future // *J. Chemomet.* – 2005. – Vol. 19. – P. 376–386.
135. Gates S.C., Sweeley C.C. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography // *Clin. Chem.* – 1978. – Vol.24 (10). – P. 1663–1673.
136. Novotny M., Soini H., Mechref Y. Biochemical individuality reflected in chromatographic, electrophoretic and mass-spectrometric profiles // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* – 2008. – Vol.866 (1-2). – P. 26–47.
137. HMDB: the human metabolome database. / D.S. Wishart [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol.35. – P. 521–526.
138. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. / G. Palermo [et al.] // *Lancet.* – 1992. – Vol.340 (8810). – P. 17–18.
139. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. / A.C. Van Steirteghem [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1993. – Vol.8 (7). – P. 1061–1066.
140. Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит: современное состояние / Под ред. В.И. Кулакова. – М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2007.– С. 175–236.
141. Navarro-Costa P., Goncalves J., Plancha C. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility // *Hum. Reprod. Update.* – 2010. – Vol.16 (5). – P. 525–542.
142. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. / M. Bonduelle [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol.17 (10). – P. 2600–2614.

143. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. / E. Heytens [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2009. – Vol.24 (10). – P. 2417–2428.

144. Conventional IVF versus ICSI in sibling oocytes: a French experience analysis for BLEFCO. / H. Lucas [et al.] // *Gynecol. Obstet. Fertil.* – 2010. – Vol.38 (9). – P. 515–520.

145. Henkel R.R., Schill W.B. Sperm preparation for ART // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2003. – Vol.1. – P. 111–108.

146. Руководство по вспомогательным репродуктивным технологиям для врачей и эмбриологов. Сделано в МЦПМ / Под ред. В.С. Корсака. – М. : СИМК, 2015.– С. 210–233.

147. Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. / B. Balaban [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2011. – Vol.22 (5). – P. 472–476.

148. Can intracytoplasmic morphologically selected sperm injection be used to select normal-sized sperm heads in infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome. / M.H. Chelli [et al.] // *Fertil.Steril.* – 2010. – Vol.93 (4). – P. 1–5.

149. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. / S. Cayli [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2003. – Vol.7 (4). – P. 462–468.

150. Sperm DNA fragmentation is increased incouples with unexplained recurrent pregnancyloss. / D.T. Carrell [et al.] // *Arch. Androl.* – 2003. – Vol.49 (1). – P. 49–55.

151. Virro M. R., Larson-Cook K. L., Evenson D. P. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol.81 (5). – P. 1289–95.

152. Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology. / P. Prinosilova [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. – Vol.18 (2). – P. 177–83.

153. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. / M. Tachibana [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol.461 (7262). – P.367–72.
154. Mitochondrial DNA disease: new options for prevention. / L. Craven [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2011. – Vol.20. – P. 168–174.
155. Lewis W.H., Gregory P.W. Cinematographs of living developing rabbit-eggs // *Science*. – 1929. – Vol.69 (1782). – P. 226–229.
156. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. / C.C. Wong [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2010. – Vol.28 (10). – P. 1115–1121.
157. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. / J. Conaghan [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol.100 (2). – P. 412–419.
158. Limitations of a time-lapse blastocyst prediction model: a large multicentre outcome analysis. / K. Kirkegaard [et al.] // *Reprod. Biomed. Online*. – 2014. – Vol.29 (2). – P.156–158.
159. Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. / D. Hlinka [et al.] // *Physiol. Res.* – 2012. – Vol.61 (5). – P. 513–525.
160. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. / K. Kirkegaard [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2013. – Vol.28 (10). – P. 2643–2651.
161. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implan. / S. Chamayou [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2013. – Vol.30. – P. 703–710.
162. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. / F. Zegers-Hochschild [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2017. – Vol.108 (3). – P. 393–406.
163. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. / E. Fragouli [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2008. — Vol. 23 (11). — P. 2596–2608.
164. Preimplantation Genetic diagnosis / ed. J. Harper. — Cambridge: University Press, 2009. — 294.

165. Polar body arrayCGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Pt. I: clinical results. / J. Geraedts [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2011. — Vol.26 (11). — P. 3173–3180.

166. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. / A. Capalbo [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2013. – Vol.28 (2). – P. 509–518.

167. The impact of biopsy on human embryo developmental potential during preimplantation genetic diagnosis. / D. Cimadomo [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2016. – Vol. 4 (1). – P. 1–10.

168. Effects of laser polar-body biopsy on embryo quality. / I. Levin [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2012. – Vol.97 (5). – P. 1085–1088.

169. Zakharova E. E., Zaletova V. V., Krivokharchenko A. S. Biopsy of human morula-stage embryos: outcome of 215 IVF/ICSI cycles with PGS // *PLoS ONE.* – 2014. Vol.9 (9). – P. 106–130.

170. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. / K. A. de Boer [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol.82.(2). – P.295–298.

171. Birth of a healthy infant following trophectoderm biopsy from blastocysts for PGD of β -thalassaemia major: case report. / G. Kokkali [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol.20 (7). – P.1855–1859.

172. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. / S. J. McArthur [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2005. – Vol.84 (6). – P.1628–1636.

173. Los F. J., Van O. D., Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model // *Hum. Reprod. Update.* – 2004. – Vol.10 (1). – P. 79–94.

174. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a

prospective randomized controlled trial. / C. Staessen [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2004. – Vol.19 (12). – P. 2849–2858.

175. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. / J. van Echten-Arends [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol.17 (5). – P. 620–627.

176. NMR studies of preimplantation embryo metabolism in human assisted reproductive techniques: a new biomarker for assessment of embryo implantation potential. / S. M. Pudakalakatti [et al.] // *NMR Biomed.* – 2013. – Vol.26 (1). – P. 20–27.

177. Unraveling the association between genetic integrity and metabolic activity in pre-implantation stage embryos. / F. D'Souza [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 1–12.

178. Amino Acid Metabolism in Human Embryos. / P. Drabkova [et al.] // *Physiol. Res.* – 2016. – Vol.65 (5). – P. 823–832.

179. Wale P.L., Gardner D.K. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development // *Biol. Reprod.* – 2012. – Vol. 87 (1). – P. 1– 8.

180. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. / F. D. Houghton [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol.17 (4). – P. 999–1005.

181. A meta-analysis of the impact of human leukocyte antigen-G on the outcomes of IVF/ICSI. / Z. Niu [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2017. – Vol.34 (6). – P. 611–618.

182. MiR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure - A pilot study. / E. J. Borges [et al.] // *JBRA Assist. Reprod.* – 2016. – Vol.20 (4). – P. 200–205.

183. Secretome of the preimplantation human embryo by bottom-up label-free proteomics. / S. S. Cortezzi [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 401. – P. 1331–1339.

184. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. / F. Zegers-Hochschild [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2017. – Vol.32 (9). – P. 1786–1801.