

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

*На правах рукописи*

**АСФАРОВА**  
Гунай Раисовна

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

3.1.4. Акушерство и гинекология

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

**Научный руководитель:**

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

**Москва – 2023**

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1.1. Множественные неудачные попытки в программах лечения бесплодия методами ВРТ: причины и пути решения .....	12
1.2. Роль клеток кумулюса в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов. Сокультивирование эмбрионов человека в программах ВРТ как метод повышения эффективности лечения бесплодия .....	21
1.4. Современные методы оценки культуральных сред в программах лечения бесплодия методами ВРТ .....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1. Материал исследования.....	33
2.2. Дизайн исследования .....	36
2.3. Методы исследования.....	40
2.3.1. Общеклинические методы исследования .....	41
2.3.2. Гормональное исследование .....	42
2.3.3. Ультразвуковое исследование органов малого таза .....	43
2.3.4. Спермиологическое исследование эякулята .....	44
2.3.5. Протокол овариальной стимуляции .....	46
2.3.6. Трансвагинальная пункция фолликулов яичников.....	46
2.3.7. Оплодотворение ооцитов и культивирование эмбрионов .....	47
2.3.8. Поддержка лютеиновой фазы .....	50
2.3.9. Диагностика наступления беременности и оценка частоты живорождения .....	51
2.3.10. Культивирование клеток кумулюса и оценка метаболома методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) .....	51
2.2.11. Статистический анализ полученных данных .....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	54
3.1. Клинико-anamнестическая характеристика супружеских пар, включенных в исследование пациенток.....	54
3.2. Характеристика показателей сперматогенеза супругов пациенток, включенных в исследование.....	61
3.3. Результаты клинического и эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами ВРТ в зависимости от способа культивирования.....	62
3.4. Исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ с учетом особенностей культивирования .....	65

3.5. Оценка метаболомного статуса отработанных культуральных сред с зависимости от способа культивирования .....	72
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	78
ВЫВОДЫ .....	88
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	90
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	94

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Вопросы повышения эффективности лечения бесплодия в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) остаются актуальными, несмотря на успешное развитие методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Для получения положительных результатов в программах ВРТ решающую роль играет количество и качество полученного клеточного материала. Золотым стандартом овариальной стимуляции в программах ВРТ является получение высококачественных ооцитов в адекватном количестве и с минимальными побочными эффектами лекарственных препаратов для лечения бесплодия [111]. Успех проведения программ ЭКО во многом определяется качеством полученного ооцита и выбором эмбриона с высоким имплантационным потенциалом [66], при этом перенос морфологически «хорошего» эмбриона не всегда приводит к наступлению беременности, а в ряде случаев она может прерваться на ранних сроках её развития.

Как известно, одним из основных этапов достижения успеха в программах ВРТ является имплантация эмбриона [8, 2]. Основными причинами нарушения имплантации, помимо качества самого эмбриона, могут быть снижение рецептивности эндометрия или несостоятельность диалога между эндометрием и эмбрионом. Несмотря на последовательный сложный процесс имплантации, который контролируется различными молекулярными факторами, такими, как сигнальные цитокины, факторы роста, молекулы адгезии [1, 19, 166], было отмечено, что в процессе разработки различных сред и при культивировании эмбрионов наблюдается разница между развитием в условиях *in vitro* и естественной средой развития эмбрионов [192]. Культивирование эмбрионов в стандартной для них среде происходит при полном отсутствии ростовых факторов и цитокинов, которые содержатся

в репродуктивном тракте, что может привести к снижению их жизнеспособности и имплантационного потенциала.

Клетки кумулюса — специализированные клетки, которые окружают и питают ооцит в процессе роста и развития. Кумулюсные клетки играют основную роль в двусторонней передаче сигналов к ооциту, важность данных сигнальных путей для производства жизнеспособных гамет не может быть переоценена [5]. Клетки кумулюса формируют непосредственное окружение ооцита и постоянно реагируют на изменения, происходящие в интрафолликулярной среде. Основная функция клеток кумулюса — регуляция транспорта энергетических субстратов в женскую половую клетку за счет оптимизации соотношения лактата/пирувата и регуляции концентрации уровня глюкозы и глутамина [42, 43, 186]. Нарушения молекулярно-биологического профиля в клетках кумулюса могут выступать одной из причин субоптимального ответа яичников на стимуляцию в программах ВРТ.

Принимая во внимание двунаправленную передачу сигналов между ооцитом и кумулюсными клетками, можно предположить, что метаболические процессы в ооцит-кумулюсном комплексе взаимосвязаны и оказывают существенное влияние на созревание, успешное оплодотворение ооцитов и дальнейшее развитие эмбрионов.

По данным научных исследований, сокультивирование эмбриона именно с клетками кумулюса может быть особенно эффективно у пациенток с множественными неудачными попытками ВРТ в анамнезе [21, 88]. Перенос эмбриона в таких программах ВРТ рекомендовано осуществлять с помощью технологии САТ (Cumulus-Aided embryo Transfer), включающий в себя культивирование эмбриона на слое кумулюсных клеток и проведение переноса эмбриона с некоторым количеством разреженных клеток кумулюса [54]. В проведенных исследованиях была показана более высокая частота имплантации при

сокультивировании эмбриона на слое кумулюсных клеток по сравнению с контрольной группой (25,6 и 14,5% соответственно) [21, 88, 159].

Поскольку до настоящего времени не найдено объективных причин отсутствия имплантации морфологически хорошего эмбриона в полости матки у этой, достаточно разнородной, группы пациентов, в клинической практике применяют эмпирические подходы, в частности, улучшение/изменение условий культивирования.

Сокультивирование эмбриона с аутологичными клетками кумулюса повышает результативность программ ВРТ за счет положительного влияния кумулюсных клеток на процессы раннего эмбриогенеза и имплантации эмбриона [88, 105, 148].

Именно клетки кумулюса стимулируют гликолиз, аминокислотный транспорт, биосинтез стиролов в развивающемся эмбрионе и имеют важное значение в цитоплазматическом созревании ооцита. После оплодотворения зигота в течение первых 3 суток остается транскрипционно неактивной. Только на этапе материнско-зиготического перехода происходит активация зиготического генома с одновременной активацией и подавлением нескольких тысяч генов [109]. До активации зиготического генома поддержание необходимого уровня белков и транскриптов для оптимального метаболизма эмбриона осуществляется только благодаря генетическому аппарату ооцита. Показано, что сокультивирование оплодотворенного ооцита с аутологичными клетками кумулюса поддерживает его функционирование в раннем эмбриональном периоде за счет детоксикации среды культивирования и секреции эмбриотропных веществ [63, 150], что также может быть полезно развивающемуся *in vitro* эмбриону.

В связи с вышесказанным, представляется актуальным, современным и перспективным исследование по изучению эффективности программ ВРТ с использованием аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса в рамках программы

лечения бесплодия пациенток с множественными неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

### **Цель исследования**

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

### **Задачи исследования**

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

программах ВРТ с использованием технологии сокультивирования эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса с учетом полученных результатов.

### **Научная новизна**

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

### **Практическая значимость**

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



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

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

### **Личный вклад автора**

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

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

### **Соответствие диссертации паспорту полученной специальности**

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

### **Степень достоверности результатов проведенных исследований**

Диссертационная работа представляет собой исследование, направленное на оптимизацию условий культивирования эмбрионов в программах ВРТ. Изучена клиническая эффективность переноса нативных и криоконсервированных/размороженных эмбрионов при культивировании в однокомпонентной среде с бикарбонатным буфером без добавления клеток кумулюса и с применением сокультивирования с аутологичными клетками кумулюса. Достоверность полученных результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач работы и их решением, достаточной выборкой пациенток, участвующих в исследовании, использованием комплексного подхода к обследованию супружеских пар с множественными неудачными попытками ЭКО в анамнезе в программах лечения бесплодия методами ВРТ, а также корректным применением методов статистической обработки данных.

В рамках работы проведено корректное сравнение полученных результатов с данными современной литературы.

### **Апробация материалов диссертации**

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

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

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

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа написана по традиционному академическому плану и изложена на 121 страницах печатного текста. Состоит из обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицами и 6 рисунками. Библиографический указатель включает 204 литературных источника, из них - 8 русскоязычных и 196 - иностранных.

## **ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ У ПАЦИЕНТОК С ПОВТОРНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ (обзор литературы)**

### **1.1. Множественные неудачные попытки в программах лечения бесплодия методами ВРТ: причины и пути решения**

Бесплодие остается одной из наиболее серьезных и актуальных проблем для супружеских пар во всем мире, поскольку распространенность бесплодия растет с каждым годом, вне зависимости от экономического благополучия страны. Рекомендованным, а зачастую и единственно возможным способом достижения беременности являются вспомогательные репродуктивные технологий (ВРТ). С каждым годом программы ВРТ используются все активнее, разрабатываются новые методы повышения эффективности, однако частота наступления беременности после цикла ВРТ зависит, в первую очередь, от возраста матери и составляет 25–51% при переносе нативного эмбриона и 18–57% — для размороженных эмбрионов [91]. Одним из способов увеличения частоты наступления беременности является перенос нескольких эмбрионов в одном цикле ЭКО/ИКСИ [122, 170]. Однако, данный подход сопряжен с увеличением вероятности многоплодных беременностей и сопутствующими высокими рисками как для матери, так и для ребенка [36, 46]. В последние десятилетия все чаще используется подход избирательного переноса одного эмбриона лучшего качества (elective single embryo transfer, eSET), который позволяет минимизировать возможные риски для матери и плода, но требует тщательной оценки качества эмбрионов для переноса [36].

Одной из наиболее острых проблем, с которыми сталкиваются пациенты в программах ВРТ, являются повторные неудачи имплантации (ПНИ). Для определения ПНИ предусматривались различные факторы, такие как, количество программ ЭКО в анамнезе, качество и количество перенесенных эмбрионов, возраст матери [102]. Однако единого

формального определения ПНИ до сих пор не существует, однако большинством авторов эта патология определяется как неудачная имплантация после нескольких циклов ЭКО/ИКСИ [164]. Так, Orvieto R. предполагает, что о ПНИ можно говорить после 3 неудачных попыток имплантации подряд при условии переноса эмбрионов хорошего качества [143], другие авторы заявляют, что достаточно как минимум 2 переносов эмбрионов хорошего качества [163], а третьи предлагают учитывать состояние не только эмбриона, но и эндометрия [185]. Так в 2014 году Coughlan C. с коллегами определяет ПНИ как неудачу имплантацию после переноса 4 эмбрионов хорошего качества как минимум в 3 циклах ЭКО (нативных или витрифицированных) у женщин в возрасте до 40 лет [29]. Было выделено несколько определений ПНИ, включая различное количество эмбрионов, перенесенных за цикл, или совокупное количество эмбрионов, перенесенных в целом. Существуют разногласия относительно включения или невключения в определение ПНИ переносы криоконсервированных эмбрионов в общее количество эмбрионов. Было высказано предположение, что криоконсервированные эмбрионы не следует включать в определение ПНИ из-за более низкой частоты имплантации по сравнению с переносом нативных эмбрионов [188]. Однако высказывались и противоположные предположения, поскольку перенос замороженных эмбрионов способствует достижению кумулятивной частоты наступления беременности [76, 106, 134].

Рекомендации Европейской ассоциации репродукции и эмбриологии ESHRE в 2023 году описывают повторные неудачи имплантации у отдельно взятой супружеской пары в программе ВРТ с расчетом вероятности биохимической беременности по формуле:  $[\text{вероятность имплантации}]_n = 1 - [(1 - PR)]_n$ , где PR — частота наступления беременности (или коэффициент рождаемости \*1,16). По мнению консенсуса, целесообразно всегда учитывать анамнез супружеской пары,

возраст и другие клинические характеристики, которые могут быть причиной отсутствия имплантации эмбриона у конкретной пары.

Как правило, вероятность имплантации эмбриона составляет около 30 %, и, таким образом, для повышения частоты наступления беременности крайне важно производить отбор эмбриона (эмбрионов) наилучшего качества. Эмбрион на стадии дробления (3 сутки культивирования) оценивался по морфологическим параметрам, как «хорошего качества» при наличии бластомеров одинакового размера с равномерным распределением и фрагментацией менее 10%. Эмбрионы 5-х суток культивирования (бластоцисты) были классифицированы в соответствии с качеством внутренней клеточной массы и трофэктодермы [35]. В связи с более высоким имплантационным потенциалом бластоцисты по сравнению с эмбрионом на стадии дробления, при определении ПНИ учитывается стадия развития переносимого эмбриона [29, 154].

Существует целый комплекс возможных причин и факторов риска повторных неудач имплантации. Одним из главных факторов является материнский возраст [29], поскольку он влияет как на качество эмбриона, так и рецептивность эндометрия. С увеличением возраста повышается частота биохимической беременности и асинхронии эмбриона и эндометрия [100].

По данным комплексного систематического обзора, представленного ESHRE (Европейской ассоциации репродукции и эмбриологии) в западных странах очень распространена тенденция к отложенному материнству [128]. В связи с этим, количество пациенток позднего репродуктивного возраста, планирующих программу ЭКО возрастает, тем самым снижая процент получения собственных ооцитов хорошего качества. У пациенток старше 44 лет около 70% циклов ВРТ проходят с использованием донорских ооцитов (ДО).

Изначально программы ВРТ с использованием донорских ооцитов применялись у пациенток с крайне низким овариальным резервом. С 1989 г. программы с ДО начали использовать у пациенток с бедным ответом, множественными неудачными попытками ЭКО в анамнезе и у пациенток позднего репродуктивного возраста [182]. В 1992 г. было проведено первое клиническое исследование, в котором сравнивали результаты программ ВРТ у женщин старше и моложе 40 лет. У женщин  $\geq 40$  лет с использованием ДО результаты были достоверно лучше, чем у женщин того же возраста, которые использовали свои собственные ооциты [175]. Тем самым женщины позднего репродуктивного возраста, проходившие лечение в программах ВРТ с использованием собственных ооцитов, увеличивают процент ПНИ, в связи с низким количеством и качеством ооцитов, а в последующем — эмбрионов. Поэтому пациенткам позднего репродуктивного возраста рекомендовано проведение программ ВРТ с ДО [68].

Другим важным фактором, влияющим на имплантацию, является индекс массы тела. При избыточном весе и ожирении ( $>25\text{кг/м}^2$ ) отмечается снижение количества и качества ооцитов, снижение вероятности имплантации, повышение частоты невынашивания беременности [55, 131, 144]. Повышенный индекс массы тела считается вторым по важности после материнского возраста фактором риска повторных неудач имплантации и невынашивания беременности [100].

Помимо названных, есть большое количество иных причин, которые могут приводить к повторным неудачам имплантации, такие как материнское курение [24, 44], хронический стресс [136], иммунные нарушения [116, 135, 171], инфекции (хронический эндометрит) [20, 98], различные генетические особенности и патологии [37, 161].

Децидуализация эндометрия представляет собой процесс, при котором происходит дифференцировка стромальных клеток эндометрия. Это имеет принципиальное значение для наступления и пролонгирования

беременности, обеспечивая иммунную толерантность систем матери и плода, а также регуляцию процесса плацентации [103]. В этом отношении влияние различных иммунологических факторов на имплантацию привлекает большое внимание исследователей и клиницистов как к одной из причин ПНИ [29, 149].

Особое внимание клиницисты при лечении супружеским пар с ПНИ обращают на образ жизни. В ходе масштабного опроса, проведенного среди 735 клиницистов и 300 эмбриологов, более двух третей клиницистов сообщили, что при ведении пациенток с ПНИ всегда учитываются факторы образа жизни женщин, принимаемые лекарственные препараты, курение и ИМТ. Диета, стресс и потребление кофеина отмечают в анамнезе женщин с ПНИ около 50% клиницистов. Определенный образ жизни, такой как курение сигарет, употребление алкоголя или кофеина, был ассоциирован с низкими показателями успешности лечения бесплодия методами ВРТ [139].

Важно отметить, что женщины с ПНИ испытывают значительно более высокий уровень психологического стресса по сравнению с фертильными женщинами [30, 189]. В 2015г. Holley S. с соавторами провели проспективное когортное исследование, включающее 174 пациентки с программами ЭКО в анамнезе, участниц неоднократно оценивали на наличие большого депрессивного расстройства (БДР) в течение 18-месячного периода исследования, и 39% женщин соответствовали критериям БДР по крайней мере в одной временной точке [75]. Однако было выявлено, что не было никакой связи между количеством неудачных циклов ЭКО и развитием БДР. Единственным предположением могло быть изучение развития депрессивных симптомов у пациенток, включенных в исследование. Таким образом, была выдвинута гипотеза о том, что сам опыт бесплодия приводит к депрессивным симптомам, а не неудачные попытки ЭКО [189].



В ряде работ было показано, что тип рецепторов, экспрессируемых маточными НК-лимфоцитами матери и их взаимодействие с лейкоцит-антигеном плода, может в значительной степени влиять на способность к имплантации [61, 79, 130], а также на ремоделирование сосудов децидуальной ткани [74]. У пациентов с нарушением имплантации зачастую наблюдается повышенная концентрация маточных НК-лимфоцитов, но при этом в этих клетках снижена концентрация фактора роста эндотелия сосудов и фактора HIF1 $\alpha$ , усиливающего ангиогенез в ответ на гипоксию, что приводит к снижению активности ангиогенеза в целом [17, 152]. Также была отмечена диспропорция в субпопуляциях T-клеток у пациенток с ПНИ [99].

Одним из важнейших факторов имплантации является рецептивность эндометрия. Некоторые авторы указывают, что нарушение рецептивной эндометрия является причиной неудач имплантации в 2/3 случаев [32]. Целый ряд исследований выявил значительные различия в экспрессии генов в эндометрии у пациентов с ПНИ по сравнению с контрольной группой без нарушений [56, 92]. Achahe H. с соавторами показали, что у пациентов с ПНИ нарушен синтез простагландинов, которые играют важную роль в регуляции рецептивности эндометрия [1].

Вопрос о том, связан ли тонкий эндометрий с нарушением рецептивности эндометрия, до сих пор остается предметом дискуссий [165]. Минимальная адекватная толщина эндометрия для прогнозирования успешной имплантации различается в разных исследованиях и составляет от 6 до 8 мм [185,26]. Значительно более высокие показатели имплантации эмбрионов и беременности были продемонстрированы у пациенток с толщиной эндометрия >9 мм по сравнению с пациентками с толщиной эндометрия <9 мм [142,94,168].

Гинекологические заболевания, такие как миомы, полипы, внутриматочные спайки, эндометриоз, аденомиоз и др., также оказывают значительное влияние на процесс имплантации эмбриона. Число

пациентов с ПНИ, у которых были диагностированы различные анатомические нарушения, варьирует от 14 до 57% [114]. Гидросальпинкс также был признан одним из факторов, способствующим ПНИ, из-за негативного воздействия на имплантацию, либо путем прямого токсического воздействия его содержимого на преимплантационный эмбрион, либо механическим путем, вымывая эмбрион из матки. Более того, было показано, что рецептивность эндометрия нарушается при наличии гидросальпинкса из-за аномальной экспрессии цитокинов, необходимых для успешной имплантации [179].

Как известно, такие патологии, как синдром Ашермана и внутриматочная перегородка являются одним из факторов риска привычного выкидыша. Частота имплантации увеличивается после удаления спаек или внутриматочной перегородки [95]. Vomstein К. с коллегами в своем исследовании отметили незначительную разницу выявления внутриматочной перегородки и синехий у пациенток с повторными неудачами имплантации по сравнению с пациентками с привычным спонтанным выкидышем [202].

Помимо материнских факторов для успешной имплантации необходим жизнеспособный эмбрион. Показано, что у пациентов с ПНИ эмбрионы с генетическими аномалиями, такими как, мозаицизм, инверсии, транслокации, делеции встречаются чаще, чем в остальной популяции [161, 187], кроме того, у таких пациентов выше риск комплексных нарушений, затрагивающих большое число хромосом [203].

Роль полиморфизма генов тромбофилии в неудачах имплантации также изучалась. Связь наследственной тромбофилии, антифосфолипидных или других аутоантител при ПНИ были изучены, однако, необходимость проведения скрининга на полиморфизм генов тромбофилии пациенткам с ПНИ до сих пор остается предметом дискуссий [118, 101, 158, 31].

Также в литературе описаны данные, что у пациенток с повышенным уровнем прогестерона лучше сегментировать цикл и проводить криоконсервацию эмбрионов, т.к. повышенный уровень прогестерона оказывает негативное влияние на эндометрий [196,123]. В то же время высокоэффективные протоколы криоконсервации обеспечивают высокую жизнеспособность эмбриона без ущерба для имплантационного потенциала [93,110,169].

В проспективном исследовании 2017 году Magdi Y. с соавторами сравнили программу переноса криоконсервированных/размороженных эмбрионов (n=81) с переносом свежих эмбрионов (n=90) у женщин, у которых было по крайней мере три предыдущих неудачных переноса эмбрионов с  $\geq 4$  эмбрионами хорошего качества. Распределение в эти группы проводилось случайным образом с использованием поочередного распределения. Средняя концентрация прогестерона в сыворотке в день введения препарата ХГЧ существенно не отличалась между двумя группами (1,10 против 1,07 нг/мл). Тем не менее, была значительная разница ( $p=0,005$ ) в вероятности пролонгирования беременности между женщинами в группе криопереноса (40,7%) и женщинами в группе свежего переноса (21,1%). Основываясь на этих результатах, авторы пришли к выводу, что программа криопротокола оказывается более эффективной для пациенток с ПНИ [115].

Несмотря на множество выявленных факторов, возникновение ПНИ в каждом конкретном случае является результатом взаимодействия нескольких причин, которые остаются до конца не выясненными.

Подходы к терапии ПНИ можно разделить на следующие группы:

- коррекция внешних негативных факторов (отказ от курения и алкоголя, снижение уровня стресса, нормализация индекса массы тела);
- подбор оптимального эмбриологического протокола культивирования и переноса: последовательные переносы эмбриона на 2/3 или 5 день; культуральные среды, насыщенные гиалуроновой

кислотой, аутологическое сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса, преимплантационное генетическое тестирование, интрацитоплазматическая инъекция морфологически отобранных сперматозоидов (IMSI), вспомогательный хетчинг и другие.

- иммуномодулирующая терапия для обеспечения иммунотолерантности матери и плода. Данная группа включает в себя лечение глюкокортикоидами, внутривенное введение иммуноглобулинов, прием иммуносупрессоров, циклоспорины [82, 135] .

- применение антикоагулянтов, таких как низкомолекулярный гепарин [155].

- терапия, направленная на повышение рецептивности эндометрия и расширение окна имплантации, которая включает в себя внутриматочное введение моноклеарных клеток периферической крови, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, ХГЧ, плазмы обогащенной тромбоцитами, а также пайпель-биопсию эндометрия перед имплантацией, которая вызывает децидуализацию и выделение цитокинов, повышающих рецептивность [114, 163].

Повторные неудачи имплантации остаются одной из значимых проблем и имеют множество возможных механизмов, что требует индивидуального подхода к лечению с учетом особенностей и анамнеза конкретной пациентки. Несмотря на широкий круг методов, применяемых для терапии ПНИ, необходимы дальнейшие исследования, особенно в области оптимизации условий культивирования на эмбриологическом этапе программ ВРТ, и совершенствования протокола ведения подобных супружеских пар для повышения доли пациентов с успешной имплантацией и последующими родами здоровым ребенком.

## **1.2. Роль клеток кумулюса в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов. Сокультивирование эмбрионов человека в программах ВРТ как метод повышения эффективности лечения бесплодия**

Клетки кумулюса – это клетки, формирующие непосредственное окружение ооцита при созревании фолликула и происходящие из низкодифференцированных предшественников - клеток гранулезы. Наиболее существенным фактором дифференцировки клеток-предшественников кумулюса является изменение соотношения ФСГ/ЛГ в плазме крови [61].

Многочисленные исследования указывают на то, что клетки кумулюса координируют созревание ооцитов с развитием фолликулов, продвигают ядерное и цитоплазматическое ооцитарное созревание, обеспечивают энергией субстраты для возобновления мейотического созревания ооцитов, которое необходимо для формирования пронуклеусов после оплодотворения и дальнейшей способности к развитию [61]. Главная функция кумулюса состоит в обеспечении транспорта сигнальных молекул и метаболитов между ооцитом и тканью яичника. С другой стороны, ооцит в созревающей фолликуле секретирует факторы роста, действующие локально, управляя функцией и дифференцировкой кумулюсных клеток [79].

Кумулюсные клетки играют основную роль в двусторонней передаче сигналов к ооциту, которая является необходимой для производства жизнеспособных гамет [79]. Принимая во внимание двунаправленную передачу сигналов между ооцитом и кумулюсными клетками, предполагается, что состояние метаболических процессов и энергопреобразующих систем в кумулюсных клетках могут отражать уровень метаболизма ооцита, определяющий его способность к дальнейшему созреванию, последующему успешному оплодотворению и дальнейшему развитию эмбриона. Среди генов, дифференциально

экспрессирующихся в кумулюсных клетках при разных условиях, внимание ученых в настоящее время наиболее привлекают гены митохондриального биогенеза в связи с тем, что они являются контролерами точек сопряжения путей дифференцировки и метаболических процессов [65].

Активные формы кислорода (АФК) производятся в здоровом фолликуле во время физиологических процессов и важны для созревания ооцита [52]. Несмотря на свою важную роль, избыточное производство АФК может негативно влиять на фолликул и в последующем на созревание ооцита [73]. В результате окислительного стресса в ооците, а также в клетках кумулюса, генерируется острая воспалительная реакция, вызывающая дисбаланс в выработке факторов роста и цитокинов, что приводит к разрушительному влиянию на репродуктивную систему.

Репродуктивный тракт женщин считается гипоксической средой, где концентрация кислорода колеблется от 2 до 8% [138], тогда как антральный фолликул подвергается воздействию кислорода в концентрациях от 1% до 4% [80].

В исследовании Dunning K. с коллегами обнаружили, что пристеночные клетки и клетки кумулюса содержат большое количество гемоглобина, молекулы с высоким сродством к кислороду [107]. Эти данные согласуются с тем фактом, что, в основном ооцит зависит от окислительного фосфорилирования и цепной реакции переноса электронов для выработки энергии, он расположен внутри антрального фолликула в гипоксической микросреде, в которой доступно только 2% кислорода [80].

Приближенность клеток кумулюса к ооциту и антральному отделу позволяет гемоглобину захватывать малейший доступный кислород для передачи в ооцит и в последующем для окислительного фосфорилирования. Несмотря на то, что окислительное фосфорилирование с последующей цепной реакцией переноса электронов является наиболее эффективным

метаболическим путем производства энергии в эукариотических клетках, но за это он платит высокую цену (IT HAS A HIGH PRICE) - в качестве побочного продукта он производит АФК [70, 71].

АФК необходимы для некоторых биологических процессов, таких как сигнальные молекулы, т.к. они могут вступать в реакцию с биомолекулами - липидами и нуклеиновыми кислотами, вызывая повреждение клеток и окислительный стресс, повреждая ооцит и тем самым снижая его качество [184].

Ооцит не обладает способностью самостоятельно мобилизовать все необходимые механизмы антиоксидантной защиты, эту защиту обеспечивают окружающие клетки кумулюса [183]. Помимо спасения кислорода, гемоглобин обладает и другими чрезвычайно важными функциями в кумулюс-ооцитарном комплексе: он действует как антиоксидантная молекула, способная защищать клетки от окислительного стресса посредством реакций очистки с перекисью водорода ( $H_2O_2$ ) и оксидом азота (NO) [107].

Как известно, окислительный стресс и окислительно-восстановительный дисбаланс играют значительную роль в проблеме бесплодия [1]. Существуют несколько возможных факторов, влияющих на состояние кумулюс-ооцитарного комплекса [160]: *in vivo*, под влиянием образа жизни и физического состояния женщины, *in vitro* во время программы ЭКО. По данным обзора Agarwal A. во время программы ЭКО кумулюс-ооцитарный комплекс подвергается воздействию нескольких потенциальных источников окислительного повреждения [190]. При овариальной стимуляции с применением гонадотропинов происходит созревание сразу нескольких фолликулов и в ходе этого процесса в фолликулах индуцируются многочисленные гены, связанные с воспалением [167]. АФК происходят из воспалительных клеток, которые привлекаются выбросом лютеинизирующего гормона

(ЛГ), а также активацией системы цитохрома P450 в стероидогенных клетках фолликула [53].

Различия в окислительном повреждении и уровне АФК в ооцитах, оплодотворенных с помощью классической техники ЭКО, по сравнению с интрацитоплазматической инъекцией спермы (ИКСИ), позволяют предположить, что клетки кумулюса играют важную роль в защите ооцита от АФК [190]. Техника ИКСИ заключается в отделении клеток кумулюса от ооцита для инъекции одного сперматозоида через иглу непосредственно в яйцеклетку [146]. При оплодотворении методом ЭКО клетки кумулюса, тем самым биологическая защита поддерживается и ооцит сохраняет барьер из антиоксидантов, которые защищают его от внешних источников АФК, повышенного напряжения кислородом [67].

Так Mengden L. с авторами пришли к выводу, что окислительный стресс может быть одной из причин неудовлетворительного качества ооцитов [126].

Считается, что аутологичное сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса повышает эффективность программ ВРТ у пациенток с множественными неудачными попытками ЭКО в анамнезе, т.к. улучшаются качественные характеристики эмбрионов и повышается частота имплантации [21, 88, 148] за счет детоксикации среды культивирования и секреции эмбриотропных веществ, таких как цитокины, факторы роста, стероидные гормоны и интерлейкины [63, 109]. Фидерные клетки метаболизируют глюкозу, находящуюся в культуральной среде, тем самым давая возможность эмбрионам находиться в среде с адекватным для них содержанием сахара [162]. В литературе получены данные об осуществлении процесса сокультивирования на поверхности монослоя пролиферирующих клеток фаллопиевых труб, эндометрия, маточных фибробластов и кумулюсных клеток [12, 84, 85, 117].



Аутологичное сокультивирование клеток кумулюса проводится одновременно с культивированием эмбрионов текущей программы ЭКО [85].

Quinn P., et al. одни из первых провели проспективное исследование, в котором была отмечена разница скорости развития эмбрионов между классическим методом культивирования и сокультивированием с клетками кумулюса. В группе с использованием сокультивирования с клетками кумулюса на 6-е сутки культивирования 98 эмбрионов (45%) из 216 достигли стадии бластоцисты, а в группе с классическим методом культивирования 48 эмбрионов (31%) из 156 достигли стадии бластоцисты [159]. Аналогичная разница развития эмбрионов при использовании классического метода культивирования и сокультивирования с клетками кумулюса была продемонстрирована в исследовании Saito H. et al. [172].

Parikh F.R. с соавторами провели исследование, в котором оценивали влияние аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса и эффективность переноса эмбриона с клетками кумулюса (Cumulus –Aid embryo Transfer, CAT). Осуществление переноса эмбриона с клетками кумулюса в программах ВРТ включает в себя культивирование эмбриона на слое кумулюсных клеток и проведение переноса эмбриона с некоторым количеством разреженных клеток кумулюса. В данное исследование было включено 517 пациенток, которым выполнялась стандартная программа ЭКО/ИКСИ. Далее пациентки были разделены на 2 группы: группа А из 267 пациенток с проведением аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса и переносом эмбриона методом CAT и группа В — 250 пациенток с классическим культивированием. Различий в средних возрастных группах, клинико-anamнестических данных и показаниях для использования методов ВРТ в обеих группах не было обнаружено. В группе А было получено 1489 ооцитов (5,6 ооцитов / цикл), из них 1266

(85%) были на стадии метафазы II. Перенос эмбрионов (от 2 до 4 эмбрионов) проводили на 3 сутки развития. В группе В было получено 1533 ооцита (6,1 ооцитов / цикл), из них 1225 (79,9%) были на стадии метафазы II. Показатели оплодотворения и дробления в группе А составили 73,1% и 100%, а в группе В - 71,8% и 100% соответственно. Среднее количество эмбрионов, перенесенных пациенткам в группах А и В составляло, соответственно, 3,1 и 3,2. Показатели частоты наступления беременности и имплантации в группе А составили 47,6% и 25,6%, а в группе В — 34% и 14,5%. Таким образом, исследование продемонстрировало значительное увеличение показателей частоты имплантации (25,6% против 14,5%,  $p > 0,001$ ), и наступления беременности (47,6% против 34%,  $p > 0,01$ ). Показатели наступления многоплодной беременности были сопоставимы в группах А ( $n=49$ , 38,6%) и В ( $n=28$ , 32,9%). Более высокая частота наступления беременности была в группе А по сравнению с группой В (18,1% против 2,4%,  $P > 0,01$ ). Данное исследование продемонстрировало эффективность аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса и переноса эмбрионов в полость матки методом САТ [148].

В 2012 году Benkhalifa М. с соавторами провели рандомизированное проспективное исследование. В исследование были включены 432 пациентки, имеющие не менее трех неудачных попыток ЭКО в анамнезе. Проводилась стандартная программа ЭКО/ИКСИ. Культивирование эмбрионов проводилось классическим методом и методом сокультивирования с клетками кумулюса, перенос осуществлялся на 3 или 5-6 сутки развития. Также была исследована экспрессия лейкемия – ингибирующего фактора (LIF) и фактора активации рецепторов тромбоцитов (PAF-R) на 3-й день сокультивирования с клетками кумулюса [15].

Статистический анализ полученных данных продемонстрировал разницу в показателях имплантации и развития клинической

беременности между классическим методом культивирования и сокультивированием, а также переносом на 3-й или 5-6 день. Частота наступления клинической беременности не отличалась в случае сокультивирования и классического метода культивирования с переносом на 3 (30,5% против 27,7%,  $p=0,65$ ) или 5 сутки (46,3% против 41,5%,  $p=0,41$ ). С другой стороны, отмечались различия между переносом на 3 и 5 дни в зависимости от того, использовалось сокультивирование (30,5% против 46,3%,  $p=0,02$ ) или же классический метод культивирования (27,7% против 41,5%,  $p=0,04$ ). Наибольшая разница отмечалась между переносом эмбриона на 5 день с использованием метода аутологичного сокультивирования с клетками кумулюса и переносом эмбриона на 3 день с классическим методом культивирования (46,3% против 27,7%,  $p<0,01$ ). Молекулярный анализ показал, что клетки кумулюса участвуют в экспрессии генов LIF и PAF-R и подтвердили возможную положительную роль факторов роста и цитокинов на раннем этапе развития эмбрионов [15].

По данным исследования Karakaya S. et al. было выявлено, что «бедный» ответ у женщин в программе ЭКО ассоциирован с изменением экспрессии микроРНК в клетках кумулюса. Анализ экспрессии микроРНК продемонстрировал повышение экспрессии 16 микроРНК и снижение экспрессии 88 микроРНК у пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию.

Экспрессия микроРНК-21-5p была значительно повышена в образцах клеток кумулюса, полученных у пациенток с «бедным» ответом, в то время как экспрессия микроРНК-21-3p у них же была значительна ниже. В данном исследовании было продемонстрировано, что «бедный» ответ на овариальную стимуляцию связан с изменением экспрессии микроРНК в клетках кумулюса, в частности, с повышением уровня экспрессии микроРНК-21-5p [87].

Следует отметить, что апоптотическая активность в клетках кумулюса зависит от возраста женщин, а также связана с числом полученных при пункции ооцитов, их оплодотворением и наступлением беременности в результате ЭКО/ПЭ. Результаты одного из исследований свидетельствуют о том, что возможно использование клеток кумулюса для прогнозирования качества ооцитов, исхода ЭКО/ПЭ. В 34 циклах ЭКО у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и бесплодием неясного генеза, было аспирировано 330 ооцитов, из них 91 зрелый ооцит с клетками кумулюса.

Распространенность апоптоза кумулюсных клеток оценивали с помощью набора флуоресцеина (АРОРТЕСТ-FITC). Полученные эмбрионы сокультивировали с аутологичными клетками кумулюса. Процесс апоптоза клеток кумулюса был более выражен у группы пациенток старше 40 лет со сниженным овариальным резервом и «бедным ответом» на овариальную стимуляцию по сравнению с группой женщин с удовлетворительным ответом на овариальную стимуляцию [104].

Vithoukias A. et al. полагают, что существенные улучшения условий культивирования эмбрионов в программах ЭКО можно достичь благодаря использованию клеток кумулюса [201]. Положительное влияние сокультивирования проявлялось в ускоренном расщеплении, снижении клеточного апоптоза и увеличении количества бластоцист высокого качества.

Показано, что сокультивирование эмбриона повышает частоту имплантации и наступления беременности у женщин с повторными неудачами имплантации [201].

В исследовании Vithoukias A. et al. [201] эмбрионы культивировались с (1 группа) и без (2 группа) аутологичных кумулюсных клеток. Авторами было установлено, что в условиях сокультивирования дробление эмбрионов на ранних стадиях развития

ускорялось, при этом бластомеры были более схожего размера, улучшалась морфология эмбрионов, что приводило к увеличению количества эмбрионов 1 класса и бластоцист, пригодных для криоконсервации. С другой стороны, культивируемые эмбрионы в классической среде показали снижение темпов роста с неравными бластомерами и фрагментацией клеток. Общее количество эмбрионов 1 класса было существенно снижено. Кроме того, авторы получили значительное увеличение количества бластоцист 1 класса, полученных при сокультивировании, по сравнению с классическим методом культивирования (65% против 35,4%). Ранее при классическом методе культивирования общий показатель наступления беременности составлял 24%. С момента введения аутологичного сокультивирования в ЭКО общий показатель беременности увеличился до 36%. Результаты данной работы согласуются с другими аналогичными исследованиями, где кумулюсные клетки были использованы для совместного культивирования эмбрионов в программах ВРТ [201].

Факторы роста, секретируемые клетками кумулюса при совместном культивировании, частично ответственны за положительный эффект, наблюдаемый при развитии эмбрионов в программах ЭКО. В исследовании Vithoulkas A. et al. были обнаружены высокие концентрации VEGF-A (Vascular endothelial growth factor-A) и VEGF-C (Vascular endothelial growth factor-C). Выявлено, что эмбрионы при классическом методе культивирования не синтезируют эти два фактора роста, тогда как эмбрионы при аутологичном сокультивировании способны синтезировать VEGF-A и VEGF-C [201].

Таким образом, клетки кумулюса могут стать надежной моделью для понимания составляющих качества ооцитов, овариальной стимуляции, оценки развития эмбриона, частоты наступления клинической беременности и рождения здорового ребенка в программах ВРТ [47, 57, 121, 194].

#### **1.4. Современные методы оценки культуральных сред в программах лечения бесплодия методами ВРТ**

Согласно морфологическим критериям оценка качества эмбрионов (по системе Gardner D.R., 1999) является наиболее общеустановленным методом выбора для селективного переноса эмбрионов в полость матки, но имеет недостаточную достоверность определения возможности наступления и прогрессирования беременности. Как известно, данная методика носит субъективный характер, так как оценка эмбрионов проводится клиническим эмбриологом на основании скорости развития и количества клеток, симметрии и степени фрагментации, а изменение морфологии раннего развития эмбриона происходит однократно, поэтому сложно оценить истинный потенциал развития эмбриона [4, 137]. По данным литературы не все эмбрионы «отличного» и «хорошего» морфологического качества успешно имплантируются, а также могут иметь анеуплоидный набор хромосом, а эмбрионы «удовлетворительного» качества приводят к наступлению беременности и живорождению [108, 156].

Для достоверности такой оценки метод Gardner D. дополняется динамическим измерением различных морфокинетических параметров на протяжении всего времени культивирования с помощью методов световой микроскопии, а также методами сравнения на основе глубокого машинного обучения [96, 127, 141]. В то же время известно, что морфологическая оценка зачастую не гарантирует успешную имплантацию и таким образом является недостаточной для разрешения ситуации выбора между несколькими эмбрионами высокого морфологического качества для переноса одного из них [132, 204]. Ранее было показано, что эмбрионы с анеуплоидным кариотипом также могут иметь «отличное» морфологическое качество, успешно имплантироваться и приводить к беременности. Таким образом, морфологическая оценка эмбрионов различными методами не является

альтернативой предимплантационному генетическому тестированию [58, 59, 176, 14], которое, в свою очередь сопряжено с рядом рисков для эмбриона [25, 119, 177].

Эти и другие ограничения методов морфологической оценки качества и генетического скрининга способствовали активному поиску и разработке новых, неинвазивных подходов для оценки качества эмбрионов и их способности к имплантации путем анализа их биохимических и молекулярных особенностей. Одним из таких перспективных неинвазивных методов является измерение концентрации различных интермедиатов биохимических процессов в отработанной среде культивирования, таких как аминокислоты, пируват, лактат, различных белков и гормонов [40, 60, 77, 174]. Ранее метаболом эмбриональных сред культивирования исследовался с помощью методов спектроскопии (ЯМР-, Рамановской и инфракрасной спектроскопии) [78, 140], а также газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией [97].

Использование сред культивирования позволяет избежать большого количества проблем и рисков, в том числе этических, связанных с исследованием непосредственно эмбриона. В то же время, эмбрион в ходе протекающих в нем биохимических процессов непрерывно поглощает компоненты среды и выделяет в нее продукты жизнедеятельности. Таким образом, молекулярный состав сред и его изменения позволяют получить представление о метаболической активности самого эмбриона и, таким образом, оценить его жизнеспособность и предположить вероятность имплантации.

Одним из наиболее мощных и универсальных методов метаболомного профилирования, наряду с ЯМР-спектроскопией, является связка из методов разделения сложных смесей с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с последующей детекцией в них метаболитов с помощью масс-

спектрометрии (МС). ВЭЖХ-МС исследования очень эффективны как для профилирования, так и для таргетного поиска метаболитов. В нашей работе ВЭЖХ-МС методика использовалась для изучения сред культивирования клеток кумулюса, а также самих клеток кумулюса, с целью выявления молекулярного состава и возможных особенностей метаболизма этих клеток, обеспечивающих взаимодействие с ооцитом, а также благотворный эффект на развитие и имплантацию эмбриона при методе сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса.



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материал исследования

Научное исследование было выполнено на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель отделения — доктор медицинских наук, профессор Калинина Елена Анатольевна) Института репродуктивной медицины (директор — доктор медицинских наук, профессор Назаренко Татьяна Алексеевна) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор — академик РАН, профессор, доктор медицинских наук Сухих Геннадий Тихонович). Набор пациентов с бесплодием в программах ВРТ проводили в соответствии с поставленной целью и задачами в период с марта 2017 г. по январь 2019 г. Лабораторная часть диссертационной работы была осуществлена сотрудниками лаборатории молекулярной патофизиологии (руководитель лаборатории — кандидат химических наук Бобров Михаил Юрьевич) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор — академик РАН, профессор, доктор медицинских наук Сухих Геннадий Тихонович).

**Критерии включения** пациенток в исследование были следующие.

- Отсутствие противопоказаний лечению бесплодия методами ВРТ согласно Приказу Минздрава России №107н от 30 августа 2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».
- Возраст пациентки от 18 до 40 лет.
- Регулярный менструальный цикл.

- Нормальное анатомическое строение матки.
- Сохраненный овариальный резерв (базальный уровень ФСГ менее 12 мМЕ/мл, АМГ не менее 1,0 нг/мл; по данным УЗИ органов малого таза не менее 5 антральных фолликулов в каждом яичнике).
- Женский фактор бесплодия (трубно-перитонеальный, неясного генеза, наружный генитальный эндометриоз I или II стадий распространения).
- Невыраженный мужской фактор бесплодия (субфертильная сперма супруга, незначительное снижение показателей концентрации, подвижности сперматозоидов).
- Не менее 2 неудачных попыток ЭКО в анамнезе (не менее двух программ переноса эмбрионов в полость матки, в том числе переноса размороженных эмбрионов удовлетворительного качества в полость матки).
- Подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

***Критерии невключения в исследование:***

- Врожденные пороки развития внутренних половых органов (включая состояния после хирургической коррекции) или приобретенные деформации полости матки, при которых невозможна имплантация эмбрионов или вынашивание беременности.
- Соматические и психические заболевания, являющиеся противопоказаниями для лечения в программе ВРТ, вынашивания беременности и родов.
- Отягощенный акушерско-гинекологический анамнез (эндометриоз III-IV стадии распространения, миома матки больших размеров (миома матки более 4 см в диаметре или центрипетальный рост узла и др.).

- Хронические заболевания любой локализации в стадии обострения.
- Острые воспалительные заболевания любой локализации.
- Опухоли яичников (любой этиологии).
- Сниженный или крайне низкий овариальный резерв (получение менее 2 ооцитов в день трансвагинальной пункции яичников)
- Выраженные формы нарушений сперматогенеза, в том числе оплодотворение сперматозоидами, выделенными из ткани яичка при хирургическом вмешательстве.

***Критерии исключения из исследования:***

- Отсутствие динамики роста фолликулов на фоне овариальной стимуляции.
- Отсутствие ооцитов, пригодных для оплодотворения, после проведения трансвагинальной пункции яичников.
- Отсутствие сперматозоидов в эякуляте в день трансвагинальной пункции фолликулов.
- Менее 2 зигот после оценки оплодотворения.

В настоящее научное исследование было включено 303 супружеские пары, обратившихся по поводу проведения программы ЭКО/ИКСИ, из которых 105 пациенток — с переносом эмбриона в цикле овариальной стимуляции и 198 — с переносом эмбриона в криоцикле. Все участники подписали письменное информированное добровольное согласие на участие в данном исследовании.

Настоящее исследование было одобрено на заседании комитета по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ.

## 2.2. Дизайн исследования

Диссертационная работа представляет собой когортное проспективное исследование. Для решения задачи 1 были оценены клиничко-анамнестические данные супружеских пар, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ. Для решения задачи 2 дизайн представлен на рисунке 1.



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

**Конечными точками для 1 задачи** являлись клинический анамнез женщины, показатели гормонального профиля, параметры эякулята.

**Конечными точками для 2 задачи** были выбраны следующие эмбриологические параметры:

- количество полученных бластоцист (5-е сутки культивирования) в выделенных группах;

- качество полученных бластоцист (отличного, хорошего, удовлетворительного и неудовлетворительного качества).

Неравномерное деление полученных зигот пациентки в соотношении 2/3 было выбрано в связи с отсутствием убедительных доказательств в опубликованной литературе о положительном влиянии аутологичных клеток кумулюса на эмбриологические и клинические параметры программ лечения бесплодия методами ВРТ.

Для оценки клинических исходов программ лечения бесплодия методами ВРТ при переносе нативного эмбриона в полость матки был разработан дизайн, указанный на рисунке 2. Были проанализированы супружеские пары, в которых женщинам был произведен перенос 1 эмбриона в полость матки, всего 105 пациенток из 127 супружеских пар. У 58 женщин был осуществлен перенос эмбриона после сокультивирования в аутологичными клетками кумулюса, у 47 - перенос эмбриона при культивировании без добавления клеток кумулюса. У 22 женщин эмбрионы были криоконсервированы по причине неготовности эндометрия и осуществлен перенос криоконсервированного/размороженного эмбриона в полость матки.

Культивирование в обеих группах проводилось в одинаковых сертифицированных средах (однокомпонентная среда с бикарбонатным буфером Irvine-1 step (single step)).

Пациентки были разделены на 2 группы по типу культивирования эмбриона как в нативных, так и в циклах переноса криоконсервированных/размороженных эмбрионов, а затем стратифицированы по возрасту:

Группа 1 - женщины, у которых проведено культивирование эмбриона по методике сокультивирования с аутологичными клетками кумулюса с последующим переносом эмбриона в полость матки.

Группа 2 - женщины, у которых проведено культивирование эмбриона без применения сокультивирования с аутологичными клетками кумулюса с последующим переносом эмбриона в полость матки.



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

Дополнительно были проанализированы исходы переносов криоконсервированных/размороженных эмбрионов при различных типах культивирования. Дизайн представлен на рисунке 3. Была оценена эффективность циклов переноса криоконсервированных/размороженных эмбрионов в разных возрастных группах.



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

**В качестве конечных точек выбраны:**

- частота наступления беременности, %;
- частота живорождения в расчете на беременность, %.
- относительный риск живорождения в зависимости от типа культивирования эмбрионов.

Для решения задачи 4 и оценки метаболомного профиля отработанных культуральных сред с клетками кумулюса было выполнено проспективное исследование, описанное ниже.

**2.3. Методы исследования**

Перед вступлением в программу лечения бесплодия методами ВРТ было проведено предварительное клинико-лабораторное обследование супружеских пар в соответствии с приказом Минздрава России от 30.08.2012 г. №107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Общеклинические и специальные методы обследования:

1. определение группы крови и резус-фактора;
2. выявление антител класса IgM, IgG к ВИЧ, HBS-антигена, антител к HCV, реакция Вассермана у обоих супругов;
3. клинический анализ крови;
4. биохимический анализ крови;
5. анализ крови на гормоны на 2–3-й день менструального цикла: эстрадиол, ФСГ, ЛГ, пролактин, ДГЭА-С, тестостерон, ТТГ, кортизол, Т<sub>4</sub>св, 17-ОП, СТГ, АМГ, прогестерон;
6. выявление в крови IgM и IgG к вирусу краснухи, вирусу простого герпеса I и II типов цитомегаловируса, токсоплазма;
7. молекулярно-биологическое исследование на вирус простого герпеса 1-го и 2-го типов и цитомегаловирус в крови;



8. гемостазиограмма;
9. общий анализ мочи;
10. мазок на степень чистоты из влагалища;
11. кольпоскопия и цитологическое исследование шейки матки;
12. исследование на инфекции, передающиеся половым путем (ИППП) методом ПЦР: хламидиоз, уреаплазмоз, микоплазмоз, трихомониаз, вирусы простого герпеса (1-го и 2-го типов), ВПЧ 16,18 типов;
13. бактериоскопическое исследование отделяемого влагалища, уретры и цервикального канала;
14. флюорография легких (для женщин, не проходивших это исследование более 12 месяцев);
15. ультразвуковое исследование органов малого таза;
16. ультразвуковое исследование молочных желез – женщинам до 35 лет. При выявлении по результатам исследования признаков патологии молочной железы — консультация маммолога, пациенткам старше 35 лет — маммография;
17. электрокардиограмма;
18. заключение терапевта о состоянии здоровья пациентки;
19. УЗИ щитовидной железы
20. спермограмма по нормативам ВОЗ;

### **2.3.1. Общеклинические методы исследования**

При первичной консультации у каждой пациентки был произведен сбор анамнестических данных с учетом наследственности, вредных привычек, наличия профессиональных вредностей, аллергологического анамнеза, наличия соматических патологий и перенесенных заболеваний, а также особый акцент был сделан на гинекологический и репродуктивный анамнез, которые включали:

- возраст менархе, период становления менструального цикла, характер, регулярность и продолжительность менструального цикла;
- возраст начала половой жизни, использование методов контрацепции и длительность приема;
- гинекологические заболевания в анамнезе (ИППП, хронический эндометрит, миома матки, аденомиоз, НГЭ, СПКЯ, внутриматочные синехии, внутриматочные перегородки, полипы, доброкачественные/злокачественные образования яичников);
- данные о перенесенных оперативных вмешательствах на органах малого таза
- количеству беременностей, осложнения во время беременности, исходы
- программы ВРТ в анамнезе (протокол овариальной стимуляции, количество полученных ооцитов в день трансвагинальной пункции фолликулов, метод оплодотворения ооцитов, количество и качество эмбрионов при переносе в полость матки, исход программы ВРТ, а также число криоконсервированных эмбрионов, исход криопротоколов.

На этапе подготовки перед вступлением в программу ВРТ всем женщинам проводили измерение длины и массы тела с целью расчета индекса массы тела (ИМТ) по формуле Кетле:  $ИМТ = \frac{\text{масса тела}}{\text{рост}^2}$  (кг/м<sup>2</sup>).

### **2.3.2. Гормональное исследование**

Исследование гормонального статуса проводили на 2–5-й день менструального цикла при вступлении в протокол лечения. Нормативные значения указаны в таблице 1.

**Таблица 1. Нормативные показатели параметров гормонального профиля женщин репродуктивного возраста**

<b>Наименование показателя</b>	<b>Нормативные показатели</b>
ФСГ	3,0–10,0 МЕ/л
ЛГ	3,0–8,0 МЕ/л
АМГ	1,0–4,5 нг/мл
E <sub>2</sub>	150–450 пмоль/л
ПРЛ	120–500 мМЕ/л
К	200–500 нмоль/л
T <sub>св</sub>	1,0–2,5 нмоль/л
ДЭА-С	0,9–11,7 мкмоль/л
ТТГ	1,0–3,0 мМЕ/л
T <sub>4св</sub>	10,0–25,0 пмоль/л
СТГ	0,15–13,0 мМЕ/л
17-ОП	0,3–3,0 нмоль/л
Прогестерон(лютеиновая фаза цикла)	16–95 нмоль/л

### **2.3.3. Ультразвуковое исследование органов малого таза**

УЗИ органов малого таза выполняли на аппарате «Brulle Kierre» (Siemens, Германия) с использованием трансвагинального датчика частотой 7,5 МГц. Исследование проводили пациенткам с опорожненным мочевым пузырем. Для обеспечения стерильности использовался одноразовый презерватив. Во время ультразвукового исследования оценивали размер, форму и положение матки, структуру миометрия, толщины и структуры эндометрия, размеры и объем яичников, количество антральных фолликулов в яичниках, наличие или отсутствие объемных образований в полости малого таза.

В день начала овариальной стимуляции препаратами гонадотропинов на 2–5-й день менструального цикла (в зависимости от выраженности фолликулярного аппарата пациентки) выполняли УЗИ органов малого таза, далее на 5–6-й день овариальной стимуляции с целью определения даты начала введения препарата ант-ГнРГ и возможной коррекции дозы вводимого препарата, затем один раз в 2–3 дня с целью контроля динамики роста фолликулов и эндометрия для решения вопроса о назначении триггера финального дозревания ооцитов.

#### **2.3.4. Спермиологическое исследование эякулята**

Анализ эякулята назначался дважды: на предварительном обследовании в рамках подготовки к программе ВРТ и в день трансвагинальной пункции фолликулов яичников (ТВП). Перед сдачей эякулята мужчинам был рекомендован соответствующие рекомендации: половой режим, исключение алкоголя, прием лекарственных препаратов, посещение сауны, бани, горячего душа. Сбор материала производился путем мастурбации после 3–4 дней полового воздержания в стерильный пластиковый контейнер для сбора эякулята. При анализе эякулята оценивали концентрацию сперматозоидов, подвижность, наличие морфологических изменений сперматозоидов, количество лейкоцитов, а также количество и типы незрелых клеток сперматогенеза. Оценка параметров спермограммы производилась в соответствии с нормативами ВОЗ (2010), представленные в таблице 2.

Для оценки патологии эякулята руководствовались следующими критериями (ВОЗ, 2010): аспермия — отсутствие эякулята; азооспермия — отсутствие сперматозоидов в эякуляте; олигозооспермия — снижение концентрации сперматозоидов ниже  $<15$  млн/мл; астенозооспермия — снижение подвижности сперматозоидов ниже нормальных значений (общая подвижность  $<40\%$ , сперматозоиды с прогрессивным движением  $<32\%$ ); тератозооспермия — повышение количества сперматозоидов с аномальной морфологией ( $>96\%$ );

Таблица 2. **Нормативные показатели спермограммы**

<b>Показатель</b>	<b>Норматив, единицы измерения</b>
Общий объем эякулята	>1,5 мл
pH	≥7,2
Вязкость	0,1–2,0 см
Время разжижения	<60 мин
Концентрация лейкоцитов	<1 млн/мл
Концентрация сперматозоидов	>15 млн/мл
Общее количество сперматозоидов	>40 млн
Подвижность сперматозоидов, PR%	Общая подвижность сперматозоидов ≥40% Сперматозоиды с прогрессивным движением ≥32%
Морфология	≥4% нормальных форм
Жизнеспособность сперматозоидов	≥58% живых сперматозоидов
Агглютинация	Отсутствует
Клетки сперматогенеза	2–4 клетки в поле зрения (x40)

Среди патозооспермии выделяли субфертильную сперму и тяжелую патозооспермию. Критерии тяжелой патологии сперматогенеза: концентрация сперматозоидов до 12 млн/мл, сперматозоиды с прогрессивным движением (PR%) — менее 29%, количество патологических форм более 97%. Сперму расценивали как субфертильную при концентрации сперматозоидов 12–15 млн/мл, наличии более 29% сперматозоидов с прогрессивным движением (PR%) — 30–32% и 97% патологических форм. Мужчины с тяжелыми нарушениями сперматогенеза исключались из исследования.

### **2.3.5. Протокол овариальной стимуляции**

Проведение овариальной стимуляции начинали со 2–5 дня менструального цикла. Овариальная стимуляция у всех пациенток проводилась по протоколу с использованием препаратов гонадотропинов и антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ), объем стартовой дозы гонадотропинов назначался индивидуально в зависимости от возраста пациентки, ИМТ, параметров гормонального статуса и овариального резерва. При ультразвуковом исследовании определяли динамику роста фолликулов, при необходимости производили коррекцию дозы вводимых гонадотропинов. При достижении лидирующим фолликулом диаметра 14 мм с целью предотвращения преждевременного пика ЛГ назначали введение препарата ант-ГнРГ в дозе 0,25 мг/сут, далее при достижении фолликулами размеров 18–20 мм для финального дозревания ооцитов вводили триггер овуляции - препарат человеческого хорионического гонадотропина (ХГЧ) в стандартной дозе 10 000МЕ за 36 часов до запланированной трансвагинальной пункции фолликулов.

### **2.3.6. Трансвагинальная пункция фолликулов яичников**

Пункцию фолликулов яичников проводили через 35–36 часов после введения овуляторной дозы ХГЧ в асептических условиях операционной под кратковременным внутривенным обезболиванием женщины и ультразвуковым контролем яичника с использованием одноразовых игл (Vitrolife, Швеция) транвагинальным доступом с подписанным информированным добровольным согласием на медицинскую процедуру в присутствии врача-анестезиолога.

Фолликулярную жидкость аспирировали при отрицательном давлении 140–150 мм водного столба в стерильные пробирки с последующей немедленной передачей эмбриологу для последующей

идентификации ооцит-кумулюсного комплекса и оценки степени зрелости полученных ооцитов.

### **2.3.7. Оплодотворение ооцитов и культивирование эмбрионов**

Полученные ооцит-кумулюсные комплексы собирали в культуральной среде с буфером HEPES (Gamete Buffer, COOK, Ирландия) с последующим помещением биологического материала в культуральную бикарбонатную среду (CSCM, Irvine Sc., USA).

Оплодотворение проводили методом ИКСИ в связи с субфертильными параметрами эякулята и исключения конфаундеров. Перед началом процедуры после периода предварительной инкубации выполняли денудирование ооцитов, а именно их ферментативное очищение от клеток кумулюса при помощи раствора гиалуронидазы в течение 20 секунд (Irvine Sc., USA). Далее, ооциты отмывали в среде Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA) и возвращали в лунки 4-луночного культурального планшета. Сразу после денудации проводили на большом увеличении (x400) под инвертированным микроскопом оценку зрелости полученных женских гамет. Выделяли следующие градации степени зрелости (рекомендации РАРЧ):

- GV — герминативный везикул, или стадия зародышевого пузырька; характеризуется наличием видимого большого ядра, которое содержит 1–2 нуклеоли;
- MI — незрелый ооцит на стадии мейоза метафаза I; не определяются ни полярное тельце, ни ядро;
- MII — зрелая гаплоидная яйцеклетка на стадии мейоза метафаза II; четко визуализируется под блестящей оболочкой одно полярное тельце.

Для оплодотворения методом ИКСИ использовали только зрелые ооциты на стадии МII. Этапы ИКСИ, согласно принятым стандартным операционным процедурам, включали:

1. выбор сперматозоида и его иммобилизация посредством перетиранья жгутика;
2. захват выбранного сперматозоида в инъекционную пипетку;
3. фиксация и поворот ооцита с целью локализации полярного тельца в положении 6 или 12 ч;
4. введение сперматозоида с аспирированной ооплазмой в ооцит.

Сразу после окончания процедуры ИКСИ оплодотворенные ооциты переносили в культуральную среду Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA) с целью дальнейшего культивирования. Культивирование зигот и эмбрионов проводили до 5 суток в условиях инкубатора — 5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub>, 37°C.

Через 16–18 часов после процедуры оплодотворения наличие двух четко различимых пронуклеусов (2PN) свидетельствовало о нормальном оплодотворении ооцита. Аномально оплодотворившийся ооцит диагностировали при содержании в нем 3-х и более пронуклеусов.

В клинической части работы у 127 женщин все полученные зиготы (2PN2PB) были разделены на 2 группы (2/3): группа 1 — сокультивирование эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса, группа 2 (сравнения) — стандартное культивирование. Классический метод культивирования эмбрионов проводили в индивидуальных каплях сред (Irvine CSC, USA) одинакового объема (25 мкл), покрытых маслом. Сокультивирование выполняли следующим образом: при трансвагинальной пункции фолликулов от ооцит-кумулюсного комплекса стерильным скальпелем отрезали под маслом небольшое число клеток кумулюса (2мм\*2мм), которые 24 часа держали отдельно от ооцитов. В день оценки зигот и выделения группы сравнения данные



клетки кумулюса помещали в каплю 25 мкл под маслом, куда также помещали нормально оплодотворенную зиготу. К каждой зиготе в капле были добавлены клетки кумулюса, которые совместно культивировали до 5 суток без смены среды.

На 5 сутки культивирования производили морфологическую оценку полученных эмбрионов в двух группах с последующим переносом «лучшего» (из любой группы). Эмбрионы 5-х суток развития оценивали согласно классификации, рекомендованной РАРЧ. Кратко: анализировали степень экспансии бластоцисты, клетки внутренней клеточной массы и трофобласт.

*Степень формирования полости бластоцисты (экспансия):*

- 2 — ранняя бластоциста: полость составляет 50–80% объема всей бластоцисты.
- 3 — развитая бластоциста, большая полость, небольшое истончение блестящей оболочки.
- 4 — экспандированная бластоциста, полость занимает большую часть эмбриона, блестящая оболочка истончена.
- 5 — бластоциста, начавшая хетчинг, то есть трофэктодерма бластоцисты начинает прорывать блестящую оболочку.
- 6 — бластоциста, закончившая хетчинг, то есть полностью вышедшая из блестящей оболочки.

*Оценка внутриклеточной масса (ВКМ):*

- А — плотно упакованное большое количество клеток.
- В — свободно сгруппированное небольшое количество клеток.
- С — очень мало клеток или практически не определяются.

*Оценка качества клеток трофобласта (ТФЭ):*

- А — много клеток, регулярное строение.
- В — немного клеток, нерегулярное строение.
- С — очень мало клеток и поврежденные клетки.

Эмбрионы на 5-е сутки культивирования для анализа качественных характеристик сокультивирования были условно поделены на группы в зависимости от качества клеток трофобласта и эмбриобласта (таблица 3).

**Таблица 3. Условное деление эмбрионов на группы по качеству клеток трофобласта и внутренней клеточной массы**

<b>Качество эмбрионов на 5-е сутки культивирования</b>
1. Отличное (AA)
2. Хорошее (AB, BA)
3. Удовлетворительное (BB, BC, CB)
4. Неудовлетворительное (CC, остановка на стадии дробления)

На 5-е сутки культивирования осуществлялся селективный перенос 1-го эмбриона в полость матки на стадии бластоцисты в асептических условиях стерильным гибким катетером Wallace (Германия) или катетером СООК (Ирландия) под ультразвуковым контролем. В случае наличия патологии эндометрия или соматического заболевания, перенос эмбриона не производили, данный факт отмечали в медицинской документации. Оставшимся эмбрионам «хорошего» и «отличного» качества производилась криоконсервация для последующего вступления в криопротокол при отрицательном результате и отмене переноса в данной программе ВРТ.

### **2.3.8. Поддержка лютеиновой фазы**

Для поддержания функции желтого тела со дня ТВП и до момента диагностики беременности назначали препарат микронизированного прогестерона в дозе 600 мкг/сут интравагинально или дидрогестерон 30 мг/сут внутрь.

### **2.3.9. Диагностика наступления беременности и оценка частоты живорождения**

На 14 день после проведения программы переноса нативного и криоконсервированного/размороженного эмбриона в полость матки, проводилась диагностика беременности по концентрации  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека ( $\beta$ -ХГ) в сыворотке крови. При положительном результате на 21-й день после переноса проводили ультразвуковую диагностику для визуализации плодного яйца, далее на сроке 5-6 недель беременности — определение сердцебиения плода. Факт родов, а также ранние репродуктивные потери оценивали по телефонному звонку пациентке в предполагаемые даты.

### **2.3.10. Культивирование клеток кумулюса и оценка метаболома методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС)**

Для исследования метаболома отработанных сред культивирования после клеток кумулюса было отобрано 90 женщин согласно критериям включения/исключения, описанным выше. Клетки кумулюса после трансвагинальной пункции отрезали стерильным скальпелем в среде, содержащей буфер HEPES (Gamete Buffer, COOK, Ирландия), размером 3x3 мм без признаков крови и дегенеративных клеток. Промывали в среде бикарбонатного буфера (Irvine CSC, США) и помещали в капли 25 мкл под слой культурального масла (Irvine CSC, США) на 5 суток без последовательной смены среды. Контролем служила капля среды без клеток кумулюса. Чашки Петри помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37°C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>). На 5-е сутки отбирали равные объемы (20 мкл) отработанных сред, отдельно собирали клетки кумулюса. Все отобранные образцы были промаркированы и заморожены (-80°C). В рамках пробоподготовки для ВЭЖХ-МС-анализа метаболиты экстрагировали

добавлением к каждому образцу среды, или непосредственно к пеллете клеток кумулюса трех объемов метанола для высаживания белков, после чего центрифугировали (13 000g) с течением 15 мин. Супернатант переносили в чистые виалы. Для высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) к 18 мкл экстракта каждого образца добавляли 2 мкл внутреннего стандарта с конечной концентрацией 5 мкМ, разделение проб проводили на колонке Atlantis T3 C18 – 3 мкм, длина 15 см, внутренний диаметр 1 мм (Waters, USA) при помощи хроматографической системы Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Scientific, USA).

Элюирование компонентов образцов проводили методом обращенно-фазной хроматографии в изократическом растворе 5% подвижной фазы «В» (0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле) и 95% фазы «А»; (0,1% раствор муравьиной кислоты в воде) в течение 15 минут, затем в градиенте 5-95% подвижной фазы «В»; в течение 10 мин при скорости потока 40 мкл/мин. Затем промывали 5 мин (95 % фазы «В»), после чего в течение 1 минуты возвращалась исходная концентрация фазы «В» в 5% и колонка 3 мин уравнивалась. Общее время хроматографии одного образца составило 34 минуты. Детекция метаболитов проводилась на гибридном квадруполь-время пролетном масс-спектрометре Bruker MaXis Impact (Bruker Daltonics, Germany) в двух измерениях на один образец. Масс-спектры получали при разрешении 50 000 в диапазоне 50–1500  $m/z$ , в режиме положительно заряженных ионов. Детектирование пиков, их группировка и коррекция времени удерживания проводилась с помощью программного пакета XCMS.

Детекция пиков была выполнена с помощью алгоритма Centwave с параметрами: разброс  $m/z$  — 15ppm; минимальная и максимальная ширина пика — 10 и 50 секунд, соответственно. Группировка пиков по всем образцам была выполнена методом Peak Density с параметрами по

умолчанию. Для первичной идентификации метаболитов с соответствующими молекулярными массами использовали базу данных HMDB ([www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca)).

### **2.2.11. Статистический анализ полученных данных**

Для статистического анализа данных на клиническом этапе исследования использовали возможности программ LibreOffice Calc и SPSS. Для проверки статистической значимости использовались критерии Стьюдента и Хи-квадрат. При анализе метаболома культуральных сред для поиска и визуализации наибольших различий между образцами использовали метод многомерной статистики — дискриминантный анализ ортогональных частичных наименьших квадратов (OPLS-DA). Для проверки статистической значимости различия относительных концентраций (средних интегрированных площадей пика) между группами для конкретных метаболитов использовался t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали те изменения, для которых значение  $p$  с учетом коррекции на множественную проверку гипотез (FDR) было меньше 0,05. Дополнительным критерием отбора для потенциальных биомаркеров являлась кратность изменений концентрации не менее чем в 2 раза между группами. Для оценки статистической значимости найденных метаболических путей применялся точный тест Фишера. Кратность изменений, а также одномерная и многомерная статистика рассчитывались с помощью платформы Metaboanalyst v5.0.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **3.1. Клинико-anamнестическая характеристика супружеских пар, включенных в исследование пациенток**

Для достижения поставленной цели и задач в проспективное когортное исследование были включены 127 супружеских пар, которые обратились с целью проведения программы ЭКО/ИКСИ по поводу бесплодия, обусловленного трубно–перитонеальным, мужским фактором эндокринным и сочетанным фактором, с обязательным наличием у пациентки не менее 2-х неудачных попыток ЭКО в анамнезе и соответствующим выше перечисленным критериям включения/исключения (см. главу 2). Все супружеские пары подписывали информированное согласие для проведения работы.

Для характеристики всей выборки исследования была посчитана описательная статистика. Клинико-anamнестические данные пациенток к моменту вступления в программу ЭКО/ИКСИ представлены в таблице 4. Все женщины, включенные в исследование, были сопоставимы по возрасту и индексу массы тела. Средний возраст женщин составил 33 года (30–37 лет), а проведенная оценка антропометрических данных не выявила значимых различий в средних показателях роста и веса пациенток. Рост женщин составил 167 см (160–170 см), вес 60 кг (55–70 кг), индекс массы тела — 21,0 (20–24 кг/м<sup>2</sup>).

Супружеские пары, включенные в исследование, имели в среднем 3 неудачных попытки ЭКО в анамнезе. Факторы бесплодия указаны в таблице 5 и на рисунке 4. Преобладал трубно-перитонеальный фактор бесплодия и нарушение сперматогенеза у мужчин.

**Таблица 4. Возрастная и антропометрическая характеристика женщин, включенных в настоящее исследование**

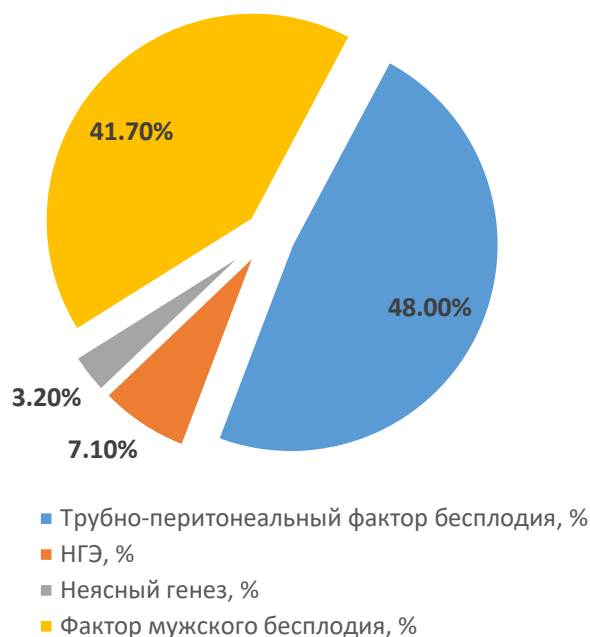
Параметр	n=127	
Возраст женщины, лет*	33 [30; 36,5]	
Рост, см*	168 [164; 170]	
Вес, кг*	60,0 [55; 68]	
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> *	21,0 [20; 23,6]	
Преобладание типа бесплодия, %	I — 52,8% (67/127)	II — 47,2% (60/127)
Количество попыток ЭКО	3 [3; 4]	
Курение, %	1,6% (2/127)	

Примечание: Me [Q25-Q75]

**Таблица 5. Факторы бесплодия у супружеских пар в исследовании**

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

Примечание: Me [Q25-Q75]



**Рисунок 4.** Факторы бесплодия у супружеских пар в исследовании

Проанализированные данные о менструальной функции (возраст менархе, продолжительность менструального цикла и менструальных кровотечений, а также возраст начала половой жизни) представлены в таблице 6. Все значения представлены в виде медианы и 1-3 квартилей.

**Таблица 6. Характеристика менструальной функции женщин, включенных в исследование**

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

Примечание: Me [Q25-Q75]



Параметры гормонального статуса, полученные в результате предварительного обследования пациенток, включенных в исследование представлены в таблице 7. Полученные данные указывают на наличие у женщин нормального овариального резерва.

**Таблица 7. Гормональные характеристики женщин, включенных в исследование**

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

*Примечание: Me [Q25-Q75]; \*M (SD)*

Пациентки, включенные в исследование, были достаточно молодого возраста, имели регулярный менструальный цикл, нормальную массу тела. Однако множественные неудачные попытки ЭКО в анамнезе обследуемых женщин потребовал более тщательного анализа их эндокринной и репродуктивной функции. Был исследован широкий спектр гормонов с включением андрогенов, кортизола, СТГ и гормонов щитовидной железы. Однако анализ гормональных параметров этих пациенток не выявил значимых изменений, более того по состоянию овариального резерва они также относились к группе достаточно перспективных для получения хороших результатов в программах ЭКО.

Данные анамнеза о ранее перенесенных гинекологических заболеваниях представлены в таблице 8.

**Таблица 8. Перенесенные гинекологические заболевания среди включенных в исследование женщин**

Параметр	n=127
Хронический сальпингоофорит	11 (8,7%)
Наружный генитальный эндометриоз I–II стадии распространения	41 (32%)
Миома матки малых размеров	25 (20%)
Патология эндометрия	6 (4,7%)
Патология шейки матки	9 (7%)
ИППП	15 (12%)

*Данные представлены как абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %.*

По данным, представленным в таблице 8, можно заметить, что сальпингоофорит отмечали в 8,7% случаев, ИППП в анамнезе — 12%, наружный генитальный эндометриоз I–II стадии распространения — 32%, миома матки — 20%, патология эндометрия — 4,7% патология шейки матки — 7%.

Данные о перенесенных оперативных вмешательствах у пациенток, включенных в исследование, представлены в таблице 9. При проведенном анализе данных о количестве и объеме перенесенных оперативных вмешательств было выявлено, что 19% женщин перенесли одностороннюю (13%) и/или двустороннюю тубэктомию (6%) (по поводу внематочной беременности или воспалительных заболеваниях маточных труб), сальпингоовариолизис (13%), резекцию яичников (7%), гистероскопию и диагностическое выскабливание полости матки (44%) (в связи с полипом и гиперплазией эндометрия).

**Таблица 9. Перенесенные оперативные вмешательства на органах малого таза**

<b>Параметр</b>	<b>n=127</b>
Односторонняя тубэктомия	13% (n=16)
Двусторонняя тубэктомия	6% (n=8)
Сальпингоовариолизис	13% (n=16)
Резекция яичников	7% (n=9)
Гистероскопия, РДВ	39%(n=50)
Полипэктомия, гиперплазия эндометрия	5% (n=6)

*\*данные представлены как доля от общего числа пациенток (%)*

По данным анамнеза у пациенток, включенных в исследование, были выявлены перенесенные детские инфекции (краснуха, ветряная оспа), аллергические заболевания (аллергический ринит), заболевания желудочно-кишечного тракта (хронический гастрит, ремиссия), мочевыделительной системы (хронический пиелонефрит и хронический цистит, ремиссия), ЛОР заболевания ( хронический тонзиллит в стадии ремиссии), миопия различной степени тяжести, заболевания дыхательной системы (перенесенные пневмонии в анамнезе, хронический бронхит вне обострения, патология сердечно-сосудистой системы (невыраженная) и заболевания молочных желез (фиброзно-кистозная мастопатия). По частоте встречаемости экстрагенитальной патологии пациентки между собой не отличались.

Оценка репродуктивной функции пациенток с вторичным бесплодием (n=60), включенных в исследование, показала, что у 79,6% были самостоятельные беременности в анамнезе, 20,4% — беременности, наступившие после программы ЭКО, своевременные роды в анамнезе были у 29% женщин, преждевременные роды в 2%, эктопические беременности в анамнезе были у 17% женщин. В 20% беременности закончились самопроизвольным прерыванием, в 33% — искусственным

прерыванием на малом сроке. Следует отметить, что у одной пациентки могло быть несколько беременностей с соответствующим исходом, поэтому общее количество беременностей, количество прерываний, эктопических беременностей, преждевременных и своевременных родов не соответствует количеству пациентов.

Текущая программа лечения бесплодия методами ВРТ у 52,8% пациенток с первичным бесплодием и 47,2% женщин с вторичным бесплодием оказалась третьей по счету; лечение в третьем протоколе ВРТ начали 19,4% и 22,3% женщин, в четвертом — 8,3% и 5,2%, соответственно ( $p>0,05$ ) (таблица 10).

**Таблица 10. Анамнез бесплодия у пациенток, включенных в исследование**

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

\* Хи-квадрат

Медианное количество неэффективных попыток ВРТ не имело значимых межгрупповых различий и составило в группе первичного бесплодия — 2 [2; 2], в группе вторичного бесплодия — 2 [2;3] ( $p>0,05$ ).

Таким образом, анализ клинико-анамнестических и лабораторных данных показал, что пациентки, включенные в исследование, находились в репродуктивном возрасте и были сопоставимы возрасту, ИМТ, особенностям гинекологических заболеваний и объему оперативных вмешательств на органах малого таза в анамнезе, показателям овариального резерва, структуре факторов бесплодия, частоте первичного и вторичного бесплодия, количеству безуспешных попыток ВРТ в анамнезе.

### **3.2. Характеристика показателей сперматогенеза супругов пациенток, включенных в исследование**

Исследование эякулята было проведено у всех мужчин, включенных в программу ВРТ. Пациентам был рекомендован соответствующий половой режим. Число мужчин с нормозооспермией составило 49 (38,6%), а также встречались различные формы патозооспермии, представленные в таблице 11. Супружеским парам с нормозооспермией у мужчины проводили ИКСИ по причине неудовлетворительного эмбриологического этапа предыдущих попыток ВРТ (сниженный показатель частоты 2PN2PB).

**Таблица 11. Характеристика сперматогенеза у мужчин, включенных в исследование**

<b>Показатель</b>	<b>n=127</b>
Нормозооспермия	49 (38,6%)
Олигоастенозооспермия	5 (3,9%)
Тератозооспермия	11 (8,7%)
Олигоастенотератозооспермия	14 (11%)
Астенотератозооспермия	48 (37,8%)

### 3.3. Результаты клинического и эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами ВРТ в зависимости от способа культивирования

Всем пациенткам, проходившим программу ВРТ был назначен протокол овариальной стимуляции с использованием препаратов гонадотропинов и антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРг) с 6 дня стимуляции в дозе 0,25 мг в сутки с целью предотвращения преждевременной овуляции до момента запланированного времени ТВП. В качестве триггера финального созревания ооцитов использовали препарат хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в стандартной дозе 10 000 МЕ. Длительность овариальной стимуляции составила 9 (8; 10) дней, суммарная средняя доза препарата — 1575 МЕ (1262; 2025). При проведении трансвагинальной пункции фолликулов суммарно было аспирировано 858 ооцитов, из них 686 зрелых (79,7%), 139 незрелых (16,1%) и 36 дегенеративных ооцитов (4,2%). Все зрелые ооциты подвергались оплодотворению методом ИКСИ. Качество полученных ооцитов у пациенток в исследовании показано на рисунке 5.



**Рисунок 5.** Качество полученных ооцитов у пациенток в исследовании

Эмбриологические характеристики цикла ВРТ показаны в таблице 12. Все нормально оплодотворенные зиготы одной пациентки были поделены на две группы в зависимости от дальнейшего культивирования: группа 1 — сокультивирование с аутологичными клетками кумулюса до 5 суток развития, группа 2 сравнения — классическое культивирование, согласно дизайну исследования, представленного в главе «Материалы и методы». На 5-е сутки культивирования были оценены эмбрионы на стадии бластоцисты в обеих группах (таблица 13).

**Таблица 12. Клинические и эмбриологические показатели программ лечения бесплодия у супружеских пар в исследовании**

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

Примечание: Me [Q25-Q75]

Всего было получено 236 бластоцист в группе сокультивирования и 389 в группе сравнения. При сравнении долей эмбрионов разного качества (отличного, хорошего, удовлетворительно и плохого) в

зависимости от условий культивирования (сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса или классическая схема культивирования) были получены статистически значимые различия ( $p=0,01$ ). Выявленные различия были обусловлены более высоким процентом эмбрионов «отличного» качества 36,9% (87/236) против 24,9% (97/389) ( $p=0,002$ ) и более низким процентом эмбрионов неудовлетворительного качества 43,2% (102/236) против 50,6% (197/389) при сокультивировании ( $p=0,07$ ) с клетками кумулюса по сравнению с классическими условиями культивирования.

**Таблица 13. Оценка качества клеток трофобласта и внутренней клеточной массы в бластоцистах на 5 сутки культивирования согласно морфологическим критериям при различных вариантах культивирования ( $p<0,01$ )**

Качество эмбрионов на 5-е сутки культивирования	Группа 1 Сокультивирование с клетками кумулюса n=236	Группа 2 Классическое культивирование n=389	p*
1. Отличное (AA)	36,9% (87/236)	24,9% (97/389)	0,01
2. Хорошее (AB, BA)	11,0% (26/236)	11,8% (46/389)	$p>0.05$
3. Удовлетворительное (BB, BC, CB)	8,9% (21/236)	12,6% (49/389)	$p>0.05$
4. Неудовлетворительное (CC, остановка на стадии дробления)	43,2% (102/236)	50,6% (197/389)	$p>0.05$

*Примечание: \*Хи-квадрат*

Как показали результаты сравнения, сокультивирование эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса значительно улучшало качество получаемых на 5-е сутки бластоцист, что предоставляло возможность не



только проводить селективный перенос одного эмбриона в полость матки, но и повысить количество замороженных эмбрионов для последующих переносов криоконсервированных/размороженных эмбрионов.

### 3.4. Исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ с учетом особенностей культивирования

Всего было выполнено 105 переносов эмбрионов, из них - 47 переносов после классического культивирования и 58 переносов из группы сокультивирования с клетками кумулюса. Клинические результаты показаны в таблице 14.

Таблица 14. Частота имплантации/наступления клинической беременности и родов при различных вариантах культивирования эмбрионов

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

\* Хи-квадрат и критерий Фишера

Как показывают клинические данные, процедура сокультивирования эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса не показала своей эффективности на общей когорте пациенток. Именно поэтому на следующем этапе женщины были стратифицированы по

возрасту. Были выделены следующие подгруппы:  $\leq 35$  лет и  $> 35$  лет. Клинические результаты показаны в таблице 15.

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

**Таблица 15. Частота имплантации/наступления клинической беременности и родов в различных возрастных подгруппах пациенток при различных вариантах культивирования эмбрионов**

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

*Хи-квадрат и критерий Фишера*

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

Для реализации репродуктивной функции на программу обратились пациентки после неудачной попытки или отмены переноса нативного эмбриона в цикле ЭКО/ИКСИ. Для получения достоверных результатов и оценки эффективности переноса в естественном цикле или на фоне циклической гормональной терапии было выполнено 198 криопереносов, из них 114 — бластоцисты с сокультивированием с клетками кумулюса, 84 — без сокультивирования.

На первом этапе исследования были проанализированы клинико-анамнестические параметры супружеских пар в программах переноса криоконсервированных/размороженных эмбрионов. По данным, представленным в таблице 16, группы были сравнимы между собой. Обращает на себя внимание только преобладание сочетанного фактора бесплодия у пациентов с повторными неудачами имплантации в обеих группах (43,8% при аутологичном сокультивировании с клетками кумулюса и 42,9% — в группе классического культивирования).

На следующем этапе работы были проанализированы исходы программ переноса размороженного эмбриона при различных методах его культивирования. Всем пациенткам переносили строго один эмбрион 5-х суток культивирования на стадии бластоцисты. Клинические исходы показаны в таблице 17.

Таблица 16. Клинико-anamнестические параметры супружеских пар в программах переноса криоконсервированных/размороженных эмбрионов.

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

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

Таблица 17. Частота имплантации/наступления беременности и родов в программах переноса размороженного эмбриона при различных вариантах культивирования

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

\* Хи-квадрат и критерий Фишера

Как видно из представленных данных, частота наступления беременности в циклах переноса криоконсервированного/размороженного эмбриона статистически значимо не различалась между группами и составляла 34,2% для группы сокультивирования и 36,9% для классического культивирования. Сравнение частоты родов также не показало значимой разницы (89,0% и 80,6%,  $p=0,27$ ). На последнем этапе исследования была выполнена стратификация пациентов по возрасту были выделены группы женщин  $\leq 35$  лет и  $>35$  лет и проведен расчет тех же параметров исходов программ лечения бесплодия. Результаты указаны в таблице 18.

В группе молодых женщин до 35 лет было выполнено 56 переносов в группе сокультивирования и 38 — без сокультивирования с аутологичными клетками кумулюса. Имплантация эмбриона в полости

матки произошла в 39,3% случаев (37/94), из них при аутологичном сокультивировании с клетками кумулюса — у 48,2% женщин данной подгруппы (27/56), и у 26,3% (10/38) в группе без сокультивирования. Данные являются статистически значимыми,  $p=0,03$  (OR=1,83, 95%ДИ 1,00;3,32). Можно говорить о том, что аутологичное сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса у пациенток молодого возраста ( $\leq 35$  лет) с повторными неудачами имплантации способствует наступлению беременности и может быть использовано как технология повышения эффективности программ лечения бесплодия методами ВРТ. При этом частота родов статистически значимо не изменилась у таких пациенток и составила 70,3% в группе аутологичного сокультивирования и 90,0% без такового ( $p=0,21$ ).

Анализ данных исходов программ криопереносов в позднем репродуктивном возрасте женщин показал обратную динамику. Всего у женщин старше 35 лет было проведено 104 крипереноса, из них 58 после аутологичного сокультивирования и 46 без такового. Частота наступления беременности при переносе эмбриона после сокультивирования составила 20,6%, без сокультивирования — 41,3% ( $p=0,02$ ; OR 0,50 95%ДИ 0,27; 0,92). Как видно из представленных данных, частота имплантации в группе возрастных женщин с ПНИ зависит от метода культивирования эмбриона, а аутологичное сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса значительно ухудшает результативность лечения. Частота родов в расчете на беременность при этом статистически значимо не изменилась (таблица 18).

Таблица 18. Частота имплантации/наступления клинической беременности и родов в возрастных подгруппах пациенток при различных вариантах культивирования эмбрионов в криопереносах

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

*\*Хи-квадрат и критерий Фишера*

Полученные данные показывают, что достоверно увеличивается частота наступления беременности при сокультивировании аутологичных клеток кумулюса с эмбрионами у молодых пациенток, при этом значимо

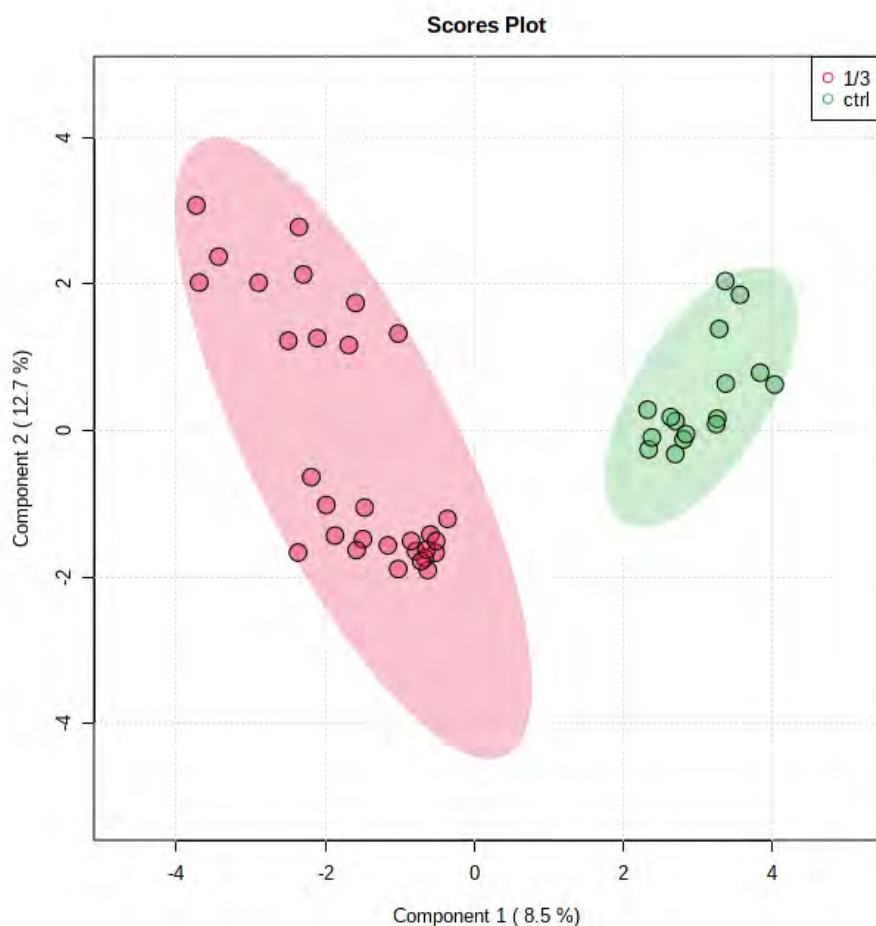
снижается данный показатель у женщин старшего репродуктивного возраста в программах криопереноса.

### **3.5. Оценка метаболомного статуса отработанных культуральных сред с зависимости от способа культивирования**

Для исследования особенностей метаболизма клеток кумулюса и их возможного влияния на развитие эмбриона и его способности к имплантации мы исследовали метаболом как самих клеток кумулюса, так и питательных сред в течение 5 дней культивирования. Всего было исследовано 100 образцов, из них 90 — отработанные культуральные среды от клеток кумулюса и 10 - контрольные образцы среды. После детекции пиков было обнаружено 1722 молекулярных иона в диапазоне  $m/z$  от 84 до 1007. Для выявления кластеризации образцов использовался метод многомерной статистики (OPLS-DA), который выявил четкую кластеризацию образцов при сравнении отработанных культуральных сред от клеток кумулюса и контрольных сред (рисунок 6).

Одномерная непараметрическая статистика закономерно выявила 113 молекулярных ионов, у которых значимо меняется концентрация масс (FDR  $p < 0,05$ ). Согласно результатам анализа кратности и направленности изменений, концентрация 65 молекулярных ионов из 113 изменилась в 2 или более раз между группами сред, содержащих клетки кумулюса и контрольными. Для этих ионов была произведена первичная идентификация с помощью базы данных HMDB. Результаты идентификации, представляющие собой список потенциальных биомаркеров, представлены в таблице 19. Можно видеть, что обнаруживается целый ряд аминокислот (таких как лейцин, валин, серин) и дипептидов на их основе, концентрация которых в среде с кумулюсными клетками повышена в несколько раз. В то же время для большинства липидов и их производных, обнаруженных в среде, было зафиксировано снижение концентрации (таблица 19).





**Рисунок 6.** Многомерный статистический анализ методом OPLS-DA для сравнения группы культуральных сред, содержащих кумулюсные клетки, с контрольными средами без клеток

**Таблица 19.** Список потенциальных биомаркеров, обнаруженных с помощью первичной идентификации молекулярных ионов по базе данных HMDB

<b>m/z</b>	<b>Название</b>	<b>Кратность изменений</b>	<b>Аддукт</b>	<b>ppm</b>
128.032	L-Serine	1.714	M+Na	1
134.02	2,4-Dihydropyridine	4.007	M+Na	9
140.069	L-Valine	2.023	M+Na	6
151.047	Pyroglutamine	1.359	M+Na	5
152.033	4-Oxoproline	3.778	M+Na	8

<b>m/z</b>	<b>Название</b>	<b>Кратность изменений</b>	<b>Аддукт</b>	<b>ppm</b>
154.084	L-Leucine	5.46	M+Na	1
165.088	2-Octenoic acid	-2.202	M+Na	4
166.06	Cyclocreatine	0.454	M+Na	8
175.036	4-Hydroxyphenyl acetate	22.537	M+Na	3
189.124	Leucyl-Glycine	3.181	M+H	3
204.061	urea glutamate	-2.333	M+H	2
205.119	Valylserine	2.102	M+H	3
209.054	Pyroglutamylglycine	1.648	M+Na	3
231.171	Leucyl-Valine	1.993	M+H	3
233.065	1,3,9-Trimethyluric acid	1.992	M+Na	2
261.109	Proline glutamate	152.77	M+H	3
262.089	N-Gluconyl ethanolamine	-4.632	M+Na	3
291.077	Phenylalanyl cysteine	-1.177	M+Na	1
314.994	Urolithin-3-sulfate	1.547	M+Na	2
331.15	Fructose-lysine	-2.031	M+Na	7
331.226	$\alpha$ -Hydroxyprogesterone	-2.315	M+H	2
389.191	7-Oxoprostaglandin I <sub>2</sub>	1.838	M+Na	6
392.314	N-Palmitoyl Leucine	-1.866	M+Na	1
441.332	4 $\beta$ ,24S-dihydroxycholesterol	-1.379	M+Na	4
443.346	Cholestanetriol	-1.772	M+Na	8
467.326	Cholesterol phosphate	-2.186	M+H	5
665.581	CE(18:1(9Z)-O(12,13))	-1.336	M+H	9
778.463	PS(34:4)	-2.288	M+Na	0
780.455	PE(38:9)	-1.698	M+Na	3

m/z	Название	Кратность изменений	Аддукт	ppm
782.451	PE(PGE1/14:1(9Z))	-1.699	M+Na	9
786.449	PS(18:1(12Z)-2OH(9,10)/14:1(9Z))	-1.978	M+Na	5
283.052	Biotin	66.841	M+K	2

Списки молекулярных ионов были использованы для анализа представленности метаболических путей, которые определяют различия между группами. Список наиболее важных метаболических путей представлен в таблице 20.

Обращает на себя внимание высокая представленность метаболизма пуринов, что может указывать на важность этого пути для функционирования клеток кумулюса. На это также указывает и путь метаболизма кофеина — данный путь, помимо кофеина, включает целый ряд других производных пурина.

Кроме того, следует отметить большое количество путей, определяющих метаболизм аминокислот и сахаров, что согласуется с физиологическими функциями кумулюсных клеток.

**Таблица 20. Метаболические пути, наиболее представленные в средах культивирования клеток кумулюса**

	Пересечений	P-value
Fructose and mannose metabolism	6	<b>0.02</b>
Caffeine metabolism	3	<b>0.03</b>
Purine metabolism	11	<b>0.04</b>
Glutathione Metabolism	1	0.07
N-Glycan Degradation	2	0.10
Keratan sulfate degradation	3	0.15

	<b>Пересечений</b>	<b>P-value</b>
Linoleate metabolism	3	0.17
Drug metabolism - other enzymes	5	0.20
Pentose phosphate pathway	2	0.25
Arginine and Proline Metabolism	4	0.26
Omega-3 fatty acid metabolism	3	0.30
Phosphatidylinositol phosphate metabolism	3	0.34
Xenobiotics metabolism	5	0.35
Valine, leucine and isoleucine degradation	7	0.41
Vitamin B9 (folate) metabolism	4	0.43
Aspartate and asparagine metabolism	7	0.63
Biopterin metabolism	5	0.66
Tyrosine metabolism	23	0.88
Tryptophan metabolism	13	0.93

Отдельно мы исследовали возможные различия метаболомного профиля у пациенток возрастных групп до 35 лет и старше 35 лет. Многомерная статистика показала хорошее разделение групп, а одномерная статистика (t-критерий) выявила 57 молекулярных ионов с статистически значимой разницей в концентрациях в 1,5 и более раз между группами. С помощью HMDB был выявлен ряд биомаркеров, указанные в таблице 21.

Таблица 21. Список потенциальных биомаркеров, концентрация которых статистически значимо различается в возрастных группах

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

Можно отметить, что с возрастом происходят значительные изменения в концентрации важных классов липидов, таких как Фосфатидилхолины, диглицериды, а также N-ацилтаурины, выполняющие роль мессенджеров в различных процессах.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метод аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса используется как один из методов преодоления повторных неудач имплантации, поскольку ранее в ряде работ была показана разница в скорости роста и развития эмбрионов, а также морфологии эмбрионов между группами классического культивирования и сокультивирования с клетками кумулюса [157]. В то же время в литературе встречаются противоречивые данные о влиянии сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса на вероятность имплантации и наступления беременности [172]. Некоторые авторы указывают на повышение частоты имплантации и наступления беременности при переносе эмбрионов на 3 сутки культивирования [90], другие демонстрируют отсутствие статистически достоверных различий между частотой имплантации и наступлением клинической беременности в группах с классическим культивированием и сокультивированием с клетками кумулюса при переносе как на 3 день, так и на 5-6 день культивирования [200].

Проведенное нами исследование не выявило статистически достоверной разницы между частотой наступления беременности и вероятностью успешных родов при сравнении группы с сокультивированием и группы с классическим культивированием без клеток кумулюса. Однако при более подробном анализе групп и разделении женщин по возрасту было выявлено повышение частоты наступления беременности при классическом культивировании у женщин старше 35 лет. При этом в общей когорте при сокультивировании значительно чаще регистрировались blastocysts «отличного» качества — 40,2% против 26,9% всех эмбрионов, а число blastocysts «среднего» и «плохого» качества снижалось (10,5 и 38% против 14,2 и 47,8% соответственно). Действительно, возраст женщины является крайне важным параметром, который влияет на эффективность лечения методами ВРТ. Поздний репродуктивный возраст женщины сопряжен с

изменениями в органах и клетках репродуктивной системы. Пик репродуктивной функции у женщины приходится на 20 лет, далее происходит постепенное угасание возможностей реализации фертильной функции [51]. В связи с поздним обращением женщин клиники ВРТ сталкиваются со снижением овариального резерва у своих пациенток. В настоящее время средний возраст обращения к врачу-репродуктологу за решением проблемы бесплодия составляет 36 лет, что критично для эффективности лечения. Старение яичников сопровождается как количественным, так и качественным снижением овариального резерва с увеличением анеуплоидии ооцитов, ухудшением качества эмбрионов и повышением частоты невынашивания беременности. Кроме того, у пациенток позднего репродуктивного возраста слой гранулезных клеток растущих фолликулов секретирует меньше эстрадиола, что приводит к более слабому ответу на овариальную стимуляцию, в результате чего требуются более высокие дозы гонадотропинов. В ткани яичника происходят молекулярные изменения фолликулярной жидкости, экспрессии генов клеток кумулюса, клеток гранулезы и теки. Показано, что внутри фолликула глюкоза является ключевым источником энергии и в основном метаболизируется клетками кумулюса, которые находятся в прямой связи с ооцитом посредством выпячиваний через блестящую оболочку [45]. Через это межклеточное соединение ооциты получают пируват, конечный метаболит гликолиза, аминокислоты, нуклеотиды, глутатион и локальные факторы роста и снабжают клетки кумулюса регуляторами экспрессии генов. Нормально функционирующие митохондрии необходимы в цитоплазме ооцитов не только из-за их роли в утилизации продукции пирувата и аденозинтрифосфата (АТФ) посредством окислительного фосфорилирования (ОХРНОС), но также и для апоптоза, метаболизма аминокислот, синтеза фосфолипидов и передачи сигналов кальция. С возрастом все эти процессы изменяются,

что приводит к нарушениям метаболизма клеток кумулюса и самих женских половых клеток.

Митохондрии имеют решающее значение на всех стадиях фолликулогенеза и фолликулярного старения. Было показано, что количество, функция и динамика митохондрий изменяются с возрастом во всех компартментах, составляющих фолликул [29]. Старение связано с нарушением различных функций митохондрий, включая количество мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК), нарушение OXPHOS, накопление активных форм кислорода (АФК), снижение митохондриальной динамики, а также нарушение путей, участвующих в митохондриальном гомеостазе. Оптимальная функция митохондрий важна для нормального распределения хромосом. Таким образом, митохондриальная дисфункция также «способствует» хромосомным аномалиям и неспособности выделения первого полярного тельца в ооците из-за ошибок мейотического деления, которые чаще возникают у женщин старшего репродуктивного возраста. Более того, дисфункциональные митохондрии могут приводить к снижению продукции АТФ и усилению окислительного стресса в ооците из-за его неспособности сбалансировать продукцию АФК. Vabaev E. и др. продемонстрировали, что возрастные мышцы имеют меньше митохондрий в ооцитах, полученных из первичных фолликулов, что приводит к увеличению АФК при индуцированном клеточном стрессе в зрелых ооцитах [164]. Было показано, что не только в ооцитах, но и в клетках кумулюса, полученных от пациенток старше 38 лет, функция фолликулярных митохондрий серьезно нарушена [29]. Нарушение функции митохондрий в ооцитах и возрастное накопление АФК напрямую связаны со снижением качества ооцитов с задержкой созревания, невозможностью оплодотворения, нарушением развития эмбриона и анеуплоидии. Именно эти молекулярно-биологические особенности клеток кумулюса молодых женщин и пациенток позднего



репродуктивного возраста могут объяснить результаты, полученные в настоящей работе по использованию технологии сокультивирования эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса в программе лечения бесплодия методами ВРТ.

Результаты диссертационного исследования подтверждают литературные данные о том, что сокультивирование с клетками кумулюса улучшает созревание эмбрионов, позволяя получать больше эмбрионов высокого качества. Как один из механизмов благотворного влияния сокультивирования с клетками кумулюса на развитие ооцитов и эмбрионов ранее были показаны специфические изменения профиля экспрессии генов в ооцитах при сокультивировании с клетками кумулюса, что повышает качество ооцита. Virant-Klun A. с коллегами в своей работе при сравнении групп ооцитов, культивировавшихся *in vitro* классическим методом и *in vitro* с применением сокультивирования обнаружили, что профиль экспрессии генов ооцитов при сокультивировании наиболее схож с таковым при естественном созревании ооцита *in vivo*. Кроме того, эти две группы образцов имели наибольшее пересечение экспрессированных генов [200]. В то же время, для культивирования классическим способом были характерны более значительные колебания экспрессии генов относительно естественного созревания. Наибольшую разницу демонстрировали белки, связанные с регуляцией транскрипции, эмбриогенезом и эпигенетикой, а также клеточным циклом. Однако, в литературе встречаются единичные работы по изучению сокультивирования ооцитов и эмбрионов с клетками кумулюса, в основном проведенные на животных. Практически отсутствуют исследования особенностей метаболизма ооцитов и эмбрионов при сокультивировании. Это связано в том числе с этическими сложностями проведения подобных исследований с ооцитами и эмбрионами человека.

Одним из способов обойти этические ограничения является исследование сред культивирования эмбрионов. Уровни потребления метаболитов из среды и выделения продуктов жизнедеятельности в среду эмбрионами напрямую коррелируют с их метаболической активностью. Таким образом, профилируя среды культивирования, можно получить представление об активных метаболических процессах в эмбрионах. В литературе представлено большое количество работ по изучению питательных сред — в частности, измеряются концентрации различных белков [40], аминокислот [77], глюкозы, ХГЧ и других метаболитов. Для подобных исследований наиболее подходящими являются методы, которые позволяют одновременно анализировать большое количество компонентов среды. Ранее метаболом сред культивирования и его влияние на качество эмбрионов, а также их способность к имплантации были изучены с помощью методов инфракрасной спектроскопии и рамановской спектроскопии [113, 180], ЯМР [140], а также масс-спектрометрии в сочетании с хроматографией для разделения сложных биологических смесей. Так, ранее с помощью масс-спектрометрии были показаны особенности метаболома эмбрионов человека в зависимости от качества, кариотипа, состава сред культивирования и влияния внешних факторов.

Seli E. с соавторами использовали БИК-спектроскопию и обнаружили, что показатели жизнеспособности, рассчитанные по метаболическим профилям отработанных культуральных сред 2-3-го дня, не зависят от морфологии эмбриона и коррелируют с репродуктивным потенциалом эмбрионов [181]. Эта работа вызвала значительный интерес и обсуждение. Последующие исследования с рандомизированным контролем отработанных питательных сред для эмбрионов на 2-й и 5-й день методом БИК-спектроскопии в сочетании с морфологической оценкой не подтвердили какого-либо значительного улучшения

показателей наступления беременности по сравнению с классическими критериями оценки, основанными только на морфологии [72].

Другое рандомизированное исследование отработанных эмбриональных питательных сред на 3-й день с помощью БИК-спектроскопии также не выявило какого-либо улучшения результатов переноса при этом комбинированном подходе [199].

Оценка технического дизайна эксперимента показала, что такие результаты были получены из-за ограничений оборудования. Кроме того, пороговое значение отношения сигнал/шум было недостаточно высоким для правильного прогнозирования жизнеспособности эмбриона и фильтрации фонового шума, что снижало надежность и воспроизводимость метода [173, 198].

Рамановская спектроскопия, являясь мощным методом неразрушающего анализа с высокой специфичностью, обладает относительно низкой чувствительностью, что может ограничить ее использование для анализа сложных биологических жидкостей, таких как сыворотка, плазма или отработанные питательные среды [48].

Потребление питательных веществ и скорость выведения метаболитов даже между отличной, полностью развитой бластоцистой и некачественной морулой может отличаться весьма незначительно, что требует высокочувствительных методов анализа. Некоторые высокоактивные соединения, такие как гормоны или медиаторы, обычно имеют чрезвычайно малые концентрации и их обнаружение также затруднено. Масс-спектрометрия в сочетании с газовой или жидкостной хроматографией является эффективным и универсальным методом анализа, который обеспечивает альтернативу метаболомному профилированию на основе спектроскопии. Кортецци Е. и др. использовали прямой МС-анализ, без хроматографического разделения, отработанной эмбриональной среды культивирования 3-го дня с известным результатом имплантации, чтобы предсказать

имплантационный потенциал. Спектры были получены в режиме отрицательных ионов и проанализированы методом многомерной статистики PLS-DA для проверки эффективности статистической модели при прогнозировании потенциала имплантации. Модель правильно идентифицировала 100% положительных имплантаций и 70% отрицательных. Питательные среды от эмбрионов с положительным или отрицательным исходом показали специфические биохимические сигнатуры, которые в наибольшей степени способствуют различию между группами, хотя идентификация обнаруженных ионов не проводилась [28].

В то время как нецелевая метаболомика отработанных питательных сред хороша для поиска биомаркеров, часто возникает необходимость не открывать новые, а тщательно идентифицировать и количественно оценить существующие биомаркеры, обнаруженные биохимическими или молекулярными методами. Целенаправленное профилирование свободных жирных кислот LC-MS выявило статистически значимое снижение докозагексаеновой кислоты и незначительное снижение других незаменимых свободных жирных кислот в культуральной среде на 6-й день, полученной от морфологически «хороших» эмбрионов по сравнению с «плохими». Авторы предложили целенаправленное метаболомное профилирование в качестве мощного метода неинвазивной оценки качества эмбриона [11].

Оценка отработанных питательных сред современными методами молекулярной биологии позволяет существенно приблизиться к пониманию процессов оплодотворения и раннего эмбриогенеза у человека. Именно метаболомное профилирование позволит проводить целенаправленное обогащение сред культивирования для повышения эффективности программ лечения бесплодия методами ВРТ. Омиксные технологии способствуют возникновению нового понимания

особенностей метаболизма эмбриона человека на доимплантационной стадии развития [59, 137].

В настоящей работе нами были проанализированы метаболомные профили питательных сред после культивирования в них клеток кумулюса в течение 5 дней, а также непосредственно самих клеток кумулюса. В качестве контроля была проанализирована 5-дневная культуральная среда. При одномерном и многомерном статистическом анализе при сравнении с контрольными средами был выявлен целый ряд метаболитов, достоверно изменяющих свою концентрацию. Эти метаболиты могут быть непосредственно связаны с метаболической активностью клеток кумулюса и включают в себя аминокислоты и их производные, липиды различных классов, дипептиды и витамины. Обращает на себя внимание повышение производных фенилаланина (4-гидроксифенилацетата) в среде, что может свидетельствовать об активном метаболизме фенилаланина клетками кумулюса и эмбрионом [47]. Кроме того, была значительно повышена концентрация дипептида пролин-глутамата. В опытах, проведенных на мышах, Morris M. с коллегами показали, что пролин и глутамат в среде оказывают благотворное влияние на предимплантационное развитие и рост эмбриона [133]. Идентифицированные метаболиты затем использовались для выявления наиболее активных метаболических путей. Метаболизм глюкозы и других гексоз является критически необходимым для активного развития эмбриона, в то время как глутатион действует как антиоксидант, защищая от активных форм кислорода. Поскольку раннее развитие эмбриона сопряжено со значимым увеличением количества нуклеиновых кислот, крайне важным для развития эмбриона является и метаболизм пуринов/пиримидинов [33].

Помимо сред культивирования нами были экстрагированы метаболиты непосредственно из клеток кумулюса для последующего профилирования. В данном случае наибольший интерес представляло

изучение активных метаболических путей в клетках кумулюса и их сравнение с путями, ранее выявленными в средах культивирования. В литературе имеются данные о том, что клетки кумулюса играют важную роль в доставке различных аминокислот в ооцит, исключая алифатические аминокислоты с разветвленной боковой цепью - валин, лейцин и изолейцин, которые, вероятно, регулируются иным способом. Это может обуславливать факт обогащения большого количества путей метаболизма аминокислот. При этом одними из важнейших являются серосодержащие аминокислоты, такие как метионин и цистеин, поскольку они необходимы для корректного импринтинга (передачи статуса метилирования), биосинтеза белка, а их недостаток приводит к синдрому депривации серосодержащих аминокислот и запуску каспазозависимого пути клеточной гибели [124]. Большое количество активных путей метаболизма липидов закономерно ввиду активной роли последних не только в качестве источника энергии, но и как регуляторов различных клеточных процессов [8].

Клетки кумулюса активно участвуют в метаболизме липидов, иницируя, среди прочего, механизм бета-окисления жирных кислот, которые необходимы для нормального развития ооцита и эмбриона, а ингибирование приводит к серьезным нарушениям нормального развития [41, 120].

Таким образом, наше исследование показало, что аутологичное сокультивирование эмбрионов с клетками кумулюса само по себе не приводит к увеличению доли успешных имплантаций и родов, однако значительно повышает число эмбрионов отличного качества. Профилирование выявило в клетках кумулюса компоненты метаболических путей, имеющих критическую важность для физиологического роста и развития эмбрионов. Использование сокультивирования в протоколах ВРТ может повышать вероятность успешного созревания бластоцист и повысить их качество, которое

является определяющим при выборе эмбриона для переноса. Особенно актуальным сокультивирование представляется в случае малого количества или плохого качества исходных ооцитов. Данный метод в комбинации с другими независимыми методами оценки качества эмбриона, такими как измерение потребления глюкозы эмбрионами, может быть использован для двойной оценки качества эмбриона или как дополнительный критерий выбора эмбриона для переноса в полость матки по морфологическим и биохимическим параметрам. В условиях повсеместного отказа от переноса нескольких эмбрионов такой отбор может повысить вероятность успеха программ ВРТ и привести к рождению большего числа детей.

## ВЫВОДЫ

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



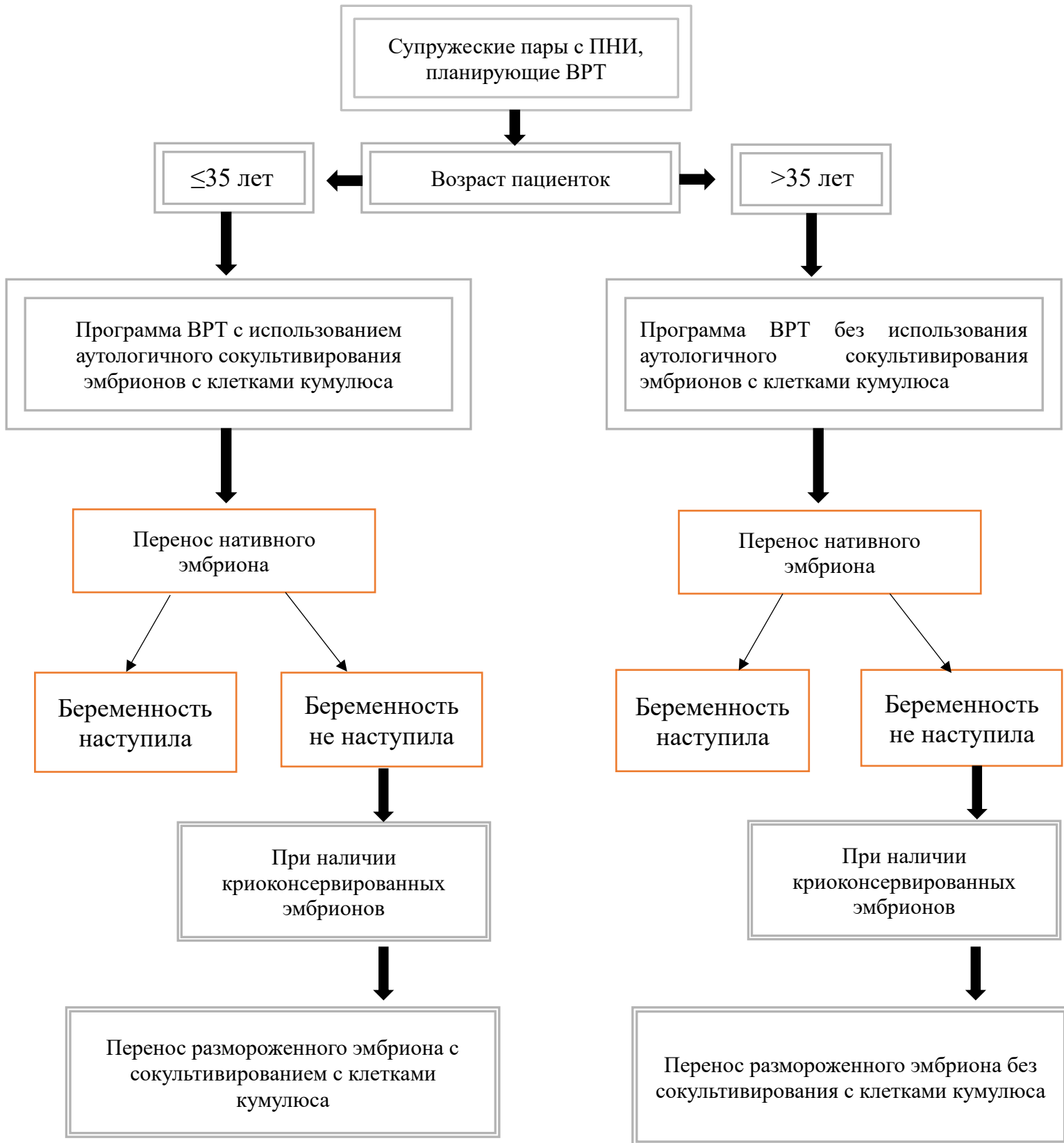
классическом культивировании). Выявлено достоверное снижение частоты наступления беременности у пациенток позднего репродуктивного возраста (>35 лет) при сокультивировании эмбрионов с аутологичными клетками кумулюса в криоциклах (20,6% - в группе сокультивирования, 41,3% - при классическом культивировании).

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

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

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

**АЛГОРИТМ персонифицированного подхода к ведению пациенток  
с повторными неудачами имплантации**



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АМГ	Антимюллеров гормон
антГнРГ	Антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона
АФК	Активные формы кислорода
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВПЧ	Вирус папилломы человека
ВРТ	Вспомогательные репродуктивные технологии
ВЭЖХ-МС	Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
ГнРГ	Гонадотропин-рилизинг гормон
ДГЭА-С	Дегидроэпиандростерон-сульфат
ДИ	Доверительный интервал
ИКСИ	Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит
ИППП	Инфекции, передающиеся половым путем
17-ОП	17- оксипрогестерон
К	кортизол
ЛГ	Лютеинизирующий гормон
НГЭ	наружный генитальный эндометриоз
ОКК	Ооцит-кумулюсный комплекс
ОС	Окислительный стресс
ОШ	Отношение шансов
ПЭ	Перенос эмбриона в полость матки
ПНИ	Повторные неудачи имплантации
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
СТГ	Соматотропный гормон
ТВП	Трансвагинальная пункция яичников
ТТГ	Тиреотропный гормон

УЗИ	Ультразвуковое исследование
ФСГ	Фолликулостимулирующий гормон
ЧНБ	Частота наступления беременности
чХГ	Хорионический гондотропин человека
ЯМР	Ядерная инфракрасная спектроскопия

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Исходы экстракорпорального оплодотворения как мультифакторная проблема клинической репродуктологии / Е.Б. Рудакова [и др.] // Лечащий врач. – 2015. – №9. – С. 84-91.
2. Крылова, Ю. С. Рецептивность эндометрия: молекулярные механизмы регуляции имплантации / Ю. С. Крылов., И. М. Кветной, Э. К. Айламазян // Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. – Т. 62. – №. 2.
3. Культивирование эмбрионов в среде, содержащей в своем составе гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор в программах ВРТ / С. А. Ярыгина, В. Ю. Смольникова, М. Ю. Бобров [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2019. - N 1 – С. 50-54.
4. Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии / Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова, Л. Н. Кузьмичева. – М.: МИА, 2005. – 592 С.
5. Макарова, Н.П. Критерии оценки качества ооцитов в циклах ИКСИ: взгляд клинического эмбриолога / Н. П. Макарова, Е. А. Калинина // Гинекология. – 2012. – № 14. – С. 24– 28.
6. Оценка качества эмбриона по профилю экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбриона в программах вспомогательных репродуктивных технологий / А. В. Тимофеева, Е. А. Калинина, Ю. С. Драпкина [и др.] // Акушерство и гинекология. -2019. – N 6. – С. 79-86.
7. Перспективы исследования маркеров клеток кумулюса для оценки качества ооцитов и эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Н. А. Сафронова, Е. А. Калинина, А. Е. Донников [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2015. -N 12. – С. 21-25.

8. Роль липидных гранул в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих /Е. Ю. Брусенцев, В. И. Мокроусов, Т. Н. Игоница [и др.] // Онтогенез. – 2019. –Т.50, N 5. –С. 297-305.
9. A biochemical approach to detect oxidative stress in infertile women undergoing assisted reproductive technology procedures / M. Becatti, R. Fucci, A. Mannucci [ et.al.] / Int J Molecular Sci. – 2018. - N19. –P. 1–15.
10. A comparison of biochemical pregnancy rates between women who underwent IVF and fertile controls who conceived spontaneously† / A. Zeadna, WY. Son, JH. Moon [ et al.] // Human Reproduction. – 2015. - Vol.30, N 4. – P.783-788.
11. A fatty acid profiling method using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for improvement of assisted reproductive technology / A. Yagi, S. Miyanaga, R. Shrestha [ et al.] / Clinical Chim Acta. – 2016. - N 1;456: 100-106.
12. A prospective evaluation of the effect of salpingectomy on endometrial receptivity in cases of women with communicating hydrosalpinges // I. Bildirici, O. Bukulmez, A. Ensari [ eta l.] // Human Reproduction. 2001. –Vol.16, N 11. – P.2422–2426.
13. A simplified coculture system using homologous, attached cumulus tissue results in improved human embryo morphology and pregnancy rates during in vitro fertilization / DT. Carrell, CM. Peterson, KP. Jones [ et al.] // J Assist Reproduction Genet. – 1999. – Vol.16, N 7. – P. 344-349.
14. Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by time-lapse microscopy: is there a relation to implantation and ploidy? / N. Zaninovic, M. Irani, M. Meseguer // Fertility Sterility. – 2017. - Vol.108, N 5. – P.722-729.
15. Autologous embryo-cumulus cells co-culture and blastocyst transfer in repeated implantation failures: a collaborative prospective randomized

- study. / M. Benkhalifa, A. Demireol, T. Sari [ et al.] // *Zygote*. – 2012.- Vol. 20, N 2. – P.173-180.
16. Ben-Meir, A.; Kim, K.; McQuaid, R.; Esfandiari, N.; Bentov, Y.; Casper, R.F.; Jurisicova, A. Co-Enzyme Q10 Supplementation Rescues Cumulus Cells Dysfunction in a Maternal Aging Model. *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – P. 58.
17. Centers for Disease Control and Prevention. 2015 Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2017.
18. Chazara O, Xiong S, Moffett A, Maternal KIR. Fetal HLA-c: a fine balance. // *J Leukoc Biol*. -2011. - N 90. – P.703–716.
19. Chronopoulou E, Harper JC. IVF culture media: past, present and future. *Hum Reprod Update*. 2015 Jan-Feb;21(1):39-55. doi: 10.1093/humupd/dmu040. Epub 2014 Jul 17. PMID: 25035437.
20. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Lepera A, Alfonso R, Indraccolo U, Marrocchella S, Greco P, Resta L. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. *Hum Reprod*. 2015 Feb;30(2):323-30. doi: 10.1093/humrep/deu292. Epub 2014 Nov 10. PMID: 25385744.
21. Cihangir N, Görkemli H, Ozdemir S, Aktan M, Duman S. Influence of cumulus cell coculture and cumulusaided embryo transfer on embryonic development and pregnancy rates. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2010 Sep 1;11(3):121-6. doi: 10.5152/jtgga.2010.017. PMID: 24591916; PMCID: PMC3939217.
22. Cimadomo D, Rienzi L, Conforti A, Forman E, Canosa S, Innocenti F, Poli M, Hynes J, Gemmell L, Vaiarelli A, Alviggi C, Ubaldi FM, Capalbo A. Opening the black box: why do euploid blastocysts fail to implant? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2023 May 16:dmad010. doi: 10.1093/humupd/dmad010. Epub ahead of print. PMID: 37192834.



23. Clinical application of immunomagnetic reduction for quantitative analysis of beta-subunit of human chorionic gonadotropin in blastocyst culture media to differentiate embryo quality / CY. Chen, YM. Hwu, YW. Weng [ et al.] // *Clinical Chim Acta.* – 2019. – Vol.491. – P.46-51. \ Cnattingius, S.
24. Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res.* 2004 Apr;6 Suppl 2:S125-40. doi: 10.1080/14622200410001669187. PMID: 15203816.
25. Coates A, Kung A, Mounts E, Hesla J, Bankowski B, Barbieri E, Ata B, Cohen J, Munné S. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2017 Mar;107(3):723-730.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.022. Epub 2017 Jan 27. PMID: 28139240.
26. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: A retrospective cohort study/ SL. Chen, FR. Wu, C. Luo [et al.] // *Reproduction Biology Endocrinology.* – 2010. – N 8. – P.30.
27. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2010 May-Jun;16(3):231-45. doi: 10.1093/humupd/dmp048. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19934213.
28. Cortezzi SS, Cabral EC, Trevisan MG, Ferreira CR, Setti AS, Braga DP, Figueira Rde C, Iaconelli A Jr, Eberlin MN, Borges E Jr. Prediction of embryo implantation potential by mass spectrometry fingerprinting of the culture medium. *Reproduction.* 2013 Apr 29;145(5):453-62. doi: 10.1530/REP-12-0168. PMID: 23404850.

29. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirel A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*. 2014 Jan;28(1):14-38. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.08.011. Epub 2013 Sep 14. PMID: 24269084.
30. Coughlan C, Walters S, Ledger W, Li TC. A comparison of psychological stress among women with and without reproductive failure. *Int J Gynecol Obstet*. 2014;124(2):143–7.
31. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(3):322–7.
32. Craciunas L, Gallos I, Chu J, Bourne T, Quenby S, Brosens JJ, et al.. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* (2019) 25:202–23.
33. Cross-validation and predictive value of near-infrared spectroscopy algorithms for day-5 blastocyst transfer / A. Ahlström, M. Wikland, L. Rogberg [ et al.] // *Reproduction Biomed Online*. – 2011. – Vol.22, N 5. – P.477-484.
34. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts / BD. Bavister // *Human Reproduction Update*. – 1995. – Vol.1, N 2. – P.91-148.
35. Cutting R, Morroll D, Roberts SA et al. Elective single embryo transfer: Guidelines for practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. *Hum Fertil (Camb)*.2008;11(3):131–46.
36. Cutting R. Single embryo transfer for all. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 Nov;53:30-37. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.07.001. Epub 2018 Jul 31. PMID: 30104130.
37. De Sutter P, Stadhouders R, Dutré M, Gerris J, Dhont M. Prevalence of chromosomal abnormalities and timing of karyotype analysis in patients with recurrent implantation failure (RIF) following assisted

- reproduction. *Facts Views Vis Obygn.* 2012;4(1):59-65. PMID: 24753890; PMCID: PMC3991441.
38. Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization / H. Achache, A. Tsafirir, D. Prus [ et al.] // *Fertility Sterility.* -2010. - N 94. – P.1271–1278.
39. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species / MA. Bedaiwy, T. Falcone, MS. Mohamed [ et al.] // *Fertility Sterility.* – 2004.- Vol. 82.- p. 593–600.
40. Domínguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod.* 2008 Sep;23(9):1993-2000. doi: 10.1093/humrep/den205. Epub 2008 Jun 12. PMID: 18556682.
41. Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and  $\beta$ -oxidation. *Reproduction.* 2014 Jul;148(1):R15-27. doi: 10.1530/REP-13-0251. Epub 2014 Apr 23. PMID: 24760880.
42. Ebert P, Völklein K. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril.* 2010 Apr;93(6):e25; author reply e26. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.12.048. Epub 2010 Feb 18. PMID: 20167317.
43. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Shebl O, Tews G. Incomplete denudation of oocytes prior to ICSI enhances embryo quality and blastocyst development. *Hum Reprod.* 2006 Nov;21(11):2972-7. doi: 10.1093/humrep/del272. Epub 2006 Jul 11. PMID: 16835216.
44. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis/ AL. Waylen, M. Metwally, GL. Jones [ et al.] // *Human Reproduction Update.* – 2009. - Vol.15, N 1. – P.31-44.

45. Effects of glucose metabolism pathways on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes / J. Wen, GL. Wang, HJ. Yuan [et al.] // *Sci Rep.* – 2020. – Vol.10, N 1. – P.2782.
46. Effects of twin gestation on maternal morbidity / DC. Young, BJ. Wylie // *Semin Perinatology.* – 2012. – Vol.36, N 3. – P.162-168.
47. Ekart J, McNatty K, Hutton J, Pitman J. Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. *Hum Reprod.* 2013 Nov;28(11):2930-42. doi: 10.1093/humrep/det357. Epub 2013 Sep 15. PMID: 24041818.
48. Ember KJI, Hoeve MA, McAughtrie SL, Bergholt MS, Dwyer BJ, Stevens MM, Faulds K, Forbes SJ, Campbell CJ. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *NPJ Regen Med.* 2017 May 15;2:12. doi: 10.1038/s41536-017-0014-3. PMID: 29302348; PMCID: PMC5665621.
49. Endometrial injury increases expression of hypoxia-inducible factor and angiogenesis in the endometrium of women with recurrent implantation failure / X. Yu, C. Gao, C. Dai [ et al.] // *Reproduction Bio Medicine Online.*- 2019. –N 38. – P.761–767.
50. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF / CM. Boomsma, A. Kavelaars, MJ. Eijkemans [ et al.] // *Human Reproduction.* – 2009. – Vol.24, N 6. – P.1427-1435.
51. Esencan E, Beroukhim G, Seifer DB. Age-related changes in Folliculogenesis and potential modifiers to improve fertility outcomes - A narrative review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2022 Nov 17;20(1):156. doi: 10.1186/s12958-022-01033-x. PMID: 36397149; PMCID: PMC9670479.
52. Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction a hypothesis. *Biol Reprod* 22: 73–106, 1980
53. Expression of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 in the rat ovary in response to an ovulatory dose of gonadotropin / S. Yoshioka, S.

- Ochsner, DL. Russell [ et al.] // *Endocrinology*. – 2000. – Vol. 141. – P. 4114–4119.
54. Eyheremendy V, Raffo FG, Papayannis M, Barnes J, Granados C, Blaquier J. Beneficial effect of autologous endometrial cell coculture in patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril*. 2010 Feb;93(3):769-73. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.10.060. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19249034.
55. Fedorcsák P, Storeng R, Dale PO, Tanbo T, Abyholm T. Obesity is a risk factor for early pregnancy loss after IVF or ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000 Jan;79(1):43-8. PMID: 10646815.
56. Feng X, Meng X, Guo S, Li K, Wang L, Ai J. Identification of key genes and immune cell infiltration in recurrent implantation failure: A study based on integrated analysis of multiple microarray studies. *Am J Reprod Immunol* (2022) 88:e13607.
57. Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R, Royere D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod*. 2007 Dec;22(12):3069-77. doi: 10.1093/humrep/dem336. Epub 2007 Oct 19. PMID: 17951581.
58. Forman EJ, Upham KM, Cheng M, Zhao T, Hong KH, Treff NR, Scott RT Jr. Comprehensive chromosome screening alters traditional morphology-based embryo selection: a prospective study of 100 consecutive cycles of planned fresh euploid blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2013 Sep;100(3):718-24. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.043. Epub 2013 May 30. PMID: 23725804.
59. Gardner DK, Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Mol Hum Reprod*. 2016 Oct;22(10):704-718. doi: 10.1093/molehr/gaw057. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27578774.

60. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril*. 2001 Dec;76(6):1175-80. doi: 10.1016/s0015-0282(01)02888-6. PMID: 11730746.
61. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 2008 Mar-Apr;14(2):159-77. doi: 10.1093/humupd/dmm040. Epub 2008 Jan 5. PMID: 18175787.
62. Glycolysis-Independent Glucose Metabolism Distinguishes TE from ICM Fate during Mammalian Embryogenesis / F. Chi, MS. Sharpley, R. *Dev Cell*. – 2020. - Apr 6;53, N 1. – P. 9-26. e4.
63. Godard NM, Pukazhenti BS, Wildt DE, Comizzoli P. Paracrine factors from cumulus-enclosed oocytes ensure the successful maturation and fertilization in vitro of denuded oocytes in the cat model. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5 Suppl):2051-60. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.05.069. Epub 2008 Aug 9. PMID: 18692794; PMCID: PMC2730373.
64. Granulosa cell-oocyte interactions / S. Cecconi, C. Ciccarelli, M. Barberi // *Eur J Obstetrics Gynecology Reproduction Biology*. – 2004. – Vol. 115. – P. 19–22.
65. Grindler NM, Moley KH. Maternal obesity, infertility and mitochondrial dysfunction: potential mechanisms emerging from mouse model systems. *Mol Hum Reprod*. 2013 Aug;19(8):486-94. doi: 10.1093/molehr/gat026. Epub 2013 Apr 23. PMID: 23612738; PMCID: PMC3712655.
66. Gunby J, Daya S; IVF Directors Group of the Canadian Fertility and Andrology Society. Assisted reproductive technologies (ART) in Canada: 2002 results from the Canadian ART Register. *Fertil Steril*. 2006 Nov;86(5):1356-64. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.04.030. PMID: 17070192.

67. Gupta S, Malhotra N, Sharma D, Chandra A, and Ashok A. Oxidative stress and its role in female infertility and assisted reproduction: clinical implications. *Int J Fertil Steril* 2: 147–164, 2009
68. Gustavo Nardini Cecchino and Juan Antonio García-Velasco, Is oocyte donation efficient in patients with recurrent implantation failure? July 2019 DOI:10.1201/9781315165707-16 In book: *Recurrent Implantation Failure* (pp.150-157).
69. Haggarty P, Wood M, Ferguson E, Hoad G, Srikantharajah A, Milne E, Hamilton M, Bhattacharya S. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod.* 2006 Mar;21(3):766-73. doi: 10.1093/humrep/dei385. Epub 2005 Nov 25. PMID: 16311299.
70. Halliwell B and Gutteridge JMC. Measurement of reactive species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., edited by Davies K. Oxford, United Kingdom: Clarendon Press, 2006, pp. 449–450.
71. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35: 1147–1150, 2007.
72. Hardarson T, Ahlström A, Rogberg L, Botros L, Hillensjö T, Westlander G, Sakkas D, Wikland M. Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Hum Reprod.* 2012 Jan;27(1):89-96. doi: 10.1093/humrep/der373. Epub 2011 Nov 7. PMID: 22068638.
73. Harvey A, Kind KL, and Thompson JG. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction* 123: 479–486, 2002
74. High pregnancy rates with administration of granulocyte colony-stimulating factor in ART-patients with repetitive implantation failure and lacking killer-cell immunoglobulin-like receptors / W. Wurfel, C. Santjohanser, K. Hirv [et al.] // *Human Reproduction*. – 2010.- Vol. 25. –P. 2151–2152.

75. Holley SR, Pasch LA, Bleil ME et al. Prevalence and predictors of major depressive disorder for fertility treatment patients and their partners. *Fertil Steril*. 2015;103:1332–9.
76. Horne G, Critchlow JD, Newman MC, Edozien L, Matson PL, Lieberman BA. A prospective evaluation of cryopreservation strategies in a two-embryo transfer programme. *Hum Reprod*. 1997;12(3):542–7.
77. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod*. 2002 Apr;17(4):999-1005. doi: 10.1093/humrep/17.4.999. Erratum in: *Hum Reprod*. 2003 Aug;18(8):1756-7. PMID: 11925397.
78. Huang Z, Sun Y, Wang J, Du S, Li Y, Lin J, Feng S, Lei J, Lin H, Chen R, Zeng H. Rapid and nondestructive method for evaluation of embryo culture media using drop coating deposition Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2013 Dec;18(12):127003. doi: 10.1117/1.JBO.18.12.127003. PMID: 24343445.
79. Huang Z, Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol Hum Reprod*. 2010 Oct;16(10):715-25. doi: 10.1093/molehr/gaq031. Epub 2010 Apr 29. PMID: 20435609.
80. Huey S, Abuhamad A, Barroso G, Hsu MI, Kolm P, Mayer J, and Oehninger S. Perifollicular blood flow Doppler indices, but not follicular pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, or pH, predict oocyte developmental competence in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 72: 707–712, 1999.
81. Impact of embryo co-culture with cumulus cells on pregnancy & implantation rate in patients undergoing in vitro fertilization using donor oocyte / HK. Bhadarka, NH. Patel, NH. Patel [ et al.] // *Indian J Med Res*. – 2017. - Sep;146, N 3. – P. 341-345.
82. Improved pregnancy outcomes of cyclosporine a on patients with unexplained repeated implantation failure in IVF/ICSI cycles: A



- retrospective cohort study / W. Cheng, Y. Wu, H. Wu [ et al.] /// *Am J Reproduction Immunology*. -2022. – Vol. 87. -e13525.
83. Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture / A. Bongso, SC. Ng, CY. Fong [ et al.] // *Fertility Sterility*. – 1992. – Vol.58, N 3. – P.569-574.
84. Jayot S, Parneix I, Verdaguer S, Discamps G, Audebert A, Empeiraire JC. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril*. 1995 Jan;63(1):109-14. doi: 10.1016/s0015-0282(16)57304-x. PMID: 7805897.
85. Johnson JE, Higdon HL 3rd, Boone WR. Effect of human granulosa cell co-culture using standard culture media on the maturation and fertilization potential of immature human oocytes. *Fertil Steril*. 2008 Nov;90(5):1674-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.06.017. Epub 2007 Oct 22. PMID: 17953965.
86. Junovich G, Azpiroz A, Incera E, Ferrer C, Pasqualini A, Gutierrez G. Endometrial CD16(+) and CD16(-) NK cell count in fertility and unexplained infertility. *Am J Reprod Immunol* (2013) 70:182–9.
87. Karakaya C, Guzeloglu-Kayisli O, Uyar A, Kallen AN, Babayev E, Bozkurt N, Unsal E, Karabacak O, Seli E. Poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization is associated with altered microRNA expression in cumulus cells. *Fertil Steril*. 2015 Jun;103(6):1469-76.e1-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.02.035. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25910568; PMCID: PMC5648585.
88. Kattal N, Cohen J, Barmat LI. Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008 Oct;90(4):1069-76. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.07.1349. Epub 2008 May 19. PMID: 18490016.
89. Kennedy T. *Eicosanoids and Reproduction*. MTP Press Limited; Vancouver, BC, Canada: 2012. Interactions of eicosanoids and other factors in blastocyst implantation; p. 73.

90. Kim M.J., Kim Y.S., Kim Y.J., Lee H.R., Choi K.H., Park E.A. et al. Upregulation of low-density lipoprotein receptor of the steroidogenesis pathway in the cumulus cells is associated with the maturation of oocytes and achievement of pregnancy. *Cells*. 2021; 10(9): 2389. <https://dx.doi.org/10.3390/cells10092389>.
91. Kissin DM, Kulkarni AD, Kushnir VA, Jamieson DJ; National ART Surveillance System Group. Number of embryos transferred after in vitro fertilization and good perinatal outcome. *Obstet Gynecol*. 2014 Feb;123(2 Pt 1):239-247. doi: 10.1097/AOG.000000000000106. PMID: 24402601; PMCID: PMC4607031.
92. Koler M, Achache H, Tsafirir A, Smith Y, Revel A, Reich R. Disrupted gene pattern in patients with repeated in vitro fertilization (IVF) failure. *Hum Reprod* (2009) 24:2541–8.
93. Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: Which one is better? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009;21(3):270–4.
94. Kovacs P, Matyas S, Boda K, Kaali SG. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI out-come. *Hum Reprod*. 2003;18(11):2337–41.
95. Kowalik CR, Goddijn M, Emanuel MH, Bongers MY, Spinder T, de Kruif JH, Mol BW, Heineman MJ. Metroplasty versus expectant management for women 119 with recurrent miscarriage and a septate uterus. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;6:CD008576.
96. Kragh MF, Rimestad J, Berntsen J, Karstoft H. Automatic grading of human blastocysts from time-lapse imaging. *Comput Biol Med*. 2019 Dec;115:103494. doi: 10.1016/j.combiomed.2019.103494. Epub 2019 Oct 15. PMID: 31630027.
97. Krisher RL, Heuberger AL, Paczkowski M, Stevens J, Pospisil C, Prather RS, Sturmey RG, Herrick JR, Schoolcraft WB. Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology,

- development and assisted reproductive technology. *Reprod Fertil Dev*. 2015 May;27(4):602-20. doi: 10.1071/RD14359. PMID: 25763765.
98. Kushnir VA, Solouki S, Sarig-Meth T, Vega MG, Albertini DF, Darmon SK, Deligdisch L, Barad DH, Gleicher N. Systemic Inflammation and Autoimmunity in Women with Chronic Endometritis. *Am J Reprod Immunol*. 2016 Jun;75(6):672-7. doi: 10.1111/aji.12508. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26952510.
99. Kwak-Kim JY, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, Mangubat CP, Beaman KD, et al.. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod* (2003) 18:767–73.
100. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med*. 2013 Jun 26;11:154. doi: 10.1186/1741-7015-11-154. PMID: 23803387; PMCID: PMC3699442.
101. Lattova V, Dostal J, Peskova M, Sobek A, Jr., Prochazka M. [Recurrent implantation failure and thrombophilia]. *Ceska gynekologie/Ceska lekarska spolecnost J Ev Purkyne*. 2015;80(1):5–10.
102. Laufer N, Simon A. Recurrent implantation failure: Current update and clinical approach to an ongoing challenge. *Fertil Steril*. 2012;97(5):1019–20.
103. Ledee N, Petitbarat M, Chevrier L et al. The uterine immune profile may help women with repeated unexplained embryo implantation failure after in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):388–401.
104. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*. 2001 Sep;18(9):490-8. doi: 10.1023/a:1016649026353. PMID: 11665664; PMCID: PMC3455731.

105. Levitas E, Lunenfeld E, Har-Vardi I, Albotiano S, Sonin Y, Hackmon-Ram R, Potashnik G. Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Fertil Steril*. 2004 Mar;81(3):567-71. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.08.031. PMID: 15037404.
106. Lieberman BA, Troup SA, Matson PL. Cryopreservation of embryos and pregnancy rates after IVF. *Lancet*. 1992;340(8811):116.
107. Lim M, Brown HM, Kind KL, Thompson JG, and Dunning KR. Hemoglobin: potential roles in the oocyte and early embryo. *Biol Reprod* 101: 262–270, 2019.
108. Limitations of embryo selection methods / KM. Wong, S. Repping, S. Mastenbroek // Seminar Reproduction Medicine. -. 2014. - Vol.32, N 2. – P.127-133.
109. Lin YH, Hwang JL, Seow KM, Huang LW, Chen HJ, Tzeng CR. Effects of growth factors and granulosa cell co-culture on in-vitro maturation of oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2009 Aug;19(2):165-70. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60068-5. PMID: 19712550.
110. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008;90(1):186–93;
111. Loutradis D, Theofanakis C, Anagnostou E, Mavrogianni D, Partsinevelos GA. Genetic profile of SNP(s) and ovulation induction. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Mar;13(3):417-25. doi: 10.2174/138920112799361954. PMID: 21657995.
112. Lu S, Hoestje SM, Choo E, Epner DE. Induction of caspase-dependent and -independent apoptosis in response to methionine restriction. *Int J Oncol*. 2003 Feb;22(2):415-20. PMID: 12527942.
113. Lundin K, Ahlström A. Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers. *Reprod Biomed*

- Online. 2015 Oct;31(4):459-71. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.06.026. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26277586.
114. Ma J, Gao W, Li D. Recurrent implantation failure: A comprehensive summary from etiology to treatment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Jan 5;13:1061766.
115. Magdi Y, El-Damen A, Fathi AM et al. Revisiting the management of recurrent implantation failure through freeze-all policy. *Fertil Steril*. 2017;108(1):72–7.
116. Male V, Hughes T, McClory S, Colucci F, Caligiuri MA, Moffett A. Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa. *J Immunol*. 2010 Oct 1;185(7):3913-8. doi: 10.4049/jimmunol.1001637. Epub 2010 Aug 27. PMID: 20802153; PMCID: PMC3795409.
117. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Abbass AM. Co-culture of human pronucleate oocytes with their cumulus cells. *Hum Reprod*. 1994 Sep;9(9):1727-9. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138782. PMID: 7836526.
118. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3036–43.
119. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update*. 2011 Jul-Aug;17(4):454-66. doi: 10.1093/humupd/dmr003. Epub 2011 Apr 29. Erratum in: *Hum Reprod Update*. 2013 Mar-Apr;19(2):206. PMID: 21531751.
120. McKeegan PJ, Sturmey RG. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. *Reprod Fertil Dev*. 2011;24(1):59-67. doi: 10.1071/RD11907. PMID: 22394718
121. McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene

- expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2004 Dec;19(12):2869-74. doi: 10.1093/humrep/deh535. Epub 2004 Oct 7. PMID: 15471935.
122. McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neubourg D, Dumoulin JC, Gerris J, Kremer JA, Martikainen H, Mol BW, Norman RJ, Thurin-Kjellberg A, Tiitinen A, van Montfoort AP, van Peperstraten AM, Van Royen E, Bhattacharya S. Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *BMJ.* 2010 Dec 21;341:c6945. doi: 10.1136/bmj.c6945. PMID: 21177530; PMCID: PMC3006495.
123. Melo MA, Meseguer M, Garrido N, Bosch E, Pellicer A, Remohi J. The significance of premature luteinization in an oocyte-donation programme. *Hum Reprod (Oxf, Engl).* 2006;21(6):1503–7.
124. Ménézo Y, Lichtblau I et al ;Lu S, Hoestje SM, Choo E, Epner DE. Induction of caspase dependant and independant apoptosis in response to methionine restriction. *Int J Oncol.* 2003;22:415–420.
125. Ménézo Y, Lichtblau I, Elder K. New insights into human pre-implantation metabolism in vivo and in vitro. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Mar;30(3):293-303. doi: 10.1007/s10815-013-9953-9. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23430228; PMCID: PMC3607680.
126. Mengden L., Klamt F., Smitz J. Redox Biology of Human Cumulus Cells: Basic Concepts, Impact on Oocyte Quality, and Potential Clinical Use. *Antioxid Redox Signal.* March 10, 2020; 32(8): 522–535. Published online 2020 Feb 4. doi: 10.1089/ars.2019.7984.
127. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011 Oct;26(10):2658-71. doi: 10.1093/humrep/der256. Epub 2011 Aug 9. PMID: 21828117.

128. Mills M, Rindfuss RR, McDonald P, te Velde E. Why do people postpone parenthood? Reasons and social policy incentives. *Hum Reprod Update*. 2011;17(6):848–60.
129. Mirabi P, Chaichi MJ, Esmaeilzadeh S, Ali Jorsaraei SG, Bijani A, Ehsani M, Hashemi Karooee SF. The role of fatty acids on ICSI outcomes: a prospective cohort study. *Lipids Health Dis*. 2017 Jan 21;16(1):18. doi: 10.1186/s12944-016-0396-z. PMID: 28109274; PMCID: PMC5251249.
130. Moffett A, Colucci F, Botting RA. Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction. *Immunol Rev* (2015) 267(1):283–97.
131. Moragianni VA, Jones SM, Ryley DA. The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*. 2012 Jul;98(1):102-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.004. Epub 2012 May 12. PMID: 22584023.
132. Morbeck DE. Blastocyst culture in the Era of PGS and FreezeAlls: Is a 'C' a failing grade? *Hum Reprod Open*. 2017 Nov 10;2017(3):hox017. doi: 10.1093/hropen/hox017. PMID: 30895231; PMCID: PMC6276670..
133. Morris MB, Ozsoy S, Zada M, Zada M, Zamfirescu RC, Todorova MG, Day ML. Selected Amino Acids Promote Mouse Pre-implantation Embryo Development in a Growth Factor-Like Manner. *Front Physiol*. 2020 Mar 10;11:140. doi: 10.3389/fphys.2020.00140. PMID: 32210831; PMCID: PMC7076138.
134. Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S et al. Assisted reproductive technology in Europe,2007: Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2012;27(4):954–66.
135. Nakagawa K, Kwak-Kim J, Ota K, Kuroda K, Hisano M, Sugiyama R, Yamaguchi K. Immunosuppression with tacrolimus improved reproductive outcome of women with repeated implantation

- failure and elevated peripheral blood TH1/TH2 cell ratios. *Am J Reprod Immunol.* 2015 Apr;73(4):353-61. doi: 10.1111/aji.12338. Epub 2014 Nov 14. PMID: 25394810.
136. Nepomnaschy PA, Welch KB, McConnell DS, Low BS, Strassmann BI, England BG. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 7;103(10):3938-42. doi: 10.1073/pnas.0511183103. Epub 2006 Feb 22. PMID: 16495411; PMCID: PMC1533790.
137. Nerenz RD. Omics in Reproductive Medicine: Application of Novel Technologies to Improve the IVF Success Rate. *Adv Clin Chem.* 2016;76:55-95. doi: 10.1016/bs.acc.2016.05.001. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27645816.
138. Ng KYB, Mingels R, Morgan H, Macklon N, and Cheong Y. In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Hum Reprod Update* 24: 15–34, 2018.
139. Nisenblat V., Norman RJ. The role of lifestyle factors in recurrent implantation failure. In book: *Recurrent Implantation Failure* (pp.14-26). July 2019. DOI: 10.1201/9781315165707-3.
140. NMR based metabolic profiling of day 2 spent embryo media correlates with implantation potential / M. Wallace, E. Cottelle, J. Cullinane [ et al.] // *Syst Biology Reproduction Medicine.* – 2014. – Vol.60, N 1. – P.58-63.
141. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage / CC. Wong, KE. Loewke, NL. Bossert [ et al.] // *Nat Biotechnology.* – 2010. - Vol.28, N 10. – P.1115-1121.
142. Noyes N, Liu HC, Sultan K, Schattman G, Rosenwaks Z. Endometrial thickness appears to be a significant factor in embryo implantation in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.*1995;10(4):919–22.



143. Orvieto R, Brengauz M, Feldman B. A novel approach to normal responder patient with repeated implantation failures--a case report. *Gynecol Endocrinol.* 2015 Jun;31(6):435-7. doi: 10.3109/09513590.2015.1005595. Epub 2015 Mar 3. PMID: 25731193.
144. Orvieto R, Meltzer S, Nahum R, Rabinson J, Anteby EY, Ashkenazi J. The influence of body mass index on in vitro fertilization outcome. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009 Jan;104(1):53-5. doi: 10.1016/j.ijgo.2008.08.012. Epub 2008 Oct 28. PMID: 18957271.
145. Oxidative stress and the ovary / HR. Behrman, PH. Kodaman, SL. Preston [ et al.] // *J Soc Gynecology Investig.* – 2001. – Vol. 8. - S40–S42.
146. Palermo G, Joris H, Devroey P, and Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340: 17–18, 1992.
147. Pang Z, Chong J, Zhou G, de Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, Gauthier C, Jacques PÉ, Li S, Xia J. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jul 2;49(W1):W388-W396. doi: 10.1093/nar/gkab382. PMID: 34019663; PMCID: PMC8265181.
148. Parikh FR, Nadkarni SG, Naik NJ, Naik DJ, Uttamchandani SA. Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2006 Oct;86(4):839-47. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.03.028. Epub 2006 Sep 7. PMID: 16962106.
149. Pathare ADS, Zaveri K, Hinduja I. Downregulation of genes related to immune and inflammatory response in IVF implantation failure cases under controlled ovarian stimulation. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(1).

150. Petraglia F, Serour GI, Chapron C. The changing prevalence of infertility. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013 Dec;123 Suppl 2: S4-8. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.09.005. Epub 2013 Sep 7. PMID: 24112745.
151. Physiological and pathological angiogenesis in endometrium at the time of embryo implantation / X. Chen, GCW. Man, Y. Liu [et al.] // *Am J Reproduction Immunology.* – 2017.- P. 78.
152. Piekarska K, Radwan P, Tarnowska A, Wisniewski A, Radwan M, Wilczynski JR, et al.. ERAP, KIR, and HLA-c profile in recurrent implantation failure. *Front Immunol* (2021) 12:755624.
153. Poh QH, Rai A, Salamonsen LA, Greening DW. Omics insights into extracellular vesicles in embryo implantation and their therapeutic utility. *Proteomics.* 2023 Mar;23(6):e2200107. doi: 10.1002/pmic.202200107. Epub 2023 Jan 10. PMID: 36591946.
154. Polanski LT, Baumgarten MN, Quenby S, Brosens J, Campbell BK, Raine-Fenning NJ. What exactly do we mean by “recurrent implantation failure”? A systematic review and opinion. *Reprod Biomed Online.* 2014;28(4):409–23.
155. Potdar N, Gelbaya TA, Konje JC, Nardo LG. Adjunct low molecular-weight heparin to improve live birth rate after recurrent implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* (2013) 19:674–84)
156. Pribenszky C, Mátyás S, Kovács P, Losonczi E, Zádori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online.* 2010 Oct;21(4):533-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.04.015. Epub 2010 Apr 24. PMID: 20638906.
157. Purine utilisation, de novo synthesis and degradation in mouse preimplantation embryos /M. Alexiou, HJ. Leese // *Development.* – 1992. - Vol.114, N1. – P.185-192.

158. Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA et al. Acquired and inherited thrombophilia: Implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod.* 2006;21(10):2694–8.
159. Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet.* 1996 Jan;13(1):9-14. doi: 10.1007/BF02068862. PMID: 8825160.
160. Rakhit M, Gokul SR, Agarwal A, and du Plessis SS. Antioxidant strategies to overcome OS in IVF-embryo transfer. In: *Studies on Women's Health*, 1st ed., edited by Agarwal AAziz NRizk B. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 237–262.
161. Raziel A, Friedler S, Schachter M, Kasterstein E, Strassburger D, Ron-El R. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002 Sep;78(3):515-9. doi: 10.1016/s0015-0282(02)03298-3. PMID: 12215326.
162. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions / A. Bashiri, KI. Halper, R. Orvieto / *Reproduction Biology Endocrinology.* – 2018. -Dec 5;16, N 1. – P.121.
163. Remedies for recurrent implantation failure. / HB. Zeyneloglu, G. Onalan // *Seminar Reproduction Medicine.* -2014. - Vol.32, N 4. – P.297-305.
164. Reproductive aging is associated with changes in oocyte mitochondrial dynamics, function, and mt DNA quantity/ E. Babayev, T. Wang, K. Szigeti-Buck [et al.] // *Maturitas.* – 2016. – Vol. 93. – P.121–30.
165. Revel A. Defective endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2012;97(5):1028–32.

166. Richani D, Dunning KR, Thompson JG et al. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. *Hum Reprod Update*. 2021 Jan 4;27(1):27-47. doi: 10.1093/humupd/dmaa043. PMID: 33020823.
167. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, and Espey LL. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol* 64: 69–92, 2002.
168. Richter KS, Bugge KR, Bromer JG, Levy MJ. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of twoblastocyst-stage embryos. *Fertil Steril*. 2007;87(1):53–9.
169. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: Systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017;23(2):139–55.
170. Saccone G, Zullo F, Roman A, Ward A et al. Risk of spontaneous preterm birth in IVF-conceived twin pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019 Feb;32(3):369-376. doi: 10.1080/14767058.2017.1378339. Epub 2017 Sep 21. PMID: 28889776.
171. Sacks G, Yang Y, Gowen E et al. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure. *Am J Reprod Immunol*. 2012 May;67(5):434-42. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01105.x. Epub 2012 Feb 1. PMID: 22296517.
172. Saito H, Hirayama T, Koike K et al. Cumulus mass maintains embryo quality. *Fertil Steril*. 1994 Sep;62(3):555-8. PMID: 8062952.

173. Sakkas D. Embryo selection using metabolomics. *Methods Mol Biol.* 2014;1154:533-40. doi: 10.1007/978-1-4939-0659-8\_24. PMID: 24782026.
174. Sánchez-Ribas I, Riqueros M, Vime P et al. Differential metabolic profiling of non-pure trisomy 21 human preimplantation embryos. *Fertil Steril.* 2012 Nov;98(5):1157-64.e1-2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.1145. Epub 2012 Sep 6. PMID: 22959456.
175. Sauer MV, Paulson RJ, Lobo RA. Reversing the natural decline in human fertility. An extended clinical trial of oocyte donation to women of advanced reproductive age. *JAMA.* 1992;268(10):1275-9.
176. Savio Figueira Rde C, Setti AS, Braga DP, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Blastocyst Morphology Holds Clues Concerning The Chromosomal Status of The Embryo. *Int J Fertil Steril.* 2015 Jul-Sep;9(2):215-20. doi: 10.22074/ijfs.2015.4242. Epub 2015 Jul 27. PMID: 26246880; PMCID: PMC4518490.
177. Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ et al. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril.* 2013 Sep;100(3):624-30. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.039. Epub 2013 Jun 15. PMID: 23773313.
178. Seli E, Botros L, Sakkas D et al. 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 Dec;90(6):2183-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.1739. Epub 2008 Oct 8. PMID: 18842260.
179. Seli E, Kayisli UA, Cakmak H et al. Removal of hydrosalpinges increases endometrial leukaemia inhibitory factor (LIF) expression at the time of the implantation window. *Hum Reprod.* 2005;20(11):3012-7.

180. Seli E, Sakkas D, Scott R et al. 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 Nov;88(5):1350-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.07.1390. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17923129.
181. Seli E, Vergouw CG, Morita H et al. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril*. 2010 Jul;94(2):535-42. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.078. Epub 2009 Jul 8. PMID: 19589524..
182. Serhal P, Craft I. Oocyte donation in 61 patients. *Lancet*. 1989;1185-7.
183. Shaeib F, Khan SN, Ali I et al. The defensive role of cumulus cells against reactive oxygen species insult in metaphase II mouse oocytes. *Reprod Sci* 23: 498-507, 2016.
184. Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S et al. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 1462-1467, 2011.
185. Simon A, Laufer N. Repeated implantation failure: Clinical approach. *Fertil Steril*.2012;97(5):1039-43.
186. Spandorfer SD, Pascal P, Parks J et al. Autologous endometrial coculture in patients with IVF failure: outcome of the first 1,030 cases. *J Reprod Med*. 2004 Jun;49(6):463-7. PMID: 15283055.
187. Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HW. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod*. 1999;14:2097-101.
188. Tan BK, Vandekerckhove P, Kennedy R, Keay SD. Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. *BJOG*. 2005;112(6):773-80.

189. The psychological consequences of recurrent implantation failure  
ALICE D. DOMAR and JEREMY J. COTTLE, July 2019  
DOI:10.1201/9781315165707-2 In book: Recurrent Implantation  
Failure (pp.2-13).
190. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. / A.  
Agarwal, S. Gupta, S. Sikka // Curr Opin Obstetrics Gynecology. –  
2006. - N18. – P. 325–332.
191. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in  
unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous  
abortion / J. Bellver, SR. Soares, C. Alvarez e [t al.] // Human  
Reproduction. -. 2008. – Vol. 23, N 2. – P. 278–284.
192. Turathum B, Gao EM, Chian RC. The Function of Cumulus Cells  
in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and  
Fertilization. Cells. 2021 Sep 2;10(9):2292. doi:  
10.3390/cells10092292. PMID: 34571941; PMCID: PMC8470117.
193. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an  
evidence based review / A. Agarwal, D. Durairajanayagam, SS. du  
Plessis // Reproduction Biology Endocrinology. 2014. -N 12. – P. 1–  
19.
194. van Montfoort AP, Geraedts JP, Dumoulin JC, Stassen AP, Evers  
JL, Ayoubi TA. Differential gene expression in cumulus cells as a  
prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. Mol  
Hum Reprod. 2008 Mar;14(3):157-68. doi: 10.1093/molehr/gam088.  
Epub 2008 Jan 18. PMID: 18204071.
195. Vendrell-Flotats M, García-Martínez T, Martínez-Rodero I,  
López-Béjar M, LaMarre J, Yeste M, Mogas T. In vitro maturation in  
the presence of Leukemia Inhibitory Factor modulates gene and miRNA  
expression in bovine oocytes and embryos. Sci Rep. 2020 Oct  
20;10(1):17777. doi: 10.1038/s41598-020-74961-6. PMID: 33082423;  
PMCID: PMC7575586.

196. Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Tarlatzis BC. Progesterone elevation and probability of pregnancy after IVF: A systematic review and meta-analysis of over 60 000 cycles. *HumReprod Update*. 2013;19(5):433–57.
197. Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, Burns DH, Lambalk CB. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod*. 2008 Jul;23(7):1499-504. doi: 10.1093/humrep/den111. Epub 2008 Apr 18. PMID: 18424459.
198. Vergouw CG, Heymans MW, Hardarson T, Sfontouris IA, Economou KA, Ahlström A, Rogberg L, Lainas TG, Sakkas D, Kieslinger DC, Kosteljik EH, Hompes PG, Schats R, Lambalk CB. No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates: results from an individual patient data meta-analysis. *Hum Reprod*. 2014 Mar;29(3):455-61. doi: 10.1093/humrep/det456. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24408316.
199. Vergouw CG, Kosteljik EH, Doejaaren E, Hompes PG, Lambalk CB, Schats R. The influence of the type of embryo culture medium on neonatal birthweight after single embryo transfer in IVF. *Hum Reprod*. 2012 Sep;27(9):2619-26. doi: 10.1093/humrep/des252. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22791752.
200. Virant-Klun I, Bauer C, Ståhlberg A, Kubista M, Skutella T. Human oocyte maturation in vitro is improved by co-culture with cumulus cells from mature oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2018 May;36(5):508-523. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.01.011. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29503212.
201. Vithoulkas A. et al. Co-culture of human embryos with autologous cumulus cell clusters and its beneficial impact of secreted growth factors on preimplantation development as compared to standard embryo



- culture in assisted reproductive technologies (ART), //Middle East Fertility Society Journal. – 2017. – T. 22. – №. 4. – p. 317-322.
202. Vomstein K, Voss P, Molnar K, Ainsworth A, Daniel V, Strowitzki T, Toth B, Kuon RJ. Two of a kind? Immunological and clinical risk factors differ between recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* 2020;141:103166
203. Voullaire L, Collins V, Callaghan T, McBain J, Williamson R, Wilton L. High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* (2007) 87:1053–8.
204. Wang, Q. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors / Q. Wang, QY. Sun // *Reproduction Fertility Dev.* – 2007. – Vol.19, N 1. -1-12.