

На правах рукописи

ГАМИДОВА

Парвин Сафаил кызы

**УЛУЧШЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНЫХ ИСХОДОВ ПРОГРАММ
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ С СЕЛЕКЦИЕЙ
СПЕРМАТОЗОИДОВ ПО МЕМБРАННОМУ ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛУ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Смольникова Вероника Юрьевна

Официальные оппоненты:

Краснопольская Ксения Владиславовна — член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии имени академика В. И. Краснопольского», отделение репродуктологии, руководитель

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

Ведущая организация:

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России

Защита диссертации состоится «16» декабря 2025 г. в 13:00 на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России

<https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Gamidova%20P-disser.pdf?1344556428>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Е.А. Калинина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В последние десятилетия проблема бесплодия стала одной из наиболее актуальных в области репродуктивной медицины. Исследования последних лет в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) направлены на изучение эффективности программ ЭКО при онкологических, эндокринологических заболеваниях, папилломавирусных и ВИЧ-инфекциях и др. (Мелкозерова О.А. и др., 2024; Краснопольская К.В. и др., 2024). В то же время значимость мужского фактора, который в настоящее время является причиной 40–50% всех случаев бесплодия супружеских пар, недооценена, влияние различных функциональных способностей сперматозоидов на эффективность программ ВРТ и здоровье потомства до конца не изучены (Гзгзян А.М. и др., 2025; Turkoglu et al., 2025).

Выбор наиболее фертильного сперматозоида для оплодотворения остается крайне актуальной задачей в репродуктивной медицине, поскольку от качества мужской гаметы зависит качество полученных эмбрионов, наступление беременности и ее пролонгирование (Каюмова Г.А. и др., 2025; Макарова Н.П. и др. 2025; Kitakaze T. et al., 2025). Современная наука сегодня предлагает множество технологий по отбору сперматозоидов, однако большинство из них остаются крайне трудоемки и дорогостоящи (рамановская спектрометрия, ИМСИ, микрофлюидика и др.). Клиническая практика крайне нуждается в простом и эффективном методе, помогающим отобрать наиболее компетентный сперматозоид.

Одним из подходов к селекции сперматозоидов является отбор на основании отрицательного заряда мембраны клетки. Дзета-потенциал — это электростатический потенциал на поверхности клетки, возникающий из-за разницы зарядов между мембраной клетки и окружающей средой. У сперматозоидов отрицательный заряд поверхности связан с наличием сиаловых кислот и других заряженных молекул в мембране. Здоровые зрелые сперматозоиды обладают более выраженным отрицательным зарядом, чем поврежденные или

незрелые клетки (Bjorndahl et al., 2022; Esteves et al., 2022). С появлением новых культуральных сред и переосмыслением значения целостности мембраны мужской половой клетки с позиций фундаментальной медицины требуются новые исследования, которые бы определили группы пациентов, которым показан данный метод отбора мужских половых клеток. Необходимо выработать тактику применения данного вида селекции с учетом нового понимания значения мужской гаметы в наступлении беременности и ее успешном течении.

Степень разработанности темы

До настоящего времени не были представлены данные об эффективности данного метода отбора (дзета-потенциал), не выработана тактика применения данного вида селекции, нет исследований, проведенных на выделенной когорте мужчин и женщин с бесплодием разного генеза в программах ВРТ.

Цель исследования

Улучшение исходов программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у супружеских пар с фактором мужского бесплодия в виде легкой и средней степени нарушений сперматогенеза с помощью технологии отбора сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу при выполнении процедуры ИКСИ.

Задачи исследования

1. Оценить клинико-anamнестические данные у обследуемых супружеских пар с легкой и средней степенью нарушения сперматогенеза, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ.
2. Провести анализ эффективности применения селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу у супружеских пар с мужским фактором бесплодия в виде легкой и средней степени нарушений в программах лечения бесплодия методами ВРТ.
3. Проанализировать эффективность применения селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу у супружеских пар с изолированным фактором мужского бесплодия в виде легкой и средней степени нарушений сперматогенеза в программах лечения бесплодия методами ВРТ.

4. На основании клинических и эмбриологических показателей выявить супружеские пары с большей эффективностью лечения бесплодия методами ВРТ с применением селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу.
5. Проанализировать молекулярно-биологические особенности мужских половых клеток, отобранных по мембранному дзета-потенциалу, в программах лечения бесплодия методами ВРТ.
6. Разработать алгоритм дифференцированного подхода к ведению супружеских пар с мужским фактором бесплодия в виде легкой и средней степени нарушений сперматогенеза с учетом показаний к проведению селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу.

Научная новизна

Впервые показана эффективность и определена значимость применения селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу в группе супружеских пар с ранними репродуктивными потерями в анамнезе и легкой и средней степенью нарушений сперматогенеза, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ. С помощью современных молекулярно-биологических методов обоснован клинический эффект снижения ранних репродуктивных потерь. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии исследована ультраструктура мужских половых клеток, отобранных по дзета-потенциалу, оценена зрелость хроматина сперматозоидов. Селекция сперматозоидов по дзета-потенциалу позволяет отобрать субпопуляцию мужских гамет с высоким отрицательным мембранным потенциалом, обладающих более зрелым хроматином и нормальной морфологией.

Теоретическая и практическая значимость

Показано, что данная технология отбора мужских гамет позволяет индивидуализировать процесс лечения пациентов с бесплодием. Селекция гамет по мембранному дзета-потенциалу позволяет улучшить эмбриологические показатели программы экстракорпорального оплодотворения, увеличить частоту формирования бластоцист хорошего и отличного качества у пациентов с мужским фактором бесплодия, что приводит к снижению частоты

неудачных попыток ВРТ, частоты неразвивающихся беременностей и расширяет возможности эмбриолога при отборе лучших сперматозоидов для оплодотворения при проведении ВРТ, основываясь не только на их морфологических признаках.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. При изолированном факторе мужского бесплодия применение технологии отбора сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу способствует повышению частоты наступления беременности с 36,6% до 47,6% за счет формирования бластоцист отличного и хорошего качества, тогда как при сочетанных формах бесплодия супружеской пары в программах ЭКО/ИКСИ при легкой и средней степени патозооспермии не улучшает клинические и эмбриологические результаты лечения.
2. Селекция сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу позволяет статистически значимо увеличить число бластоцист отличного и хорошего качества при оплодотворении методом ИКСИ у супружеских пар с ранними репродуктивными потерями беременности в анамнезе и патозооспермией средней и легкой степени выраженности (Me (Q1; Q3): с 2 (1;3) до 3 (2;4), $p < 0,001$).
3. У супружеских пар с легкой и средней степенью выраженности патозооспермии в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий использование селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу позволяет статистически значимо снизить ранние репродуктивные потери с 33,3% до 4,5% ($p = 0,03$; ОР 0,13; 95% ДИ 0,01; 1,00).
4. Селекция сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу в программах ЭКО/ИКСИ позволяет отобрать для оплодотворения мужские половые клетки с более зрелым хроматином, что объясняет достоверное снижение ранних репродуктивных потерь беременности. Доля сперматозоидов с незрелым хроматином при отборе по дзета-потенциалу снижается с 24,43% в нативном эякуляте до 16,3%.

Личный вклад автора

Соискатель лично принимала участие в выборе темы диссертационной работы, в постановке цели и формулировании задач. Активно участвовала в сборе

биологического материала, обследовании и лечении пациентов на всех этапах программах ВРТ — от момента обследования супружеской пары до переноса эмбриона в полость матки и назначения лекарственной терапии.

Автор самостоятельно интерпретировала полученные клинические и лабораторные данные, проводил статистическую обработку первичных клинических данных, лично занималась научным обоснованием собственных результатов, соотнося их с мировыми. Осуществлял подготовку статей в научные журналы.

Соответствие диссертации паспорту научной 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 и апробация результатов работы

Достоверность полученных результатов исследования обеспечивается надлежащей методологией, использованием современных методов обследования, а также корректным применением методов статистической обработки данных. Основные положения диссертационной работы доложены на XXXIII Ежегодной международной конференции Российской ассоциации репродукции человека (Нижний Новгород, 2023); XIV Всероссийском научном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2023). Материалы диссертационной работы также обсуждены на межклинической конференции Института репродуктивной медицины (20.06.2024) и апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (02.06.2025).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования включены в клинические рутинные протоколы ведения супружеских пар с бесплодием в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Также осуществляется формирование учебно-методических пособий для врачей и эмбриологов с включением данного метода

селекции мужских гамет в программах ВРТ в рамках учебного процесса в Научно-образовательном центре вспомогательных репродуктивных технологий имени Фредерика Паулсена-старшего ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, изложена на 122 страницах компьютерного текста. Работа содержит 23 таблицы и 9 рисунков. Библиографический указатель включает 160 литературных источников, из них 33 отечественных и 127 иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и методы исследования

Было проведено одноцентровое проспективное исследование случай-контроль, состоящее из трех этапов. На первом этапе были отобраны пары с патозооспермией, обратившиеся по поводу лечения бесплодия в отделение вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель — профессор, д.м.н. Калинина Е.А.). Включали женщин в возрасте от 18 до 40 лет с сохранённым овариальным резервом, а также с отсутствием противопоказаний в соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30 августа 2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». У всех мужчин присутствовали нарушения сперматогенеза, которые были оценены по шкале, предложенной Назаренко Р.В. (Таблица 1). Пациенты подписали информированное добровольное согласие. Было включено 214 пар (далее исключены 19 в связи с отменой переноса), которых стратифицировали на две когорты: 1-я группа (n=97) — оплодотворение методом ИКСИ с использованием сперматозоидов, отобранных по мембранному дзета-

потенциалу; 2-я группа (n=98) — ИКСИ с использованием градиента плотности.

Дизайн первого этапа исследования представлен на Рисунке 1.



Рисунок 1 – Дизайн первого этапа

Овариальная стимуляция проводилась по стандартному протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ). Все процедуры в рамках лечения бесплодия методами ВРТ осуществляли строго согласно клиническим рекомендациям «Женское бесплодие (2021; 2024)». Конечными точками первого этапа служили частота оплодотворения, формирования бластоцист, наступления клинической беременности и ранних репродуктивных потерь.

Таблица 1 – Классификация патозооспермии (Назаренко Р.В., 2024). а – степени патозооспермии; б – принцип построения классификации

а		б								
Степень патозооспермии / Degree of pathozoospermia		Концентрация сперматозоидов (С, млн/мл) / Sperm concentration (C, million/mL)			Подвижность сперматозоидов (PR, %) / Sperm motility (PR, %)			Морфология сперматозоидов (N, %) / Sperm morphology (N, %)		
Баллы / Score	Критерий (С) / Criteria (C)	Баллы / Score	Категория / Category	Критерий (PR) / Criteria (PR)	Баллы / Score	Категория / Category	Критерий (N) / Criteria (N)	Баллы / Score	Категория / Category	
Азооспермия / Azoospermia	–	Азооспермия / Azoospermia	–	–	–	–	–	–	–	
Тяжелая / Severe	≥ 10	$0 < C < 1$	10	d	0–9	10	d	0	10	d
Умеренно тяжелая / Moderately severe	8–9	$5 > C \geq 1$	8	c	10–19	8	c	1	5	c
Средняя / Intermediate	5–7	$10 > C \geq 5$	5	b	20–29	4	b	2	2	b
Легкая / Mild	1–4	$15 > C \geq 10$	2	a	30–39	1	a	3	1	a
Норма / Norm	0	$C \geq 15$	0	n	≥ 40	0	n	≥ 4	0	n

На втором этапе оценивали эффективность селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу у супружеских пар с ранними репродуктивными потерями в анамнезе и патозооспермией легкой и средней степени выраженности. Дизайн показан на Рисунке 2. Проспективно было набрано 120 супружеских пар. При отборе руководствовались клиническими рекомендациями «Привычный выкидыш» (2024 года пересмотра). Пациентки случайным образом были разделены на две группы: группа 2.1 (n=62) — ИКСИ с использованием сперматозоидов, отобранных по мембранному дзета-потенциалу; группа 2.2 (n=58) — ИКСИ с использованием сперматозоидов, выделенных стандартным методом с помощью градиента плотности.

Все отобранные женщины были проконсультированы врачом акушером-гинекологом с целью выявления причин ранних репродуктивных потерь. Выставлен диагноз «Идиопатический привычный выкидыш», поскольку объективных причин для невынашивания беременности у женщин обнаружено не было. Конечными точками второго этапа были выбраны показатели раннего эмбриогенеза (частота оплодотворения и бластуляции) и клинические показатели (частота наступления беременности и ранних репродуктивных потерь в расчете на перенос эмбриона в полость матки).



Рисунок 2 – Дизайн второго этапа исследования

На третьем этапе для объяснения клинических эффектов, обнаруженных на втором этапе, была проведена оценка статуса фертильности сперматозоидов, отобранных по мембранному дзета-потенциалу (Рисунок 3).

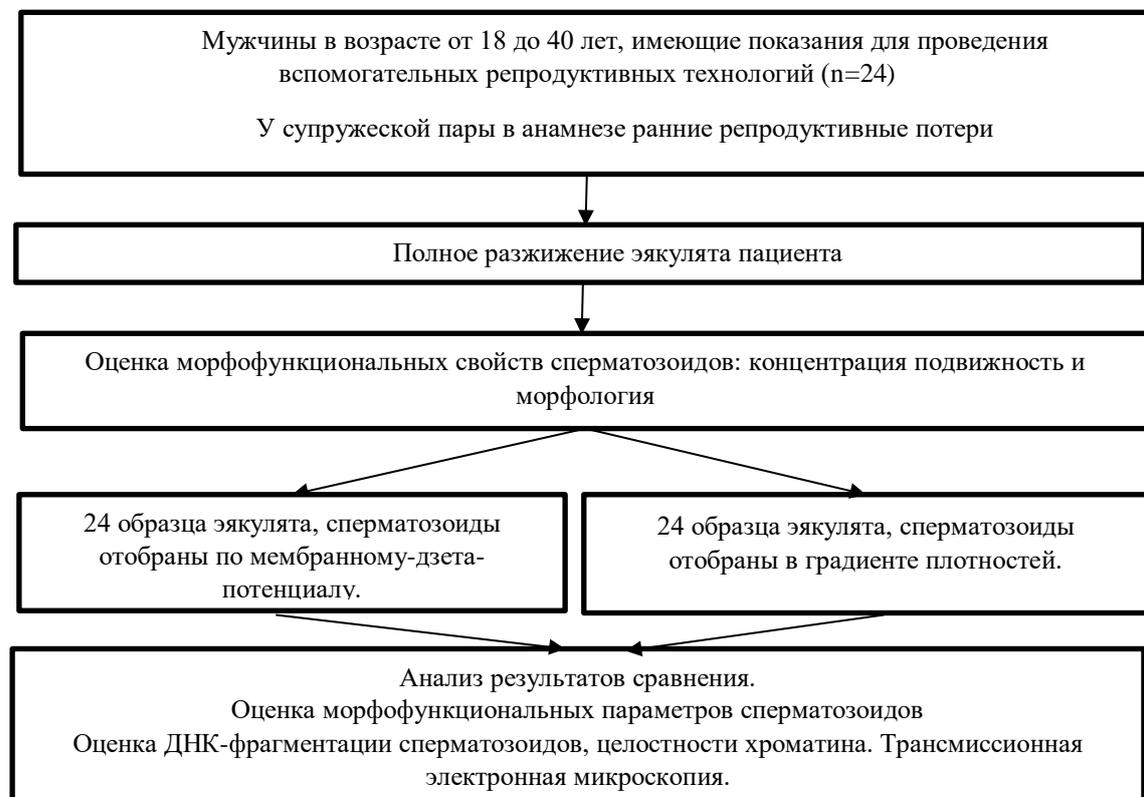


Рисунок 3 – Дизайн третьего этапа исследования

24 образца нативного эякулята делили на две группы по методу обработки. Оценивали в каждой пробе подвижность, концентрацию, морфологию, ДНК-фрагментацию и зрелость хроматина.

Для статистического анализа данных был использован программный пакет SPSS (версия 2.3, США). Сравнение двух групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполняли с помощью t-критерия Стьюдента, в противном случае – Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе были проанализированы клиничко-анамнестические данные набранных женщин (Таблица 2). По возрасту, массово-ростовым показателям, соматической и гинекологической заболеваемости группы не различались между собой.

Таблица 2 – Анамнестические данные пациентов, включенных в исследование на первом этапе

Параметр	Группа 1 дзета-потенциал n=97	Группа 2 градиент плотностей n=98	Р
Возраст**	33 (30;38)	32 (30;37)	0,68
ИМТ**	21 (20;24)	20 (20;23)	0,31
Соматические заболевания*			
Заболевания сердечно-сосудистой системы	8,4% (8/97)	5,1% (5/98)	0,37
Заболевания эндокринной системы	8,2 (8/97)	6,1 (6/98)	0,56
Гинекологические заболевания*			
ИППП	1% (1/97)	2% (2/98)	0,56
Гиперплазия эндометрия	3% (3/97)	1% (1/98)	0,30
Заболевания шейки матки	2% (2/97)	6,1% (6/98)	0,15
Хронический эндометрит в анамнезе	12,3% (12/97)	10,2% (10/98)	0,63
Миома матки	6,1% (6/97)	5,1% (5/98)	0,74
НГЭ	4,1% (4/97)	2% (2/98)	0,40
Полип эндометрия	15,4% (15/97)	12,2% (12/98)	0,51

Примечание: *абс (%), χ^2 -тест, ** Me(Q25-Q75), ИМТ – индекс массы тела

Характеристика менструальной и репродуктивной функции отобранных на первом этапе женщин представлена в Таблице 3. Статистически значимых

различий между группами обнаружено не было. Обращает на себя внимание большое число ранних репродуктивных потерь беременности ранних сроков до 12 недель гестации в анамнезе у отобранных супружеских пар. В группе 1 данный показатель составил 55,6%, в группе 2 — 48,9%, то есть у половины пациенток был выкидыш в анамнезе.

Таблица 3 – Характеристика параметров менструальной и репродуктивной функции супружеских пар, включенных в исследование

Показатель	Группа 1 дзета-потенциал n=97	Группа 2 градиент плотностей n=98	p***
Характеристика менструальной и репродуктивной функции женщин			
Длительность менструального цикла, дней*	28 (26;31)	8 (26;30)	0,65
Число беременностей, всего*	3 (2;4)	3 (2;4)	0,58
Роды в анамнезе**	11,3% (11/97)	15,3% (15/98)	0,41
Аборты**	6,1% (6/97)	4,0% (4/98)	0,50
Эктопическая беременность**	10,3% (10/97)	12,2% (12/98)	0,67
Ранние репродуктивные потери **	55,6% (54/97)	48,9% (48/98)	0,35
Параметры овариального резерва женщин			
Уровень антимюллера гормона (нг/мл)*	3,0 (1,5;4,1)	3,1 (1,8;4,2)	0,38
Уровень фолликулостимулирующего гормона (мМЕ/мл)**	6,4 (1,2)	6,8 (1,6)	0,27
Количество антральных фолликулов	10,3(2,3)	11,1(2,1)	0,89
Параметры сперматогенеза мужчин			
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	36 (22;66)	41 (38;74)	0,36
Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов, %	44 (41;68)	46 (26;60)	0,15
Доля морфологически нормальных сперматозоидов, %	2 (2;3)	2 (2;3)	0,97
ДНК-фрагментация сперматозоидов, %	10,4 (9;20)	10,1 (9;29,1)	0,45

Примечание. *Данные представлены как $Me(Q1;Q3)$; ** $M(SD)$; *** Тест Манна-Уитни

У всех мужчин были снижены параметры морфологии сперматозоидов, при этом тератозооспермия во всех случаях сочеталась с изменениями хотя бы еще одного показателя качества спермы, нарушения сперматогенеза характеризовались легкой или средней степени (Рисунок 4).

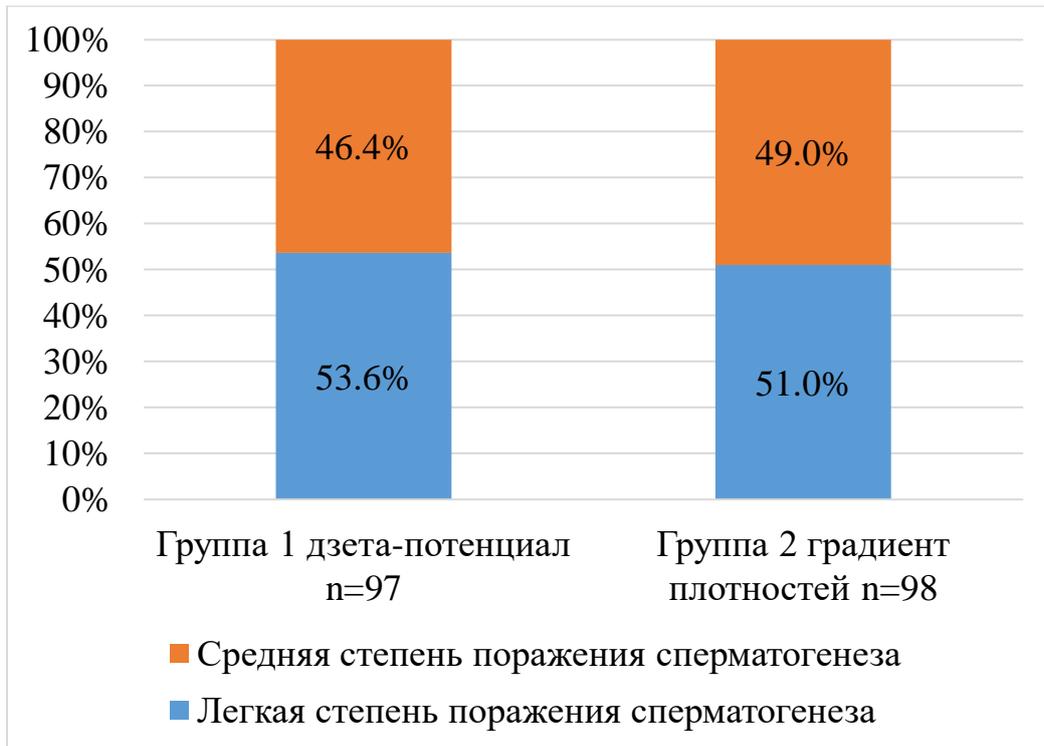


Рисунок 4 – Степень нарушения сперматогенеза у мужчин, включенных в исследование

При оценке причин бесплодия супружеских пар, включенных в исследование, обращает на себя внимание изолированный фактор мужского бесплодия, который имел место в группе 1 в 21,6% случаев, в группе 2 — в 30,6%. Сочетанные факторы бесплодия в группе 1 — 78,4%, в группе 2 — 69,4%. Таким образом, у включенных в исследование супружеских пар ни в одном случае не было изолированного фактора женского бесплодия. В Таблице 4 представлены параметры овариальной стимуляции и раннего эмбриогенеза.

Таблица 4 – Параметры овариальной стимуляции и раннего эмбриогенеза пациентов на первом этапе исследования

Параметр	Группа 1 дзета-потенциал n=97	Группа 2 градиент плотностей n=98	p***
Овариальная стимуляция			
Продолжительность стимуляции, сут*	9 (8;10)	9 (8;10)	0,98
Суммарная доза гонадотропинов, МЕ*	1396,1 (467,2)	1349,9 (402,3)	0,76
Параметры раннего эмбриогенеза			
Число зрелых ооцитов*	6 (4;10)	6 (4;10)	0,99

Частота оплодотворения**, %	76,4 (3,1)	80,1 (3,9)	0,71
Число бластоцист*	3 (2;5)	3 (2;5)	0,83
Число бластоцист отличного и хорошего качества*	3 (2;4)	3 (1;3)	0,08

*Примечание. * Данные представлены как Me (Q1;Q3). ** Данные представлены как M (SD). *** U-тест Манна-Уитни, Хи-квадрат*

Оплодотворение чаще происходило в группе со сперматозоидами, выделенными на градиенте плотностей, однако данные между собой достоверно не отличались. И в группе 1, и в группе 2 было получено равное число бластоцист отличного и хорошего качества. Таким образом, в общей когорте пациентов селекция сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу не приводит к улучшению эмбриологических показателей по сравнению с отбором сперматозоидов в градиенте плотностей.

Исходы программ ВРТ с применением различных методов отбора сперматозоидов представлены в таблице 5. Частота наступления клинической беременности в группе 1 с отбором по дзета-потенциалу составила 34,0%, в группе 2 — 35,7%, частота родов в группе 1 — 93,9% в расчете на наступление беременности, в группе 2 — 80,0%. Видно, что на клинические исходы в общей когорте пациентов селекция сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу влияния не оказывала.

Таблица 5 – Клинические показатели программ ВРТ (имплантация и роды) в анализируемых группах

Параметр*	Группа 1 дзета- потенциал n=97	Группа 2 градиент плотностей n=98	p***	ОР (95% ДИ)
Частота имплантации и наступления клинической беременности в расчете на перенос эмбриона, %	34,0% 33/97	35,7% 35/98	0,19	0,98 (95% ДИ: 0,6–1,4)
Ранние репродуктивные потери (в расчете на наступление беременности), %	6,0% 2/33	20,0% 7/35	0,76	0,39 (95% ДИ: 0,08–1,7)
Частота родов (в расчете на наступление беременности), %	93,9% 31/33	80,0% 28/35	0,09	1,17 (95% ДИ: 0,97–1,4)

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

Обратило на себя внимание снижение частоты ранних репродуктивных потерь в группе 1, которая составила 6,0%, что в 3,3 раза ниже по сравнению с группой 2, где эякулят обрабатывали в градиенте плотностей. Именно поэтому из набранных в исследование женщин были отобраны те, у которых причиной ненаступления беременности был исключительно фактор мужского бесплодия: 21 женщина из группы 1 (дзета-потенциал), в группе сравнения (градиент плотностей) — 30 и была проведена повторная оценка их клиничко-анамнестических данных, сравнение эмбриологических параметров и исходов лечения при применении селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу. Как видно из представленных в Таблице 6 данных, женщины в отобранных супружеских парах были практически здоровы и между группами не различались.

Все мужчины имели нарушения сперматогенеза легкой и средней степени тяжести. Эмбриологические параметры цикла лечения указаны в Таблице 7.

Таблица 6 – Клиничко-анамнестические характеристики супружеских пар с изолированным фактором мужского бесплодия

Параметр	Группа 1 дзета-потенциал n=21		Группа 2 градиент плотностей n=30	p
Антропометрические характеристики пациентов*				
Возраст женщины, лет*	30 (29–31)		30 (29–31)	>0,05
ИМТ, кг/м ² *	21,0 (20–22,5)		21,0 (20–25)	>0,05
Оценка менструальной функции женщин*				
Возраст менархе, лет	13 (13–14)		13 (13–14)	>0,05
Длительность менструального цикла, сутки	28 (27–28)		28 (27–28,5)	>0,05
Гормональный профиль женщины**				
ФСГ, МЕ/л	4,1 (2,3)		4,7 (2,1)	>0,05
АМГ, нг/мл	3,1 (0,1)		3,0 (0,9)	>0,05
Соматические заболевания женщин в анамнезе***				
Заболевания сердечно-сосудистой системы, %	4,7% (1/21)		3,3% (1/30)	>0,05
Заболевания мочевыделительной системы, %	4,7% (1/21)		3,3% (1/30)	>0,05
История бесплодного брака				
Число попыток ВРТ в анамнезе*	1 (0,5–1)		1 (0,5–1)	>0,05
Длительность бесплодия, лет*	1 (1,2–2)		1 (1–2)	>0,05
Преобладание типа бесплодия, %***	Первичное 47,6% (10/21)	Вторичное 52,4% (11/21)	Первичное 46,6% (14/30)	Вторичное 53,4% (16/30)

* *Примечание:* * $Me (Q_{25}-Q_{75})$; ** $M(SD)$ *** данные представлены в %

Таблица 7 – Эмбриологические показатели программ лечения бесплодия при изолированном факторе мужского бесплодия

Параметр	Группа 1 дзета- потенциал n=21	Группа 2 градиент плотностей n=30	p***
Число зрелых ооцитов*	7 (6;16)	8 (6;19)	0,89
Частота оплодотворения**, %	86,9 (2,1)	89,4 (4,1)	0,52
Число бластоцист отличного и хорошего качества*	3 (2;6)	1 (1;3)	0,04

Примечание. * Данные представлены как $Me (Q_1; Q_3)$. ** Данные представлены как $M (SD)$. *** U -тест Манна-Уитни, χ^2 -квадрат

Клинические исходы представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Клинические показатели программ ВРТ у пар с изолированным фактором мужского бесплодия

Параметр*	Группа 1 дзета- потенциал n=21	Группа 2 градиент плотностей n=30	p*	ОР (95% ДИ)
Частота имплантации и наступления клинической беременности в расчете на перенос эмбриона, %	47,6% 10/21	36,6% 11/30	0,62	1,29 (95% ДИ: 0,6–2,4)
Ранние репродуктивные потери (в расчете на наступление беременности), %	10,0% 1/10	36,3% 4/11	0,36	0,27 (95% ДИ: 0,03–2,06)
Частота родов (в расчете на наступление беременности), %	90,0% 9/10	63,6% 7/11	0,36	1,44 (95% ДИ: 0,8–2,3)

Примечание. *Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, χ^2 -квадрат

Как видно из анализа данных, селекция сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу при изолированном факторе мужского бесплодия в виде легкой и средней степени нарушений сперматогенеза (женщины потенциально фертильны) позволяет достоверно увеличить число бластоцист отличного и хорошего качества ($p < 0,05$), повысить частоту наступления беременности с 36,6% до 47,6% и снизить число ранних репродуктивных потерь с 36,3% до 10,0%.

При анализе данных на первом этапе диссертационного исследования была отмечена положительная тенденция к снижению ранних репродуктивных потерь беременности при использовании в программах ВРТ селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу. Именно поэтому проспективно были набраны супружеские пары, которых стратифицировали по способу селекции мужских половых клеток. У всех супружеских пар было не менее 2 потерь беременности в сроке до 12 недель гестации в анамнезе и патозоспермия легкой и средней степени выраженности у супруга.

Клинико-anamнестические данные женщин, включенных в исследование на втором этапе работы представлены в Таблице 9. По антропометрическим характеристикам, частоте встречаемости соматических и гинекологических заболеваний, пациентки не различались между собой.

Таблица 9 – Клинико-anamнестические данные женщин, включенных в исследование на втором этапе

Параметр	Группа 2.1 дзета-потенциал (n=62)	Группа 2.2. градиент плотностей (n=58)	p**
Антропометрические характеристики			
Возраст женщины (годы)*	32 (30;35)	33 (31;35)	0,39
Возраст мужчины (годы)*	36,5 (34;39)	35 (33;38)	0,27
Индекс массы тела женщины (кг/м ²)*	22 (21;25)	22,5 (20;25)	0,86
Продолжительность бесплодия в текущем браке (годы)*	4 (2,5;6)	4 (3;6)	0,50
Соматические заболевания			
Болезни бронхо-легочной системы	4,8% (3/62)	13,7% (8/58)	0,09
Болезни сердечно-сосудистой системы	1,6% (1/62)	3,4% (2/58)	0,52
Заболевания эндокринной системы, компенсированные	16,1% (10/62)	18,9% (11/58)	0,68
Наследственные тромбофилии	3,2% (2/62)	10,3% (6/58)	0,11

Примечание. * Данные представлены как Me (Q1;Q3). ** Данные представлены в абсолютных величинах и %. ** U-критерий Манна-Уитни, χ^2 тест

Показатели репродуктивной функции супружеских пар с повторными потерями беременности, по числу ранних потерь и родов не различались (Таблица 10).

Таблица 10 – Показатели репродуктивной функции супружеских пар на втором этапе

Показатель*	Группа 2.1 дзета-потенциал n=62	Группа 2.2. градиент плотности n=58	p**
Параметры репродуктивной функции женщин			
Возраст менархе, лет	13 (12;14)	13 (12,5;14)	0,35
Длительность менструального цикла, дней	28 (26;30)	28 (27;30)	0,65
Возраст начала половой жизни, лет	17 (16;20)	16,9 (15;19)	0,89
Число беременностей, всего	3 (2;4)	3 (2;4)	0,88
Роды в анамнезе	17,7% (11/62)	25,8% (15/58)	0,28
Аборты (по медицинским показаниям)	11,2% (7/62)	17,2% (10/58)	0,35
Эктопическая беременность	19,3% (12/62)	25,8% (15/58)	0,48
Заболевания шейки матки	6,4% (4/62)	6,8% (4/58)	0,92
Заболевания молочной железы	22,5% (14/62)	32,7% (19/58)	0,21
Наружный генитальный эндометриоз I и II стадий распространения	8,0% (5/62)	1,7% (1/58)	0,11
Миома матки	11,2% (7/62)	17,7% (11/58)	0,24
Параметры сперматогенеза			
Концентрация сперматозоидов (млн/мл)	41 (32;66)	53 (38;76)	0,43
Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов	57 (51;63)	58 (46;66)	0,72
Доля морфологически нормальных сперматозоидов	2 (2;3)	2 (2;3)	0,97
ДНК-фрагментация сперматозоидов, %	16,4 (15,8; 31,0)	19,1 (14,4;29,9)	0,84

Примечание. * Данные представлены как Me (Q1;Q3) или в абсолютных значениях с %. ** U-тест Манна-Уитни, χ^2 -тест

У всех супружеских пар присутствовал фактор мужского бесплодия, который выражался в снижении доли морфологически нормальных сперматозоидов. По показателям спермограммы группы не различались. ДНК-фрагментация находилась в зоне повышенных значений, но между группами отличий найдено не было. Пациенты имели легкую или среднюю степень нарушений сперматогенеза (Рисунок 5); не было оснований предполагать, что на результаты сравнения могли повлиять различия по выраженности мужского фактора бесплодия.

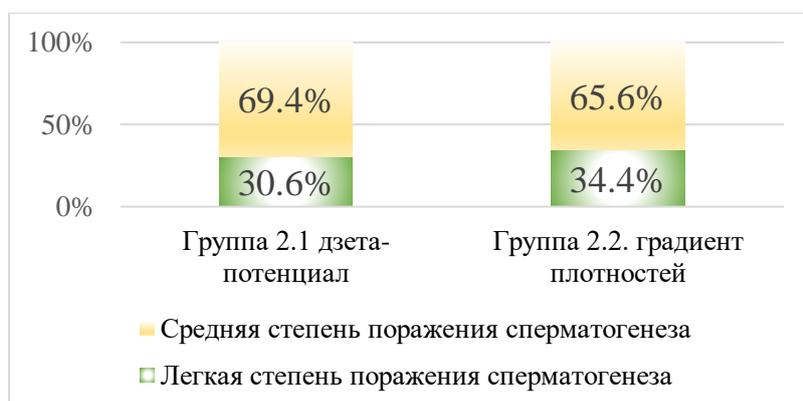


Рисунок 5 – Степень нарушений сперматогенеза у набранных в исследование пациентов на втором этапе

Параметры раннего эмбриогенеза в двух группах представлены в Таблице 11. По количеству ооцитов, частоте получения зрелых ооцитов, частоте оплодотворения и формирования бластоцист обе группы были сопоставимы между собой. Наблюдалось значимое улучшение эмбриологического этапа программ ВРТ в группе мембранного дзета-потенциала. Медиана числа бластоцист хорошего и отличного качества в основной группе составила 3, в группе сравнения — 2.

Таблица 11 – Характеристика показателей раннего эмбриогенеза у супружеских пар, включенных в исследование

Показатель	Группа 2.1 дзета-потенциал n=62)	Группа 2.2. градиент плотностей n=58)	p***
Число зрелых ооцитов*	6 (4;9)	6 (4;10)	0,69
Частота оплодотворения**, %	79,3 (3,1)	81,5 (2,9)	0,79
Число бластоцист*	4 (2;5)	3 (2;5)	0,13
Число бластоцист отличного и хорошего качества*	3 (2;4)	2 (1;3)	<0,001

Примечание. * Данные представлены как Me (Q1;Q3). ** Данные представлены как M (SD). *** U-тест Манна-Уитни

При оценке эффективности селекции сперматозоидов по дзета-потенциалу не было отмечено случаев тотальной остановки раннего эмбриогенеза. В обеих группах частота наступления клинической беременности не достигла статистически значимых отличий. Однако частота ранних репродуктивных потерь

при расчете на фактически наступившие беременности достоверно снизилась с 33,3 % до 4,5 % (Рисунок 6),

Как видно из представленных на Рисунке 6 данных, селекция сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу позволяет снизить ранние репродуктивные потери в программах ВРТ (данные статистически достоверны).

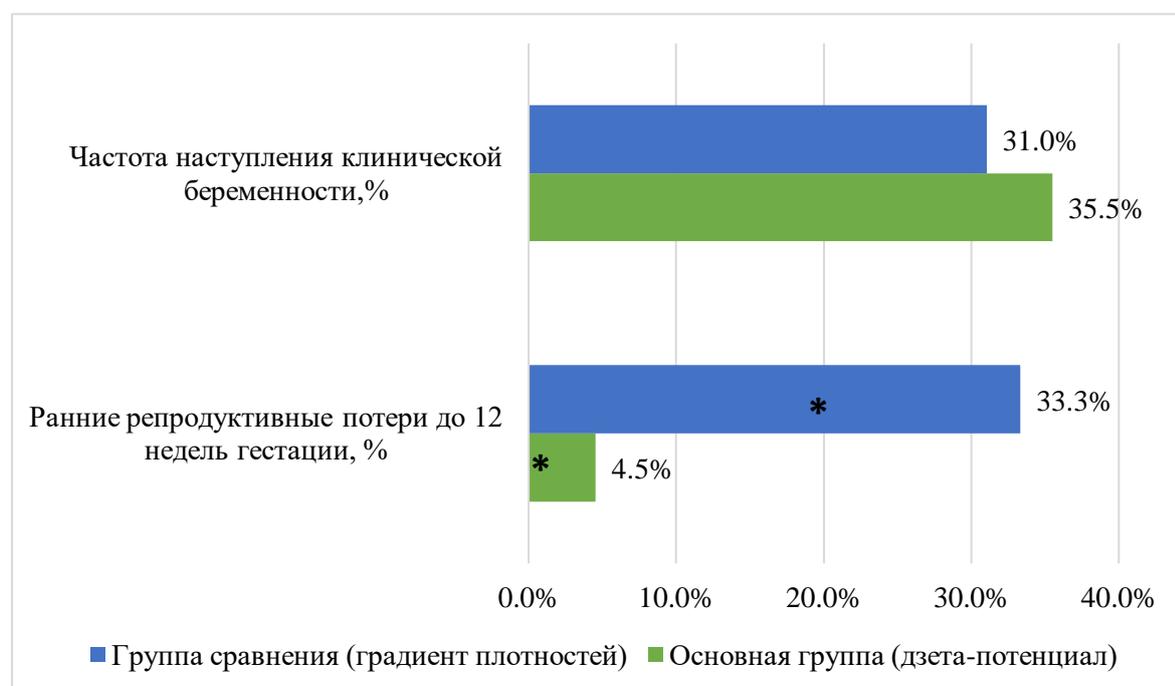


Рисунок 6 - Клиническая эффективность применения селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу.

Для научного обоснования клинических эффектов по снижению ранних репродуктивных потерь при использовании селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу был выполнен третий этап работы. Было отобрано 24 образца эякулята, показатели которого показаны в Таблице 12.

Таблица 12 – Характеристика сперматогенеза мужчин, включенных в исследование

Параметр*	Мужчины, включенные в исследование (n=24)
Концентрация сперматозоидов (млн/мл)	44 (32;69)
Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов, %	58 (52;61)
Доля морфологически нормальных сперматозоидов, %	2 (2;3)

Примечание. *Данные представлены как медиана с интерквартильным размахом.

В качестве параметров фертильности оценивали два показателя: ДНК-фрагментацию сперматозоидов и зрелость хроматина половых клеток (Рисунок 7). Результаты сравнения выраженности ДНК-фрагментации сперматозоидов в группах не выявили достоверной разницы при различных методах селекции. Таким образом мембранный дзета-потенциал не имеет преимуществ в селекции сперматозоидов с целостной ДНК. Однако данный вывод следует проверять на большей выборке.

Результаты оценки зрелости хроматина сперматозоидов представлены на Рисунке 7. Фракция выделенных по мембранному дзета-потенциалу сперматозоидов имела статистически значимо меньший процент мужских половых клеток с незрелым хроматином (16,3% против 19,38% выделенной в градиенте плотностей гамет, $*p<0,01$).

Все отобранные в исследование мужчины имели повышенное содержание сперматозоидов с незрелым хроматином в нативном эякуляте. Именно этим может объясняться бесплодие, связанное с неразвивающимися беременностями у партнерш данных мужчин.

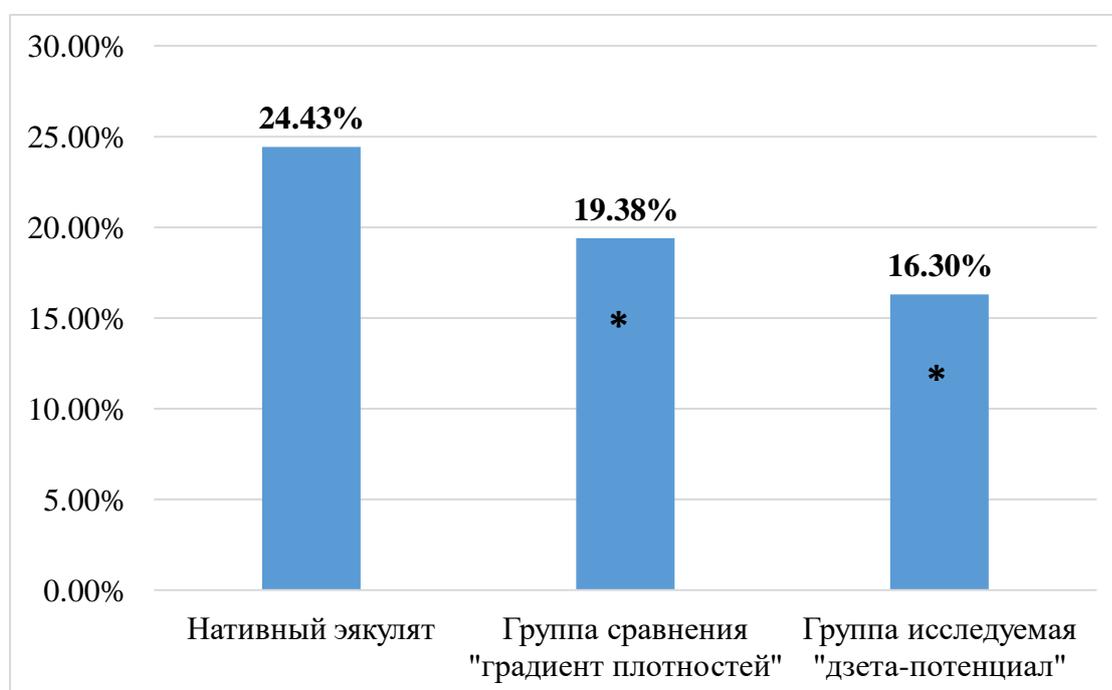


Рисунок 7 – Доля сперматозоидов с незрелым хроматином при разных методах обработки, $*p<0,01$

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии были получены микрофотографии головок сперматозоидов с нормальным и незрелым хроматином, которые представлены на Рисунках 8 и 9.

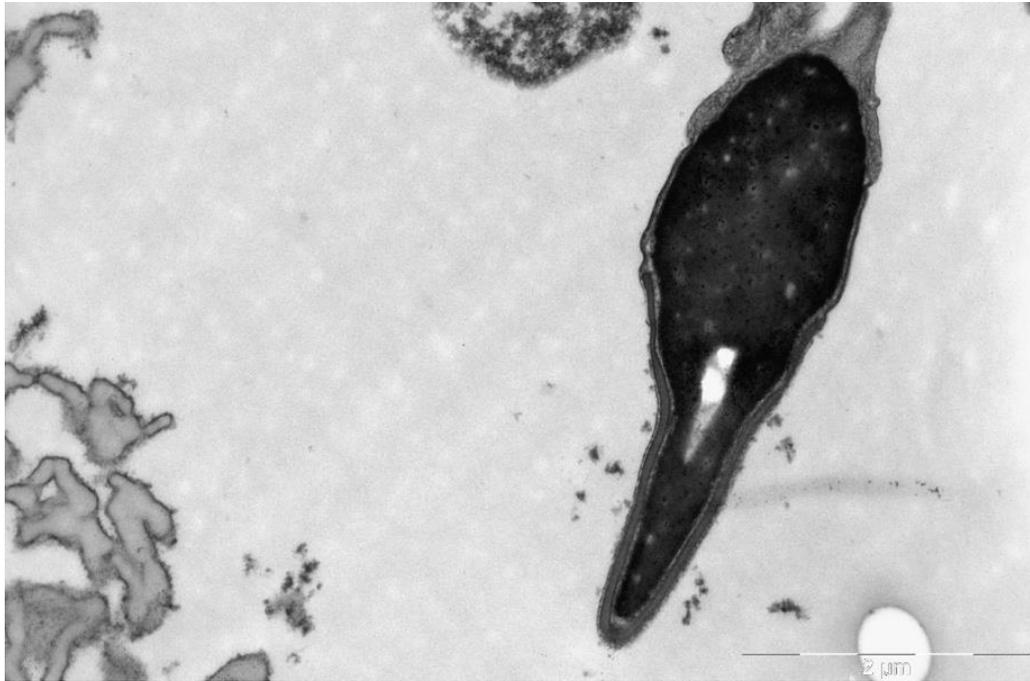


Рисунок 8 – Головка сперматозоида человека с нормальным «зрелым» хроматином. Конденсированный хроматин имеет гомогенную плотную консистенцию.

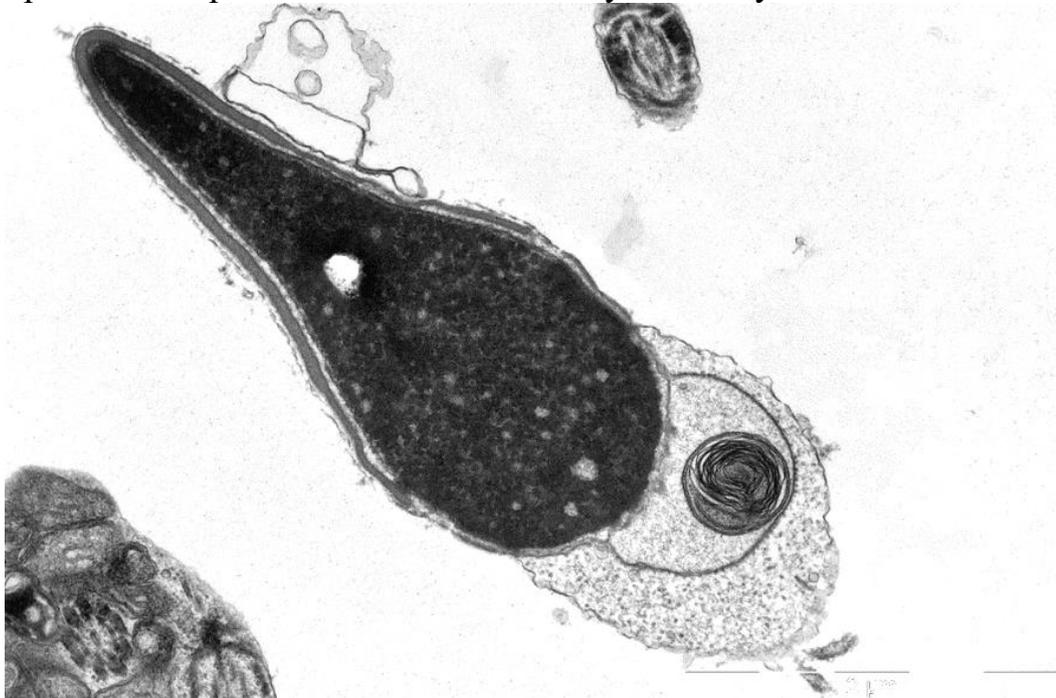


Рисунок 9 – Головка сперматозоида человека с незрелым хроматином. В ядре выявляются фибриллы толщиной 40 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы

1. При изолированном факторе мужского бесплодия в виде нарушений сперматогенеза легкой и средней степени выраженности в программах лечения бесплодия методами ВРТ применение технологии селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу способствует повышению кумулятивной частоты наступления беременности в расчете на один цикл овариальной стимуляции за счет формирования большего числа бластоцист отличного и хорошего качества.
2. Применение селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у супружеских пар с легкой и средней степенью выраженности нарушений сперматогенеза позволяет увеличить число получаемых на эмбриологическом этапе бластоцист отличного и хорошего качества (Me: 3 [2;4] в основной группе против 2 [1;3] в группе сравнения, $p < 0,001$).
3. Использование селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу в программах ВРТ при легкой и средней степени нарушений сперматогенеза статистически значимо не увеличивает частоту оплодотворения и частоту наступления клинической беременности.
4. Отмечено снижение ранних репродуктивных потерь беременности до 12 недель гестации в программах лечения бесплодия с 33,3% до 4,5% из расчета на наступившие беременности при применении метода отбора сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу у супружеских пар с легкой и средней степенью нарушений сперматогенеза.
5. Метод селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу по сравнению с центрифугированием в градиенте плотностей в программах лечения бесплодия позволяет выделить фракцию мужских половых клеток с более зрелым хроматином. Доля гамет с незрелым хроматином в основной группе 16,3%, в группе сравнения — 19,38 ($p < 0,05$).

Практические рекомендации

1. На этапе обследования и подготовки к программе лечения бесплодия методами ВРТ следует акцентировать внимание на ранних репродуктивных потерях беременности до 12 недель гестации и выяснении причин таких состояний (особенно при легкой и средней степенях нарушений сперматогенеза) для того, чтобы предложить супружеской паре наиболее эффективные технологии селекции мужских половых клеток на эмбриологическом этапе.
2. Для повышения частоты формирования blastocyst хорошего и отличного качества в программах ВРТ и, следовательно, увеличения кумулятивной частоты наступления беременности при расчете на одну овариальную стимуляцию целесообразно в программах ВРТ применять метод селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу у супружеских пар с легкой и средней степенью нарушений сперматогенеза.
3. Супружеским парам с 2 и более эпизодами ранних репродуктивных потерь беременности в анамнезе и легкой и средней степенью нарушений сперматогенеза у мужчин в программе ВРТ рекомендовано применять метод селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу на эмбриологическом этапе лечения бесплодия.
4. При обнаружении у мужчины повышенных значений процента сперматозоидов в эякуляте с незрелым хроматином возможно рекомендовать отбор мужских гамет по мембранному дзета-потенциалу, независимо от паритета бесплодия при оплодотворении методом ИКСИ.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В исследовании проведен анализ эффективности применения селекции сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу в группе супружеских пар с ранними репродуктивными потерями в анамнезе и легкой и средней степенью нарушений сперматогенеза, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ. Отбор сперматозоидов по мембранному дзета-потенциалу улучшает эмбриологические и клинические показатели программ ЭКО, что приводит к формированию эмбрионов более высокого качества, снижению частоты неудачных попыток ВРТ и частоты неразвивающихся беременностей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Методы улучшения программ вспомогательных репродуктивных технологий путем инновационных подходов к селекции мужских половых клеток. / **П.С. Гамидова, В.Ю. Смольникова, Н.П. Макарова, Н.Н. Лобанова** // **Акушерство и гинекология**. 2022. № 7.
2. Успешный исход экстракорпорального оплодотворения при абсолютной тератозооспермии после отбора сперматозоидов по дзета-потенциалу. Клинический случай. / **П. С. Гамидова, Н.П. Макарова Н.П., В.Ю. Смольникова, Н.Н. Лобанова** // **Акушерство и гинекология**. 2023. № 6.
3. Снижение частоты ранних репродуктивных потерь при использовании селекции сперматозоидов в программах вспомогательных репродуктивных технологий / **П. С. Гамидова, Н.П. Макарова Н.П., В.Ю. Смольникова, Н.Н. Лобанова, Е.В. Кулакова** // **Акушерство и гинекология**. 2024. № 7.
4. Особенности хроматинного статуса сперматозоидов при отборе по мембранному дзета-потенциалу в программах лечения бесплодия методами ВРТ. / **П. С. Гамидова, Н.П. Макарова Н.П., В.Ю. Смольникова, Н.Н. Лобанова, Е.Е. Брагина**//**Медицинский оппонент**. 2024. № 1. С. 27-31.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Алгоритм дифференцированного ведения супружеских пар с бесплодием и ранними репродуктивными потерями беременности в анамнезе в программах ВРТ