

На правах рукописи

РОМАНОВ

Андрей Юрьевич

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММ
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПУТЕМ
ПРИМЕНЕНИЯ НОВОЙ МЕТОДИКИ КОНТРОЛИРУЕМОЙ
МЕХАНИЧЕСКОЙ МИКРОВИБРАЦИИ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
ЭМБРИОНОВ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2021

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Долгушина Наталия Витальевна

доктор биологических наук

Макарова Наталья Петровна

Официальные оппоненты:

Коган Игорь Юрьевич – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта" Минобрнауки России, директор.

Рудакова Елена Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, отделение вспомогательных репродуктивных технологий ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр», научный консультант.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «21» декабря 2021 г. в 13:00 часов 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 «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

<https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Romanov%20AU-disser.pdf?494173568>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Цель всех программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) – повышение частоты имплантации эмбриона, наступления беременности и рождения здорового ребенка. Поскольку условия развития эмбриона в программах ВРТ отличаются от условий, в которых эмбрион развивается в организме женщины, большое внимание уделяется подбору оптимальных параметров культивирования эмбрионов для получения бластоцист отличного качества и повышения эффективности программ ВРТ при селективном переносе одного эмбриона в полость матки.

В естественных условиях оплодотворение и преимплантационное развитие эмбриона происходит в маточной трубе. В это время эмбрион находится в постоянном движении за счет перистальтических сокращений мышечной стенки маточной трубы и биения ворсинок слизистой оболочки трубы. В организме матери эмбрион находится под постоянным воздействием вибрации с частотой до 20 Гц (Е. Isachenko et al. 2010). При культивировании эмбрионов человека в программах ВРТ применение механической микровибрации может приблизить условия культивирования к естественным условиям развития эмбриона *in vivo*.

Положительные эффекты применения механической микровибрации при культивировании эмбрионов заключаются также в перемешивании культуральной среды, что позволяет увеличить поступление питательных веществ культуральной среды к развивающемуся эмбриону с одновременным удалением токсичных метаболитов и побочных продуктов жизнедеятельности, что позволяет создать оптимальное микроокружение при культивировании эмбриона человека.

Большая доля пациенток программ ВРТ в настоящее время это пациенты позднего репродуктивного возраста, страдающие ожирением, эндометриозом, а также подвергающиеся воздействию вредных факторов окружающей среды. У данных пациенток частота наступления беременности (ЧНБ) часто не превышает 5-10% (Colaco and Sakkas 2018; Keefe, Kumar, and Kalmbach 2015; Broughton and Moley 2017; Sanchez et al. 2017). Применение современных биофизических методик, направленных на улучшение качества эмбрионов, в

частности применение систем культивирования с использованием контролируемой механической микровибрации (КММВ), не только положительно влияет на способность эмбриона к формированию бластоцисты (Matsuura et al. 2010), но также позволяет повысить вероятность наступления беременности и живорождения (V. Isachenko et al. 2017; E. Isachenko et al. 2010), у пациенток, у которых не удается достичь беременности в стандартных программах ВРТ.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день применение контролируемой механической микровибрации при культивировании эмбрионов человека изучено в ограниченном числе исследований различного дизайна. Не изучен генез воздействия КММВ на эмбрионы человека. Необходимо проведение дальнейших исследований применения системы культивирования эмбрионов с микровибрацией с селективным переносом одного эмбриона в полость матки.

Цель исследования

Цель исследования – улучшение исходов лечения бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий с помощью использования системы культивирования эмбрионов с применением контролируемой механической микровибрации.

Задачи исследования

1. Выявить клиничко-лабораторные факторы, влияющие на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток, проходящих лечение бесплодия с применением и без применения контролируемой механической микровибрации при культивировании эмбрионов.
2. Сравнить развитие эмбрионов человека *in vitro* в двух системах: с применением и без применения контролируемой механической микровибрации у пациенток программ вспомогательных репродуктивных технологий, в том числе у пациенток со сниженным потенциалом развития эмбрионов (позднего репродуктивного возраста, с ожирением, с наружным генитальным эндометриозом).
3. Оценить эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток, проходящих лечение бесплодия с применением и без

применения контролируемой механической микровибрации при культивировании эмбрионов, в том числе у пациенток со сниженным потенциалом развития эмбрионов (позднего репродуктивного возраста, с ожирением, с наружным генитальным эндометриозом).

4. Изучить содержание показателей метаболического статуса эмбрионов в среде культивирования в зависимости от типа культивирования эмбрионов.

5. Разработать критерии применения систем культивирования в программах вспомогательных репродуктивных технологий с использованием контролируемой механической микровибрации в зависимости от клинико-анамнестических и лабораторных данных пациенток.

Научная новизна

Изучено влияние механической микровибрации на преимплантационное развитие эмбрионов человека *in vitro* и эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий. Изучено влияние механической микровибрации на показатели метаболического статуса эмбриона человека. Разработаны критерии применения систем культивирования с использованием механической микровибрации.

Практическая значимость

Определены показания к применению контролируемой механической микровибрации при культивировании эмбрионов человека. Внедрение в клиническую практику системы культивирования эмбрионов человека с использованием механической микровибрации позволило улучшить исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Положения, выносимые на защиту

1. Частота наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий зависит от: возраста пациентки и ее партнера (снижается в 2,0 и 1,8 раз соответственно у пациентов старше 35,5 и 39,5 лет); наличия гинекологических и эндокринных заболеваний (понижается в 1,2 раза у пациенток с олигоменореей, в 1,4 раза – у пациенток с интрамуральной или субсерозной миомой матки малых размеров (<4 см) и гипотиреозом); характеристик полученных эмбрионов (снижается на 27,5% при меньшем числе полученных blastocyst класса 4AA и 4AB по классификации Гарднера); и не

зависит от метода оплодотворения (ЭКО или ИКСИ), применения вспомогательного хетчинга и числа переносимых в полость матки эмбрионов.

2. Контролируемая механическая микровибрация оказывает стратифицированное влияние на развитие эмбрионов – позитивное влияние на эмбрионы отличного и хорошего качества (число эмбрионов класса 6ВВ, 5АА, 5ВВ, 4АА, 4АВ, 4ВА, 4ВВ, 3АА, 3АВ, 3ВА, 3ВВ – повышается на 2,1%), и отрицательное – на эмбрионы плохого качества (число эмбрионов класса 1СС, 1СА, 1В, 1АА, 2СС, 2ВС, 2ВВ, 2АВ, 2ВА, 2АА, 3СС, 3СВ, 4СС, 4ВС, 4АС – уменьшается на 0,6%) и эмбрионы, не способные сформировать бластоцисту, а также способствует повышению вероятности получения эмбрионов, годных для криоконсервации, в 1,53 раза.

3. Контролируемая механическая микровибрация позитивно влияет на исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий, повышая частоту наступления беременности в общей группе пациенток на 5,4%, однако у пациенток со сниженным потенциалом развития эмбрионов (позднего репродуктивного возраста, с ожирением и избыточной массой тела, с наружным генитальным эндометриозом) оказывает нейтральный или негативный эффект, что связано с ее отрицательным влиянием на эмбрионы плохого качества.

4. Контролируемая механическая микровибрация оказывает влияние на развитие и имплантационный потенциал эмбрионов путем потенцирования их метаболизма, о чем свидетельствует изменение содержания метаболитов в культуральной среде эмбрионов 5-х суток развития (повышение прогестерона, лизил-гамма-глутамата, ацетилхолина, простагландина, 2,3-Динор-Тромбоксана В₂ и 20-Гидрокси-Простагландина Е₂, и понижение глутамина и олеамида).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, разработке дизайна, систематизации данных литературы по теме исследования. Автор лично принимал участие в проведении программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий, осуществлял забор и подготовку биологического материала, участвовал в выполнении лабораторной части исследования. Диссертантом проведен анализ

медицинской документации, статистическая обработка данных и систематизация полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в практику отделений лечения бесплодия, а также используются при обучении клинических ординаторов и аспирантов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них – 3 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Апробация работы

Работа обсуждена на межклинической конференции 18.03.2021 и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (07.04.2021 г, протокол № 2).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 132 страницах и состоит из введения, четырех глав, выводов и практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 41 таблицей и 6 рисунками. Список литературы включает 218 источников, из них 17 работ отечественных и 201 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН Г.Т. Сухих). Набор пациентов осуществлялся в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия института репродуктивной медицины (заведующий – д.м.н., профессор Е.А. Калинина). Лабораторные исследования проводились в лаборатории молекулярной патофизиологии (заведующий – к.х.н. М.Ю. Бобров).

Для решения поставленных задач было проведено проспективное (для клинических и лабораторных исследований) и ретроспективное (для определения факторов риска) исследование. С сентября 2018 года по август 2020 года в исследование были включены 923 пары, обратившиеся для лечения бесплодия методами ВРТ. На проведение исследования было получено разрешение комиссии по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

В соответствии с целью исследования были выделены следующие группы сравнения:

- группа 1 – группа микровибрации (166 супружеских пар, эмбрионы которых культивировали в условиях КММВ);
- группа 2 – группа сравнения (757 супружеских пар, эмбрионы которых культивировали в стандартных условиях).

Также пациентки были стратифицированы на группы:

- пациентки раннего и позднего репродуктивного возраста (19-36 лет и 37+ лет);
- пациентки с нормальным индексом массы тела (ИМТ) и пациентки с ожирением или избыточной массой тела (ИМТ <25 кг/м² и ИМТ ≥ 25 кг/м²);
- пациентки с отсутствием или наличием наружного генитального эндометриоза и/или аденомиоза (перенесшие операции по поводу наружного генитального эндометриоза и/или аденомиоза в анамнезе).

В зависимости от наступления беременности пациенты были также стратифицированы на группы: А – беременность наступила, и Б – беременность не наступила.

Критерии включения в исследование: подписанное информированное согласие на участие в исследовании; нормальный кариотип обоих супругов; возраст женщины 18-45 лет включительно; получение не менее 2-х ооцитов в день трансвагинальной пункции фолликулов.

Критерии невключения в исследование: противопоказания к лечению бесплодия методами ВРТ согласно приложению №2 Приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации №107н от 30 августа 2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»; синдром поликистозных яичников; преждевременная недостаточность яичников; аномалии строения внутренних половых органов; использование донорских ооцитов; суррогатное материнство; со стороны партнера пациентки – выраженные формы патоспермии, получение сперматозоидов хирургическим путем; со стороны пациентки – маточный фактор бесплодия, снижение овариального резерва.

Критерии исключения из исследования: отсутствия возможности продолжить проведение всех мероприятий, запланированных в исследовании со стороны пациента; желание пациентки добровольно прекратить участие в исследовании.

Полное клинико-лабораторное обследование проведено в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации №107н от 30 августа 2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Овариальную стимуляцию проводили по протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона препаратами рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона или человеческого менопаузального гонадотропина. Триггер овуляции вводили при достижении лидирующими фолликулами диаметра 19 мм. В качестве триггера овуляции использовали ХГЧ или комбинацию ХГЧ с агонистом гонадотропин-рилизинг гормона. Трансвагинальную пункцию фолликулов под ультразвуковым контролем

проводили через 36 часов после введения триггера овуляции. Просмотр аспирированной фолликулярной жидкости осуществлял эмбриолог под контролем стереомикроскопа. После денудирования ооцитов оценивали их степень зрелости. Все зрелые ооциты оплодотворяли методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) или методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ). Затем ооциты переносили в культуральную среду для дальнейшего культивирования.

При культивировании эмбрионов в условиях механической микровибрации инкубатор помещали на платформу ArisTT180-s в режиме активной вибрации с частотой 40 Гц в течение 30 секунд с интервалом покоя 30 минут. Культивирование в условиях микровибрации осуществляли на протяжении всего срока от получения ооцитов до проведения переноса (или криоконсервации) эмбриона, после чего отбирали среду культивирования и криоконсервировали при -80°C . Перенос эмбрионов (ПЭ) в полость матки осуществляли на 5-е сутки культивирования. В полость матки переносили один или два эмбриона лучшего морфологического качества.

Оценку реальной частоты и амплитуды микровибрации проводили при помощи встроенного осциллографа. Используемую культуральную среду 5-дневных эмбрионов подвергали исследованию методом метаболомного профилирования.

Поддержку посттрансферного периода индуцированного цикла проводили путем вагинального введения микронизированного прогестерона в дозировке 600 мг в день.

Оценивали следующие исходы программ ВРТ: частота биохимической беременности (на основании определения сывороточной концентрации β -субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) при уровне β -ХГЧ более 20 МЕ/л); частота клинической беременности (на основании визуализации плодного яйца при УЗИ через 21 день после ПЭ); частота потери беременности до 12 недель гестации; частота живорождения.

Для статистической обработки данных использовали электронные таблицы «Microsoft Excel» и пакет программ «GraphPad Prism 6» (GraphPad Software, USA). Для построения графиков использовали электронные таблицы

«Microsoft Excel» и язык статистического программирования «R» в оболочке «RStudio 1.1.463» (USA).

Результаты собственных исследований и их обсуждение

На первом этапе работы были проанализированы клиничко-лабораторные данные пациентов, влияющие на ЧНБ. ЧНБ составила 29,3%: группа А – пациентки с наступившей беременностью (n=270), группа Б – пациентки, у которых беременность не наступила (n=653).

Возраст обоих партнеров был значимо ниже в парах с наступившей беременностью. Пороговый возраст женщин составил 35,5 лет, отношение шансов (ОШ) наступления беременности в зависимости от возраста составило 2,0 (95% ДИ=1,1-3,7). Пороговый возраст мужчин составил 39,5 лет, ОШ наступления беременности в зависимости от возраста составило 1,8 (95% ДИ=1,0-3,4). Средний ИМТ пациенток не различался в группах сравнения. У пациенток группы Б чаще отмечалась олигоменорея (ОШ=1,2; 95% ДИ=1,1-1,4), миома матки малых размеров (ОШ=1,43; 95% ДИ=1,06; 1,93) и гипотиреоз (ОШ=1,47; 95% ДИ=1,08; 2,03) (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
Возраст женщин, лет	33 (30-36)	36 (31-40)	<0,001**
Возраст мужчин, лет	34 (31-38)	36 (32-42)	<0,001**
ИМТ, кг/м ²	23,5±4,5	23,3±4,1	0,757*
Олигоменорея	15 (5,6%)	39 (12,9%)	<0,001**
Миома матки	45 (16,7%)	156 (23,9%)	0,009***
Гипотиреоз	80 (29,6%)	250 (38,3%)	0,007***

* t-test; ** тест Манна-Уитни, *** точный тест Фишера

При анализе эмбриологических параметров не было выявлено различий в параметрах спермограммы, методе оплодотворения (ЭКО или ИКСИ), проведении вспомогательного хетчинга и числе переносимых эмбрионов в полость матки (один или два) в группах А и Б. При этом группы отличались по числу полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), зрелых ооцитов (МП), зигот и полученных бластоцист, в том числе бластоцист «отличного» качества, число которых было значимо выше в группе А (Таблица 2).

Таблица 2. Особенности эмбриологического этапа программы ВРТ

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
Число полученных ОКК	8 (4 – 11)	5 (3 – 10)	<0,001**
Число ооцитов МП-стадии	6 (4 – 9)	4 (2 – 7)	<0,001**
Число зигот	5 (3 – 8)	3 (2 – 6)	<0,001**
Частота оплодотворения	88,5% ± 15,0%	83,9% ± 22,7%	0,002*
Число бластоцист	2 (1 – 4)	1 (0 – 2)	<0,001**
в т.ч. «отличного» качества	1 (0 – 2)	0 (0 – 1)	<0,001**
Число перенесенных эмбрионов:			
- один	227 (84,1%)	405 (62,0%)	0,419***
- два	43 (15,9%)	72 (11,0%)	

* t-test; ** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера

Качество перенесенного эмбриона во многом определяет вероятность наступления беременности. При оценке по шкале Гарднера важное значение оказывала как степень зрелости бластоцисты, так и качество внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТФЭ). Было выявлено, что в группе А на 25,0% чаще были перенесены эмбрионы класса 4АА ($p < 0,001$) и на 2,5% чаще – эмбрионы класса 4АВ ($p = 0,048$), т.е. суммарно – на 27,5% чаще.

На втором этапе нами был проведен анализ влияния КММВ на частоту оплодотворения ооцитов и развитие эмбрионов первых пяти суток культивирования. При анализе клиничко-анамнестических характеристик пациенток групп 1 и 2 было выявлено, что пациентки группы микровибрации не отличались от пациенток группы сравнения по возрасту и антропометрическим характеристикам. Не было выявлено особенностей менструального цикла, репродуктивного анамнеза, гормонального профиля пациенток и особенностей протокола овариальной стимуляции.

В группах 1 и 2 было получено одинаковое число ОКК и ооцитов МП-стадии. Средняя частота оплодотворения составила $86,1 \pm 18,9\%$ в группе 1 и $86,7 \pm 18,7\%$ в группе 2 ($p = 0,715$). Как результат, было получено равное число зигот в обеих группах пациентов. Однако при сравнении числа полученных бластоцист было выявлено, что их число было значимо выше у пациенток группы микровибрации (Таблица 3).

Таблица 3. Особенности эмбриологического этапа программы ВРТ

Параметр	Группа 1 (n = 166)	Группа 2 (n = 757)	p-value
Число полученных ОКК	6 (4 – 10)	6 (3 – 9)	0,452**
Число ооцитов МП-стадии	5 (3 – 7)	5 (2 – 8)	0,456**
Число зигот	5 (3 – 8,5)	4 (2 – 6)	0,252**
Частота оплодотворения	86,1%±18,9%	86,7%±18,7%	0,715*
Число бластоцист	2 (1 – 4)	2 (1 – 3)	0,044**
в т.ч. «отличного» качества	1 (1 – 2)	1 (1 – 1)	0,189**
Число перенесенных эмбрионов:			
- один;	112 (73,5%)	510 (67,4%)	0,347***
- два.	23 (13,9%)	92 (12,2%)	

* t-test; ** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера

Далее было проанализировано качество всех эмбрионов пятых суток культивирования. В группе микровибрации была проведена оценка качества 952 эмбрионов, полученных от 166 пациенток. В группе 2 была проведена оценка качества 3369 эмбрионов, полученных от 757 пациенток. При культивировании в условиях КММВ на 1,2% повышалось число эмбрионов первой степени зрелости ($p = 0,002$) и на 0,8% – число эмбрионов пятой степени зрелости ($p = 0,058$). При оценке качества ВКМ и ТФЭ было показано, что в группе микровибрации было на 2,6% больше эмбрионов класса АА ($p = 0,084$) и на 1,3% больше эмбрионов класса ВА ($p = 0,019$), чем в группе сравнения. В целом при подсчете влияния КММВ на эмбрионы отличного и хорошего качества (6ВВ, 5АА, 5ВВ, 4АА, 4АВ, 4ВА, 4ВВ, 3АА, 3АВ, 3ВА, 3ВВ) в отличие от влияния на эмбрионы плохого качества (1СС, 1СА, 1В, 1АА, 2СС, 2ВС, 2ВВ, 2АВ, 2ВА, 2АА, 3СС, 3СВ, 4СС, 4ВС, 4АС) было получено, что КММВ увеличивает число эмбрионов отличного и хорошего качества на 2,1%, и снижает число эмбрионов плохого качества на 0,6%. Таким образом, можно сказать, что микровибрация оказывает положительное влияние на быстро (своевременно) развивающиеся эмбрионы и отрицательное влияние на эмбрионы низкого качества (Таблица 4).

Таблица 4. Качество эмбриона в зависимости от условий культивирования

Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты						
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	Всего
А	А	0,5% [°]	0,2%	1,2%	0,2%	0,6% [°]		2,6% [°]
А	В	0,1%	-0,3%	-0,2%	-0,9%			-1,3%
А	С	0,1%			0,1%			0,2%
В	А		-0,1%	0,5%	1,0%			1,3%*
В	В		-0,5% [°]	-0,2%	-0,5%	0,3%	0,1%	-0,9%
В	С		0,1%		-0,3%			-0,2%
С	А							0,0%
С	В			0,2%				0,2%
С	С	0,6%*	-0,3%	-0,8% [°]	-0,2%			-0,8%
Всего		1,3%*	-0,9%	0,7%	-0,6%	0,9%[°]	0,0%	1,2%
Кавитирующая морула		0,6%	Морула	0,6%	Отдельные бластомеры	-1,8%	Деградация эмбриона	-0,5%

Разница долей (дельта) (группа микровибрации минус группа сравнения) рассчитана для каждого морфологического класса эмбриона. * – $p < 0,05$ (точный тест Фишера). [°] – $p < 0,1$ (точный тест Фишера). Черным цветом отмечены ячейки с эмбрионами отличного и хорошего качества, красным цветом – с эмбрионами плохого качества.

У 98 (59,0%) пациенток группы микровибрации и 367 (48,5%) пациенток группы 2 после ПЭ в полость матки была произведена криоконсервация одного или нескольких эмбрионов ($p=0,002$). ОШ вероятности криоконсервации эмбрионов в зависимости от проведения КММВ составило 1,53 (95% ДИ=1,09; 2,15). Т.е. применение КММВ позволило увеличить частоту криоконсервации эмбрионов с 41,1 до 59,0%, а также повысить число эмбрионов, пригодных для проведения криоконсервации. Среднее число криоконсервированных эмбрионов составило 3 (1-4) у пациенток микровибрации и 2 (1-4) у пациенток группы 2 ($p=0,052$).

На третьем этапе была оценена ЧНБ, и частота живорождения в двух группах и подгруппах пациенток с учетом клинико-лабораторных и эмбриологических параметров. В группе 1 биохимическая беременность наступила у 56 пациенток (ЧНБ = 33,7%), в группе 2 ($n = 757$) – у 214 пациенток (ЧНБ = 28,3%), $p = 0,096$. Частота клинической беременности была значимо выше в группе 1 (32,5%), чем в группе 2 (24,3%), $p=0,019$. Т.е. применение КММВ позволило повысить ЧНБ на 8,2% – с 24,3 до 32,5%, что подтверждает данные о положительном влиянии микровибрации на имплантационный потенциал эмбрионов человека в программах ВРТ. Частота рождения живого здорового ребенка была также выше в группе 1 (32,5%), чем в группе 2 (19,2%), $p = 0,049$.

С целью выделения более четких показаний к КММВ, мы проанализировали влияние КММВ на эмбриологические параметры и ЧНБ в различных клинических группах пациенток.

У пациенток позднего репродуктивного возраста (37-45 лет, группа 1.1.) было получено меньшее число ОКК и бластоцист, и более низкое количество полученных ооцитов и эмбрионов, чем у пациенток раннего репродуктивного возраста (18-36 лет, группа 1.2.). В данной группе ЧНБ составила 17,4%, а у пациенток младше 37 лет – 36,3% ($p < 0,001$, ОШ=2,55, 95% ДИ=1,65; 3,74). Роды живым плодом произошли в 26,6% в группе 1.2. и в 9,3% в группе 1.1. ($p < 0,001$, ОШ= 3,33, 95% ДИ=1,95; 4,42). КММВ была проведена у 57 из 344 пациенток группы 1.1. (у 16,5%) и у 109 из 579 пациенток группы 1.2. (у 18,8%). У пациенток старше 37 лет число бластоцист отличного и хорошего морфологического качества было на 3,0% ниже в группе микровибрации (23,8% против 26,8%), число бластоцист низкого качества – на 2,4% выше в группе микровибрации (9,4% против 7,0%), число эмбрионов, не сформировавших бластоцисту – на 0,6% выше в группе микровибрации (66,8% против 66,2%). Напротив, у пациенток 36 лет и моложе, число бластоцист отличного и хорошего морфологического качества было на 3,2% выше в группе микровибрации (38,3% против 35,1%), число бластоцист низкого качества – на 1,9% ниже в группе микровибрации (7,8% против 9,7%), число эмбрионов, не сформировавших бластоцисту – на 1,3% ниже в группе микровибрации (53,9% против 55,2%) (Рисунок 1). Таким образом, у пациенток позднего репродуктивного возраста микровибрация приводит к снижению числа бластоцист отличного и хорошего качества за счет повышения числа бластоцист низкого качества и эмбрионов, не достигших стадии бластоцисты. У пациенток моложе 37 лет наблюдается обратная ситуация – повышение числа бластоцист отличного и хорошего качества за счет снижения числа бластоцист низкого качества и эмбрионов, не достигших стадии бластоцисты.

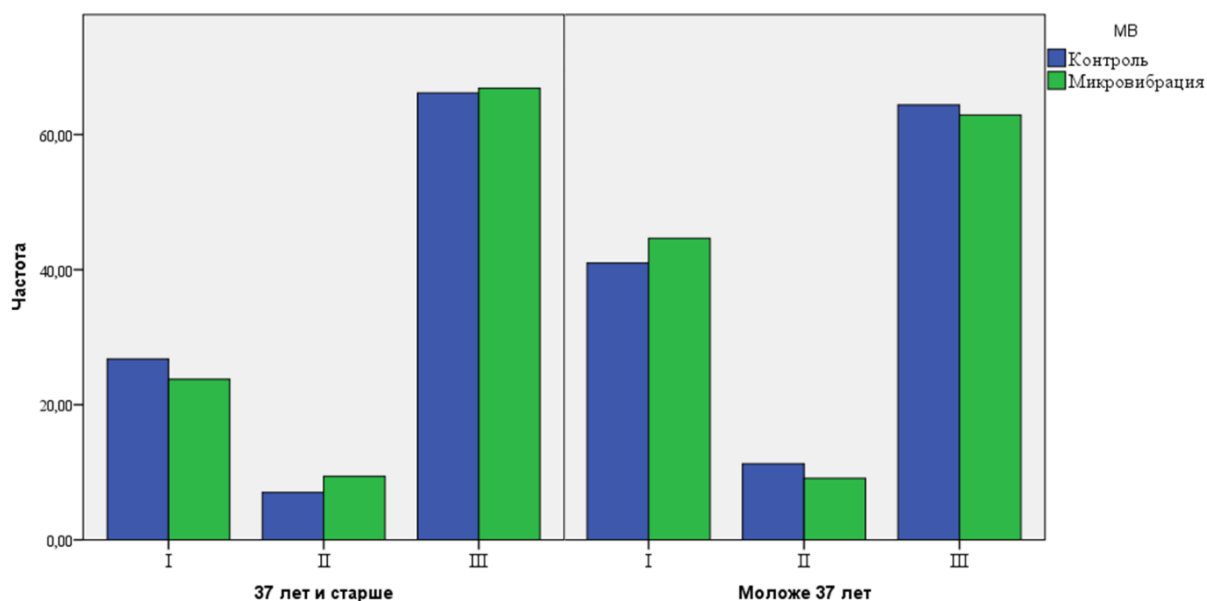


Рис. 1. Качество эмбрионов в зависимости от условий культивирования у пациенток разных возрастных групп. I – бластоцисты отличного и хорошего качества, II – бластоцисты плохого качества, III – эмбрионы, не сформировавшие бластоцисту.

У пациенток с ожирением и избыточной массой тела (ИМТ ≥ 25 кг/м², группа 1.3.) было получено меньшее число ОКК и бластоцист, в том числе бластоцист «отличного» качества, чем у пациенток с нормальным ИМТ (ИМТ < 25 кг/м², группа 1.4.). Тем не менее, ЧНБ у них не отличалась от ЧНБ пациенток с нормальным ИМТ и составила 27,8% и 29,4%, соответственно ($p=0,446$). Частота живорождения составила 19,5% и 19,9%, соответственно ($p=0,538$). КММВ была проведена у 11 из 72 пациенток группы 1.3. (у 15,3%) и у 155 из 851 пациенток группы 1.4. (у 18,2%). У пациенток с ожирением и избыточной массой тела число бластоцист отличного и хорошего морфологического качества было на 11,7% ниже в группе микровибрации (20,7% против 32,4%), число бластоцист низкого качества – на 4,5% выше в группе микровибрации (10,3% против 5,8%), число эмбрионов, не сформировавших бластоцисту – на 7,2% выше в группе микровибрации (69,0% против 61,8%). Напротив, у пациенток с нормальным ИМТ число бластоцист отличного и хорошего морфологического качества было на 2,3% выше в группе микровибрации (35,3% против 33,0%), число бластоцист низкого качества – на 1,1% ниже в группе микровибрации (8,1% против 9,2%), число эмбрионов, не

сформировавших бластоцисту – на 1,2% ниже в группе микровибрации (56,6% против 57,8%) (Рисунок 2).

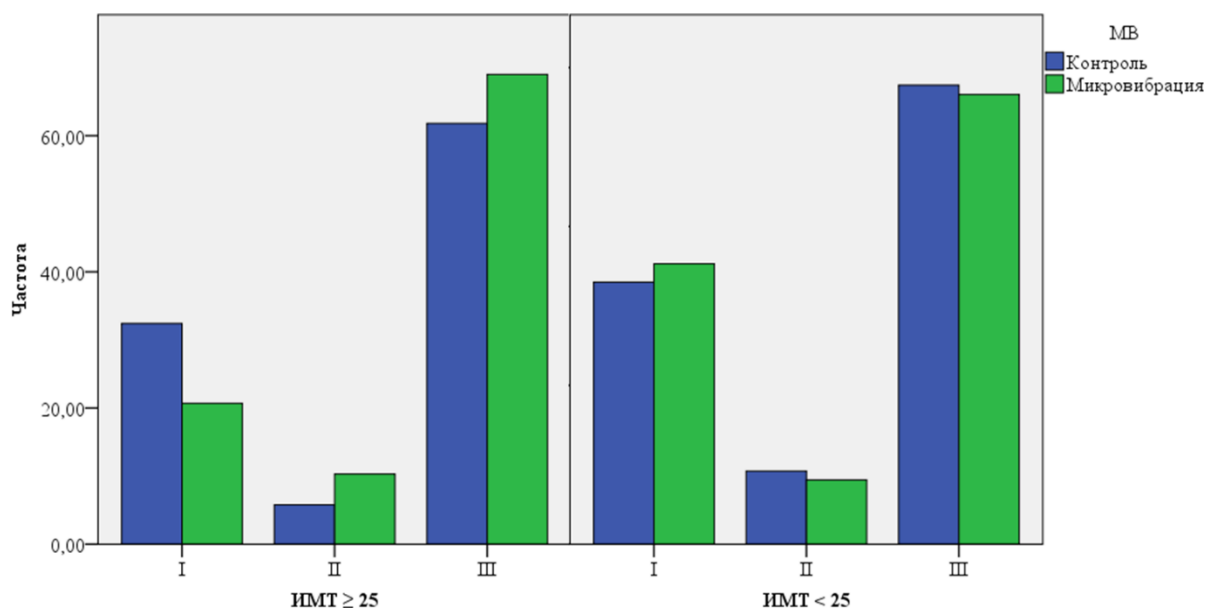


Рис. 2. Качество эмбрионов в зависимости от условий культивирования у пациенток в зависимости от ИМТ. I – бластоцисты отличного и хорошего качества, II – бластоцисты плохого качества, III – эмбрионы, не сформировавшие бластоцисту.

Таким образом, у пациенток с ожирением и избыточной массой тела микровибрация приводит к снижению числа бластоцист отличного и хорошего качества за счет повышения числа бластоцист низкого качества и эмбрионов, не достигших стадии бластоцисты. У пациенток с нормальным ИМТ наблюдается обратная ситуация – повышение числа бластоцист отличного и хорошего качества за счет снижения числа бластоцист низкого качества и эмбрионов, не достигших стадии бластоцисты.

У пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ) (группа 1.5.) было получено меньшее число ОКК и бластоцист и более низкое количество полученных ооцитов и эмбрионов, чем у пациенток без НГЭ (группа 1.6.). Несмотря на выявленные отличия в подгруппах пациенток, ЧНБ у пациенток с НГЭ не отличалась от ЧНБ пациенток без НГЭ и составила 29,9% и 29,0% соответственно ($p = 0,436$). Частота живорождения составила 20,4% и 20,2% соответственно ($p = 0,519$). КММВ была проведена у 44 из 231 пациенток группы 1.5. (у 19,0%) и у 129 из 692 пациенток группы 1.6. (у 18,6%). Было

выявлено, что у пациенток с НГЭ микровибрация оказывала отрицательный эффект на качество эмбрионов: число бластоцист отличного и хорошего морфологического качества было на 3,4% ниже в группе микровибрации (28,0% против 31,4%), число бластоцист низкого качества – на 1,5% выше в группе микровибрации (12,0% против 10,5%), число эмбрионов, не сформировавших бластоцисту – на 1,9% выше в группе микровибрации (60,0% против 58,1%). У пациенток без НГЭ число бластоцист отличного и хорошего морфологического качества было на 0,7% выше в группе микровибрации (34,9% против 34,2%), число бластоцист низкого качества – на 0,3% ниже в группе микровибрации (8,3% против 8,6%), число эмбрионов, не сформировавших бластоцисту – на 0,4% ниже в группе микровибрации (56,8% против 57,2%) (Рисунок 3). Таким образом, в общей группе пациенток с НГЭ микровибрация приводит к снижению числа бластоцист отличного и хорошего качества. У пациенток без НГЭ наблюдается обратный эффект.

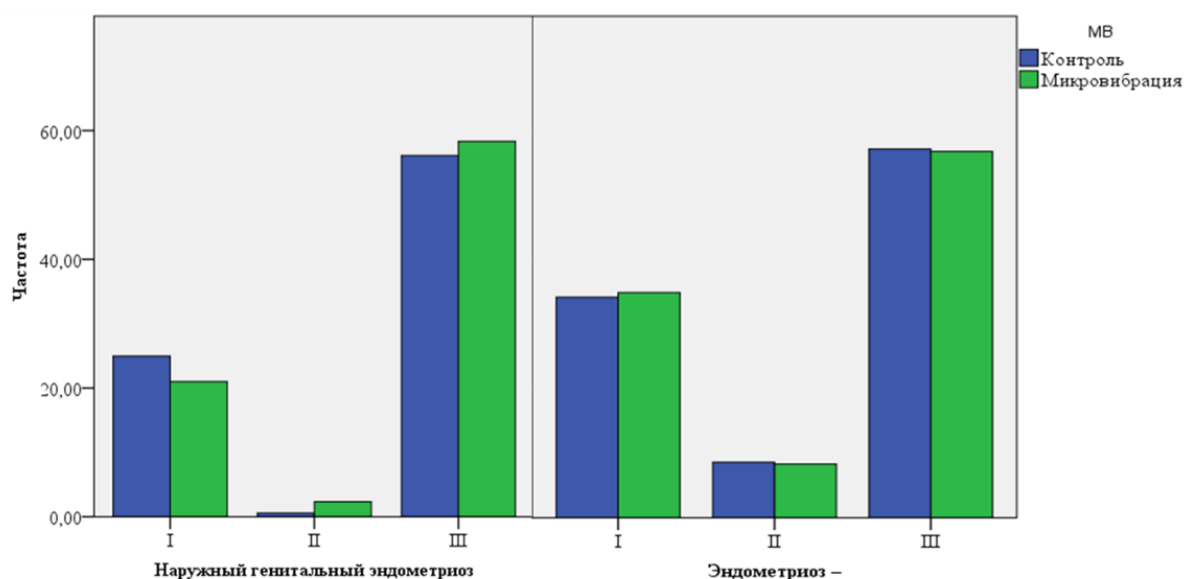


Рис. 3. Качество эмбрионов в зависимости от условий культивирования у пациенток в зависимости от наличия НГЭ. I – бластоцисты отличного и хорошего качества, II – бластоцисты плохого качества, III – эмбрионы, не сформировавшие бластоцисту.

На четвертом этапе было проведено исследование метаболического статуса эмбрионов с учетом их морфологически характеристик, наличия микровибрации и наступления беременности. В данную часть исследования

были включены культуральные среды 30 пациенток: 20 пациенток группы 1 и 30 пациенток группы 2.

В результате обработки масс-спектров в культуральной среде эмбриона человека пятых суток развития было выявлено 1146 различных молекулярных ионов. Из них были отобраны 26 метаболитов, значимо различающихся в группах сравнения с кратностью различий интенсивности сигналов более двух. Для оценки кластеризации образцов и выявления потенциальных выбросов был проведен многомерный статистический анализ методом OPLS-DA, который выявил статистически значимые различия между исследуемыми группами (Рисунок 4).

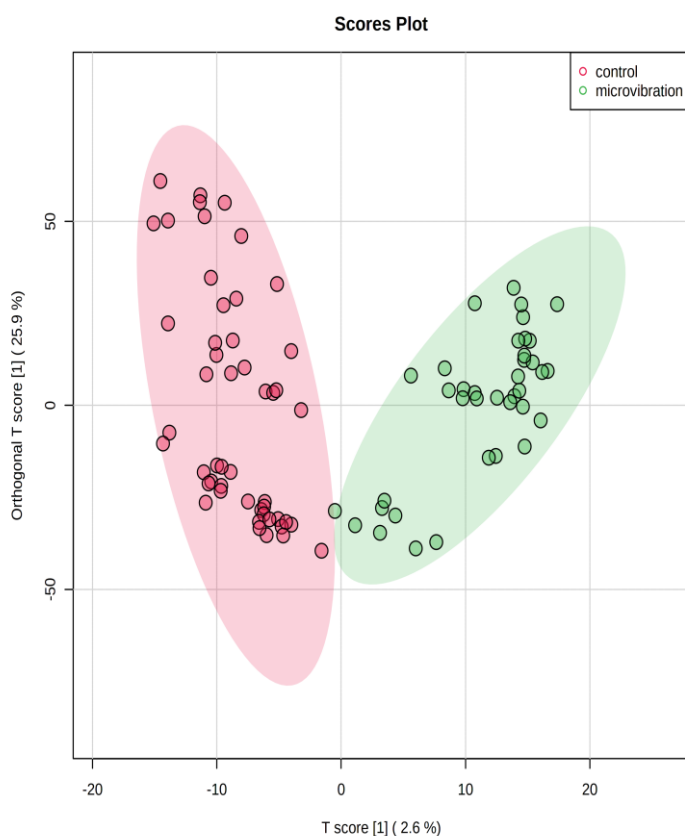


Рис. 4. Результаты OPLS-DA анализа профилей метаболитов сред культивирования эмбрионов человека группы контролируемой механической микровибрации и группы сравнения.

Наиболее значимыми молекулами, уровень которых различался в группах сравнения, являлись прогестерон, глутамин, гидроксипролил-глутамат, лизил-гамма-глутамат, ацетилхолин, олеамид, простагландин A2 и его конъюгат с глутатионом, 2,3-Динор-Тромбоксан B2 и 20-Гидрокси-Простагландин E2.

Проведенный анализ метаболических путей позволил выявить два наиболее значимых – путь биосинтеза фосфолипидов, входящих в состав всех клеточных мембран; и путь метаболизма фенилацетата, отвечающий, в первую очередь, за выведение азотистых оснований при метаболизме аминокислот (Рисунок 5).

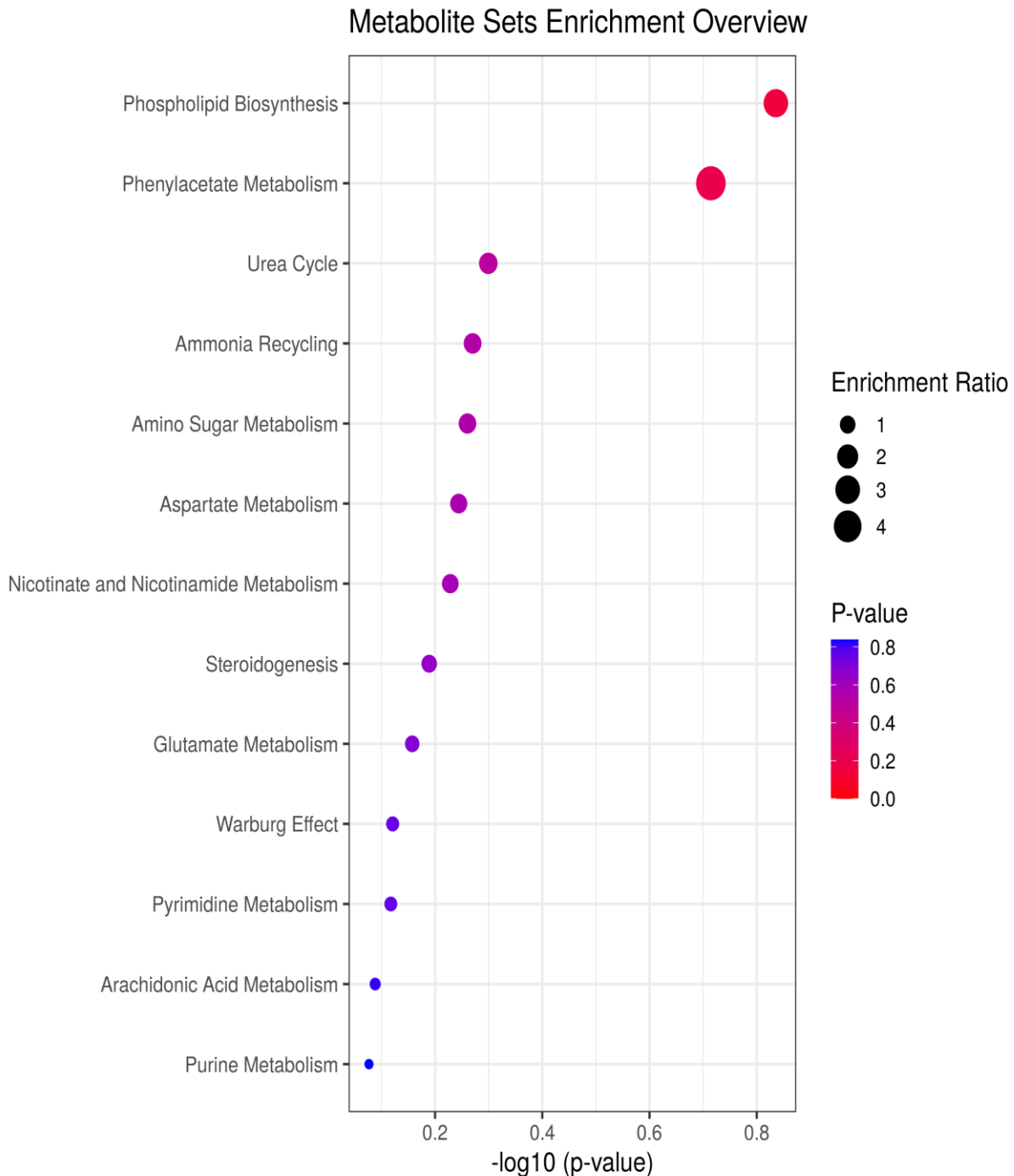


Рис. 5. Метаболические пути, подверженные влиянию контролируемой механической микровибрации при культивировании эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

Проведенный анализ метаболических путей свидетельствует о влиянии КММВ на биосинтез фосфолипидов и метаболизм фенилацетата. Фосфолипиды входят в состав всех клеточных мембран, а также являются основным компонентом внеклеточных везикул, поэтому активация их синтеза является крайне важным для постоянно дробящегося и развивающегося эмбриона. Кроме того, они вовлечены в широкий спектр сигнальных путей и являются предшественниками таких биологически активных молекул как лизофосфатидилхолины и эйкозаноиды. Таким образом, полученные при анализе метаболических путей результаты согласуются с данными об активации роста и развития эмбриона человека под действием КММВ, приведенными выше. Метаболизм фенилацетата отвечает в первую очередь за выведение азотистых оснований при метаболизме аминокислот, являющихся основным источником энергии при культивировании эмбриона в лаборатории ВРТ. К примеру, фенилаланин метаболизируется в фенилацетат через фенилпироват, после чего фенилацетат метаболизируется в фенилацетилглутамин. Таким образом, все полученные данные прямо или косвенно свидетельствуют об активации метаболических процессов эмбриона, направленных на его рост и развитие, под действием КММВ.

ВЫВОДЫ

1. Частота наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий зависит от клинических данных пациентов: уменьшается в 2 раза у пациенток старше 35,5 лет, в 1,8 раз – у пациенток, имеющих партнера старше 39,5 лет, в 1,2 раза – у пациенток с нарушениями менструального цикла по типу олигоменореи, в 1,4 раза – у пациенток с интрамуральной или субсерозной миомой матки малых размеров (<4 см) и у пациенток с медикаментозно скорректированным гипотиреозом аутоиммунной этиологии.
2. Частота наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий зависит от характеристик полученных эмбрионов: уменьшается при меньшем числе полученных бластоцист (на 29,3%) и бластоцист класса 4АА и 4АВ по классификации Гарднера (на 27,5%), и не зависит от метода оплодотворения (ЭКО или ИКСИ), применения вспомогательного хетчинга и числа переносимых в полость матки эмбрионов.

3. Контролируемая механическая микровибрация оказывает влияние на бластуляцию эмбрионов и их дальнейшее развитие, что проявляется в повышении числа бластоцист отличного и хорошего качества (число эмбрионов класса 6ВВ, 5АА, 5ВВ, 4АА, 4АВ, 4ВА, 4ВВ, 3АА, 3АВ, 3ВА, 3ВВ – повышается на 2,1%), и снижении числа бластоцист плохого качества (число эмбрионов класса 1СС, 1СА, 1В, 1АА, 2СС, 2ВС, 2ВВ, 2АВ, 2ВА, 2АА, 3СС, 3СВ, 4СС, 4ВС, 4АС – уменьшается на 0,6%) и эмбрионов, не способных сформировать бластоцисту.

4. Контролируемая механическая микровибрация повышает вероятность получения эмбрионов, пригодных для криоконсервации, в 1,53 раза, и приводит к получению большего числа эмбрионов, пригодных для криоконсервации, что имеет важное значения для повышения кумулятивной частоты наступления беременности и живорождения, а также для пациенток программ отложенного родительства.

5. Контролируемая механическая микровибрация оказывает влияние на качество и имплантационный эффект развивающихся эмбрионов через программирование их метаболизма, о чем свидетельствует изменение содержания метаболитов в культуральной среде эмбрионов 5-х суток развития: происходит повышение прогестерона, лизил-гамма-глутамата, ацетилхолина, простагландина, 2,3-Динор-Тромбоксана В₂ и 20-Гидрокси-Простагландина Е₂, и понижение глутамина и олеамида.

6. Контролируемая механическая микровибрация позитивно влияет на исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий, повышая частоту наступления беременности в общей группе пациенток на 5,4%, однако у пациенток со сниженным потенциалом развития эмбрионов (позднего репродуктивного возраста, с ожирением, с наружным генитальным эндометриозом) оказывает нейтральный или негативный эффект, что связано с ее отрицательным влиянием на эмбрионы с низким потенциалом развития.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам, планирующим беременность с помощью методов вспомогательной репродукции, рекомендована нормализация массы тела и хирургическое лечение эндометриоза до вступления в программу ВРТ, так как ожирение и эндометриоз снижают частоту наступления беременности, в том числе оказывая негативное влияние на оогенез и эмбриогенез.

2. Пациенткам раннего репродуктивного возраста (до 37 лет), планирующим беременность с помощью методов вспомогательной репродукции, рекомендовано применение контролируемой механической микровибрации во время культивирования эмбрионов, что оказывает положительное влияние на их развитие и позволяет провести естественный отбор эмбрионов хорошего качества.

3. Пациенткам, планирующим беременность в программах отсроченного материнства и отцовства, рекомендовано применение контролируемой механической микровибрации во время культивирования эмбрионов, так как это повышает вероятность получения эмбрионов для криоконсервации за счет улучшения их качества и большего числа эмбрионов, годных для криоконсервации.

4. Пациенткам группы риска получения эмбрионов плохого качества (с ожирением и избыточной массой тела, с наружным генитальным эндометриозом) применение контролируемой механической микровибрации рекомендовано после лечения данных заболеваний, так как данная методика не оказывает позитивного воздействия на качество полученных эмбрионов и частоту наступления беременности в данных группах пациенток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние механической микровибрации на качество эмбрионов человека при культивировании *in vitro* и исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий / **Романов А.Ю.**, Силачев Д.Н., Макарова Н.П., Долгушина Н.В. // **Клеточные технологии в биологии и медицине.** – 2018. – № 2. – С. 86-90.

2. Первый российский опыт применения управляемой механической микровибрации при культивировании эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий / **Романов А.Ю.**, Фролова А.М., Макарова Н.П., Долгушина Н.В. // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – № 12. – С. 120-125.

3. Влияние контролируемой механической микровибрации на метаболомный профиль сред культивирования эмбрионов человека пятых суток развития / **Романов А.Ю.**, Эльдаров Ч.М., Фролова А.М., Макарова Н.П., Бобров М.Ю., Долгушина Н.В. // **Акушерство и гинекология.** – 2020. – № 11. – С. 131-138.

4. Влияние контролируемой механической вибрации на частоту оплодотворения ооцитов и эмбриональное развитие первых пяти суток культивирования / **Романов А.Ю.**, Романов Е.А., Макарова Н.П., Долгушина Н.В. // **Акушерство и гинекология.** – 2021. – № 7. – С. 152-157.
5. Влияние механической микровибрации на качество эмбрионов человека при культивировании *in vitro* и исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий / **Романов А.Ю.**, Сыркашева А.Г., Фролова А.М., Макарова Н.П., Ильинская С.М., Долгушина Н.В. // **Материалы XIX Всероссийский научно-образовательный форум "Мать и Дитя – 2018"**, Москва, 26-28 сентября, 2018. – С. 114-115.
6. Влияние механической микровибрации эмбрионов человека первых пяти суток культивирования на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий / **Романов А.Ю.**, Долгушина Н.В., Макарова Н.П. // **Материалы XII Региональный научно-образовательный форум «Мать и Дитя» и Пленум Правления Российского общества акушеров-гинекологов**, Сочи, 26-28 июня, 2019. – С. 69-70.
7. Влияние механической микровибрации на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий / **Романов А.Ю.**, Долгушина Н.В., Макарова Н.П., Сыркашева А.Г., Калинина Е.А. // **Материалы XIII Международный конгресс по репродуктивной медицине**, Москва, 21-24 января, 2019. – С. 373-375.