

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В. И. КУЛАКОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д.м.н., проф. Долгушина Н.В.

д.б.н. Макарова Н.П.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Актуальность исследования.....	12
1.2. Факторы, влияющие на качество гамет и эмбрионов человека .	14
1.2.1. Поздний репродуктивный возраст и преждевременная недостаточность яичников	14
1.2.2. Ожирение.....	17
1.2.3. Наружный генитальный эндометриоз	19
1.2.4. Факторы окружающей среды и образ жизни.....	21
1.3. Оптимизация выбора эмбриона для селективного переноса на основе анализа эмбрионов и компонентов среды культивирования	23
1.3.1. Визуальная оценка качества эмбриона	23
1.3.2. Оценка состава среды культивирования эмбриона	26
1.4. Влияние микровибрации на качество эмбрионов человека при культивировании <i>in vitro</i> и исходы программ ВРТ	32
1.4.1. Контролируемая механическая микровибрация	32
1.4.2. Звуковая вибрация.....	36
1.4.3. Со-культивирование эмбрионов человека в условиях микровибрации 37	37
1.4.4. Созревание ооцитов <i>in vitro</i> (IVM) в условиях микровибрации.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Материал исследования.....	41
2.2. Методы исследования.....	44
2.2.1. Общеклинические методы исследования	46
2.2.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза.....	47
2.2.3. Гормональное обследование	48
2.2.4. Исследование эякулята	48
2.2.5. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов....	49

2.2.6. Морфологическая оценка ооцитов и оплодотворение	50
2.2.7. Культивирование и морфологическая оценка эмбрионов	51
2.2.8. Метаболомное профилирование.....	52
2.2.9. Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода	53
2.3. Методы статистической обработки данных.....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
3.1. Клинико-anamнестическая характеристика пациенток, включенных в исследование.....	55
3.2. Клинико-anamнестические факторы, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий	58
3.3. Особенности овариальной стимуляции, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий	63
3.4. Эмбриологические факторы, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий	64
3.5. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту оплодотворения ооцитов и развитие эмбрионов первых пяти суток культивирования	67
3.6. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту наступления беременности в зависимости от клинико-anamнестических данных пациенток	70
3.6.1. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту наступления беременности у пациенток позднего репродуктивного возраста	71
3.6.2. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту наступления беременности у пациенток с ожирением	77
3.6.3. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту наступления беременности у пациенток с эндометриозом	83
3.7. Влияние контролируемой механической микровибрации на течение беременности и частоту живорождения	91
3.8. Влияние контролируемой механической микровибрации на метаболомный профиль сред культивирования эмбрионов человека пятых суток развития	92
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	99
4.1. Клинико-anamнестические факторы, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий	99

4.2. Особенности овариальной стимуляции, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий	101
4.3. Эмбриологические факторы, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий	101
4.4. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту оплодотворения ооцитов и эмбриональное развитие первых пяти суток культивирования	102
4.5. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту наступления беременности в зависимости от клинико-anamнестических данных пациенток	103
4.6. Влияние контролируемой механической микровибрации на метаболомный профиль сред культивирования эмбрионов человека пятых суток развития	105
Выводы	108
Практические рекомендации.....	110
Приложение 1. Метаболиты различия	111
Приложение 2. Алгоритм применения контролируемой механической микровибрации при культивировании эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий.....	112
Список сокращений	113
Список литературы	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Цель всех программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) – повышение частоты имплантации, 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 blastocyst 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 [1]. 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 (ксенобиотиков). У данных пациенток частота наступления беременности (ЧНБ) зачастую не превышает 5-10% [2–5]. 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 [6], но также позволяет повысить вероятность наступления беременности и живорождения [1, 7], у пациенток, у которых не удается достичь беременности в стандартных программах ВРТ.

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 клинико-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 бластоцист класса 4АА и 4АВ 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.

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).

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.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 132 страницах печатного текста 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Актуальность исследования

С момента рождения первого ребенка, появившегося на свет в результате ВРТ – Луизы Браун [8], всё большее внимание уделяется подбору оптимальных параметров культивирования эмбрионов для получения бластоцист отличного качества и повышения эффективности ВРТ при селективном переносе одного эмбриона в полость матки. Подбор оптимальных условий культивирования эмбрионов особенно важен у пациенток позднего репродуктивного возраста с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом в связи с высоким риском развития эмбрионов низкого качества. Развитие эмбриона вне организма матери означает, что он постоянно подвергается стрессам, которые он не испытал бы в естественных условиях: изменение рН среды, температурные колебания, воздействие атмосферных концентраций кислорода и дневного света.

Для улучшения систем культивирования эмбрионов проводится подбор оптимального состава культуральной среды: содержания питательных веществ, ионов, факторов роста и других добавок [9–11]. Однако большинство систем культивирования представляют собой относительно небольшой (до 1 мл) объем статичной культуральной среды [12–14]. Эти условия во многом далеки от тех, в которых находится эмбрион человека в условиях *in vivo* [15].

В естественных условиях эмбрион постоянно находится в сложных динамических взаимодействиях с организмом матери. Оплодотворение и преимплантационное развитие эмбриона происходит в маточной трубе. Сокращение мышц матки и маточных труб вместе с постоянными цилиарными сокращениями создают уникальные условия для продвижения гамет по репродуктивным путям женщины, оплодотворения и последующего

преимплантационного развития эмбриона [16, 17]. В это время эмбрион находится в постоянном движении за счет перистальтических сокращений мышечной стенки маточной трубы и биения ворсинок её слизистой оболочки.

Мышечные сокращения необходимы для обволакивания гамет и, в последующем, эмбриона секретом маточных труб, что способствует нормальному процессу оплодотворения и продвижению эмбриона по направлению к матке [18]. Кроме того, секрет маточной трубы содержит ряд питательных веществ, факторов роста и других биологически активных молекул, необходимых для оптимального преимплантационного развития эмбриона.

Помимо секреторного эпителия, слизистая оболочка маточной трубы представлена клетками ворсинчатого эпителия, ворсинки которых постоянно колеблются с частотой от $(4,9 \pm 0,2)$ Гц в пролиферативную фазу до $(5,8 \pm 0,3)$ Гц в секреторную фазу менструального цикла [19, 20]. По данным Isachenko E. et al. (2010) [1], в естественных условиях эмбрион находится под постоянным воздействием вибрации с частотой до 20 Гц. Цилиарные сокращения, вызывая колебания секрета маточной трубы, не только способствуют улучшению диффузии питательных веществ, но и оказывают непосредственное механическое воздействие на эмбрион. Это приводит к активации различных внутриклеточных каскадов [21] и является важным фактором в регуляции преимплантационного развития эмбриона [6]. Таким образом, создание системы культивирования, которая могла бы максимально имитировать естественные условия преимплантационного развития эмбриона является достаточно сложной и многокомпонентной задачей.

Влияние динамического микроокружения на развитие эмбриона как в естественных условиях (*in vivo*), так и при культивировании *in vitro* в программах ВРТ не вызывает сомнений [15]. Для улучшения

микроокружения эмбриона при культивировании *in vitro* могут быть предложены несколько основных стратегий.

Одна из них нацелена на минимизацию влияния внешних факторов на систему культивирования. Этого можно достичь за счет культивирования эмбриона внутри альгинатного геля [22] или в лунке минимального объема, расположенной на дне культуральной плашки [23]. Значительным недостатком таких систем культивирования является накопление в культуральной среде токсичных продуктов жизнедеятельности эмбриона, замедляющих его развитие [24].

Другая стратегия заключается в создании постоянной перфузии культуральной среды для обеспечения притока питательных веществ к культивируемому эмбриону. Однако применение такой системы не приводит к повышению частоты наступления беременности (ЧНБ), что может быть связано с удалением аутокринных факторов роста с током культуральной среды [25].

Новым подходом к улучшению условий культивирования эмбрионов человека в программах ВРТ может стать сочетание представленных выше систем культивирования с микровибрацией [1].

1.2. Факторы, влияющие на качество гамет и эмбрионов человека

1.2.1. Поздний репродуктивный возраст и преждевременная недостаточность яичников

Имплантационный потенциал эмбриона зависит от многих факторов, влияние которых опосредовано качеством ооцитов и сперматозоидов [26]. Возраст является одним из наиболее значимых факторов, влияющих на качество гамет как у женщин, так и у мужчин [2, 3]. Согласно данным Franasiak J.M. et al. (2013), у пациенток старше 26 лет происходит

прогрессивное повышение числа анеуплоидных эмбрионов [27]. Согласно данным, полученным на большой выборке пациенток, у женщин в возрасте от 26 до 37 лет вероятность отсутствия эуплоидных эмбрионов в цикле ЭКО или ИКСИ не превышает 6%. В то же время, этот показатель повышается до 33% в возрасте 42 лет и до 53% в возрасте 44 лет [27]. Механизмы, лежащие в основе ухудшения качества ооцитов у женщин позднего репродуктивного возраста, включают также митохондриальную дисфункцию, эпигенетические изменения и оксидативный стресс [28, 29].

Крайне важно отметить, что хотя молодые (до 38 лет) женщины с преждевременной недостаточностью яичников (ПНЯ) имеют более низкую частоту живорождений на цикл овариальной стимуляции, это не связано с плохим качеством ооцитов. Частота бластуляции на оплодотворенный ооцит и частота живорождения на перенос эмбриона у пациенток с ПНЯ эквивалентны таковым у женщин того же возраста с нормальными показателями овариального резерва. Таким образом, в основе ПНЯ лежат патофизиологические механизмы, отличающиеся от возрастных изменений оогенеза, носящих не только количественный, но и качественный характер [30, 31].

В литературе присутствуют противоречивые данные касательно влияния возраста мужчины на качество эмбрионов в программах ВРТ. Так, согласно данным García-Ferreya J. et al. (2018), в циклах ВРТ с применением ооцитов донора старший возраст мужчины ассоциирован с высоким процентом эмбрионов с трисомией по 21-ой, 18-ой и 13-ой хромосомам [32]. В общей сложности 378 эмбрионов, полученных в 52 циклах ЭКО или ИКСИ с донорскими ооцитами в сочетании с ПГТ-А, были разделены в соответствии с мужским возрастом на три группы: группа А (≤ 39 лет, 115 эмбрионов), группа В (40-49 лет, 157 эмбрионов) и группа С (50 лет, 106 эмбрионов). В исследуемых группах не было выявлено различий по параметрам спермограммы (объему, концентрации и подвижности

сперматозоидов). Частота оплодотворения, дробления, и развития эмбрионов хорошего качества на 3-й день после оплодотворения были одинаковыми во всех группах. В группе мужчин 50 лет и старше было значительно больше сперматозоидов с поврежденной ДНК, частота анеуплоидий эмбрионов, в особенности, по 21-ой, 18-ой и 13-ой хромосомам была значительно выше, чем в других группах [32].

Противоположные результаты были получены в многоцентровом исследовании Carrasquillo R.J. et al. (2019) [33]. В исследовании были включены 6934 эмбриона, полученных в 1202 циклах ЭКО или ИКСИ с донорскими ооцитами в сочетании с ПГТ-А. Не было выявлено значимой связи между возрастанием отцовского возраста и частотой выявления анеуплоидий в эмбрионах как в целом, так и при анализе каждой хромосомы в отдельности. Не было выявлено значимой связи между возрастанием отцовского возраста и типами анеуплоидий (моносомия, трисомия, частичная делеция/дупликация) для всех хромосом в геноме [33]. Также в исследовании Carpelouto S.M. et al. (2018), ни старший возраст мужчин, ни ожирение, ни сниженные параметры спермограммы не оказывал непосредственного влияния на эффективность программ ВРТ с применением ооцитов донора [34]. По всей видимости, оплодотворение методом ИКСИ и высокие компенсаторные возможности донорских ооцитов в некоторой степени снижают влияние мужского фактора на исходы программ ВРТ [34].

Тем не менее, нельзя игнорировать связь между отцовскими факторами и результатами программ ВРТ. Согласно данным Kasman A.M. et al. (2020), обобщившим результаты 4517 циклов ВРТ, с более низкой ЧНБ ассоциированы такие факторы как низкая подвижность сперматозоидов (менее 40%) и низкое общее число подвижных сперматозоидов (менее 9 миллионов) [35]. При отдельном анализе циклов ИКСИ со снижением ЧНБ был связан только более низкий показатель подвижности сперматозоидов. Не было выявлено связи между качеством спермы и сроком родоразрешения или

массой тела при рождении. Примечательно, что отцовский возраст не оказывал влияния на эффективность программ ВРТ, однако среди циклов ВРТ у женщин младше 40 лет частота анеуплоидий была выше у мужчин старшего возраста [35]. Необходимо помнить, что на параметры спермограммы значительное влияние оказывают факторы окружающей среды, образ жизни, наличие профессиональных вредностей, андрологическая и соматическая патология. Помимо общих параметров сперматогенеза, негативное влияние на качество эмбрионов и ЧНБ в программах ВРТ могут оказывать такие факторы нарушения структуры хроматина сперматозоидов, высокий уровень фрагментации ДНК, нарушения протаминов и гистонов, эпигенетические модификации и микроделеции Y-хромосомы, которые отрицательно влияют на качество эмбриона [36].

Таким образом, возраст женщины является крайне важным фактором, оказывающим влияние на количество и качество гамет и эмбрионов в программах ВРТ, тогда как возраст мужчины оказывает несколько меньшее влияние. Высокая частота анеуплоидий не является единственным фактором, ответственным за неудачи имплантации эмбрионов у пациенток позднего репродуктивного возраста [37]. Помимо анеуплоидий, негативными факторами, опосредующими снижение ЧНБ у пациенток с бесплодием, являются собственно снижение морфологического качества эмбрионов, эпигенетические модификации, митохондриальные, энергетические и метаболические нарушения гомеостаза.

1.2.2. Ожирение

Во всем мире наблюдается драматическая тенденция к росту распространенности ожирения как у мужчин, так и у женщин. Ожирение не только связано со многими неблагоприятными последствиями для матери и плода, но также оказывает негативное влияние на женскую фертильность [4]. Женщины с ожирением более склонны к овуляторной дисфункции из-за

нарушения регуляции гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы [38]. Ожирение также ассоциировано с неудачами ВРТ, оказывает негативное влияние на качество ооцитов и эмбрионов человека, нарушая формирование мейотического веретена и нарушая функционирование митохондрий [4]. Избыток свободных жирных кислот может оказывать повреждающее действие на ткань яичников (и других органов), приводя к нарушению клеточного метаболизма, хроническому воспалению, повышению концентрации активных форм кислорода, которые вызывают нарушения функционирования митохондрий и эндоплазматического ретикулама, приводящие к развитию апоптоза [39, 40]. Кроме того, изменение уровней адипокинов, таких как лептин, при ожирении может влиять на стероидогенез и на развивающийся эмбрион. Также ожирение имеет негативное влияние на состояние эндометрия, что проявляется в нарушении децидуализации стромы эндометрия у женщин с ожирением [4].

В литературе присутствует значительное количество данных, подтверждающих негативное влияние ожирения на качество ооцитов [4]. Согласно данным Robker R.L. et al. (2009), у женщин с ожирением в программах ВРТ фолликулярная среда содержит более высокие уровни инсулина, триглицеридов и маркеров воспаления, таких как лактат и С-реактивный белок [41]. Ожирение влияет на реакцию яичников на стимуляцию гонадотропинами – для нормального роста фолликулов необходимы более высокие дозы гонадотропинов и более продолжительные курсы их назначения, кроме того, у данной группы пациенток число получаемых ооцитов в среднем ниже, чем у пациенток с нормальной массой тела. Также у них выше частота отмены переноса эмбриона [42–44].

На мышинной модели было показано, что ожирение приводит к снижению размера ооцитов и нарушению их созревания [45], что было ассоциировано с нарушением мейоза в результате дезорганизации мейотического веретена и отсутствием должного выравнивания хромосом на

метафазной пластинке [46]. Сходные данные были получены для человека в исследовании Machtinger R. et al. (2012). Авторы показали, что у женщин с ожирением ооциты, оплодотворение которых не произошло в циклах ЭКО или ИКСИ, также содержали беспорядочные мейотические веретена со смещенными метафазными хромосомами [47].

Кроме того, в литературе описаны изменения эндоплазматического ретикулама и митохондрий ооцитов, вызванные ожирением [4]. Митохондрии характеризуются меньшим количеством крист, большим количеством вакуолей, признаками набухания и метаболического стресса [46, 48]. Кроме того, происходит изменение локализации митохондрий по всей ооплазме [49].

Сходные механизмы обуславливают негативное влияние ожирения на преимплантационное развитие эмбриона как *in vivo*, так и *in vitro*. Качество эмбрионов пациенток с ожирением в программах ВРТ снижено, по сравнению с пациентками с нормальной массой тела [50, 51]. Также у пациенток с ожирением снижается ЧНБ и частота рождения живого здорового ребенка [50]. Согласно данным мета-анализа Sermondade N. et al. (2019), у женщин с ожирением вероятность живорождения в программах ЭКО снижается на 15% (95% ДИ=0,82; 0,87) по сравнению с женщинами с нормальным весом. Также имеет значение выраженность ожирения – ожирение III степени приводит к двухкратному снижению ЧНБ и частоты живорождения, что, в свою очередь, опосредовано низким качеством ооцитов [52].

1.2.3. Наружный генитальный эндометриоз

Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) – процесс, при котором за пределами полости матки происходит доброкачественное разрастание ткани, по морфологическим и функциональным свойствам подобной эндометрию

[53]. Эндометриоз оказывает многогранное негативное влияние на различные звенья репродуктивной системы [5].

Одним из механизмов негативного влияния эндометриоза на репродукцию человека является нарушение стероидогенеза [5]. Эстрадиол имеет важное значение для развития фолликулов и созревания ооцитов [54]. Эндометриоз приводит к нарушению нормального функционирования клеток гранулезы, включая изменения клеточного цикла [55], усиление апоптоза [56] и нарушение регуляции молекулярных путей клеточного сигналинга [57, 58]. Кроме того, негативное влияние эндометриоза на стероидогенез может быть опосредовано снижением экспрессии ароматазы P450 – ключевого фермента синтеза эстрогенов [59]. Показано, что у пациенток с бесплодием и эндометриозом в программах ВРТ уровень эстрадиола в день введения триггера значительно ниже, чем у пациенток без эндометриоза [60].

Другим механизмом является изменение состава фолликулярной жидкости [5]. Показано, что фолликулярная жидкость пациенток с эндометриозом содержит более низкие уровни эстрадиола и более высокие уровни прогестерона, что указывает на то, что нарушение стероидогенеза может напрямую влиять на местную среду ооцитов [61, 62]. Кроме того, негативное влияние проявляется в повышении содержания активных форм кислорода и уровня окислительного стресса в фолликулярной жидкости [63]. Также к снижению качества ооцитов приводит формирование воспалительного микроокружения, опосредованное повышением уровней провоспалительных цитокинов – преимущественно ИЛ-8 и ИЛ-12 [64].

Морфологически изменения ооцитов у пациенток с эндометриозом могут проявляться в виде темной центральной грануляции в ооплазме [65], потери кортикальных гранул, затвердевания блестящей оболочки [60] и других экстрацитоплазматических дисморфизмов [66], которые потенциально могут препятствовать хетчингу и имплантации эмбриона.

1.2.4. Факторы окружающей среды и образ жизни

Окружающая среда представляет собой интегрированную биогеофизическую систему. В ней происходит накопление многочисленных загрязняющих веществ, которые образуются в результате быстрого роста антропогенной деятельности (ксенобиотики) [67]. К ним можно отнести:

- металлы (основные и второстепенные, эффект зависит от продолжительности воздействия);
- биоциды (включают пестициды, бактерициды, фунгициды, гербициды, инсектициды и противообрастающие соединения);
- наночастицы (наноматериалы, характеризующиеся маленькими размерами и специфическими физико-химическими свойствами, которые позволяют им прикрепляться к плазматическим мембранам клеток или проникать в клетки через транспортные системы, оказывая тем самым повреждающее действие);
- пластмассы (при попадании в окружающую среду пластмассы разлагаются на фрагменты размером <5 мм (микропластики) и на пластиковый мусор наноразмеров (<1 мкм), оказывают негативное влияние на подвижность и функциональную активность сперматозоидов), и др.

К механизмам негативного воздействия факторов окружающей среды на качество ооцитов и сперматозоидов можно отнести активацию окислительного стресса и метаболических нарушений, нарушение метилирования ДНК и эпигенетические изменения, неправильное протаминирование или модификации гистонов [67].

Употребление табачных изделий, алкоголя и наркотических веществ в сочетании с профессиональными вредностями приводит к общему ухудшению репродуктивной функции населения [67]. Курение значительно снижает эффективность программ ВРТ, оказывает негативное влияние на качество гамет и оплодотворение. По данным мета-анализа Bundhun P.K. et

al. (2019), курение приводит к снижению количества сперматозоидов в эякуляте и нарушению их морфологии, повышению фрагментации ДНК [68]. При этом негативный эффект связан с продолжительностью и величиной воздействия [69]. Негативное влияние курения на фолликулогенез и качество ооцитов также не вызывает сомнения. Так, систематический анализ Budani M.C. и Tiboni G.M. (2017) наглядно демонстрирует связь курения и снижением овариального резерва, нарушением морфологии и зрелости ооцитов, повышением уровня апоптоза и аутофагии, повреждением ДНК, нарушением оплодотворения ооцитов и развития эмбрионов первых пяти суток культивирования и неудачами программ ВРТ [70].

Привычное употребление наркотиков заслуживает отдельного внимания как фактор риска не только для общего здоровья человека, но и для репродуктивной системы, в частности. Курение марихуаны широко распространено во многих странах. Исследования о влиянии марихуаны на здоровье и репродукцию человека достаточно противоречивы. Согласно данным Nassan F.L. et al. (2019), курение марихуаны приводит к повышению концентрации сперматозоидов, однако другие параметры спермограммы оказались ниже пороговых значений [71]. Причина такого воздействия заключается в конкурирующем влиянии каннабиноидов на рецепторы гормонов репродуктивной системы [72]. Также существуют данные о негативном влиянии опиатов (героин) на количественные и качественные показатели сперматогенеза, антиоксидантную способность семенной плазмы, фрагментацию ДНК сперматозоидов [73–75].

Влияние алкоголя на репродуктивное здоровье мужчин и женщин неоднозначно. Согласно данным систематического обзора и метаанализа Ricci E. et al. (2017), только высокое ежедневное потребление алкоголя связано с неблагоприятным воздействием на объем эякулята и морфологию сперматозоидов [76]. Убедительные данные, подтверждающие влияние алкоголя на качество ооцитов, на сегодняшний день в литературе отсутствуют.

Таким образом, пациенты программ ВРТ, имеющие высокий риск повреждения гамет и эмбрионов (пациенты позднего репродуктивного возраста, с ожирением, страдающие эндометриозом, подвергающиеся избыточному воздействию вредных факторов окружающей среды), нуждаются в применении методов, улучшающих фертилизацию ооцитов и, в дальнейшем, бластуляцию эмбрионов. Одним из таких методов современной биофизики является метод контролируемой механической микровибрации.

1.3. Оптимизация выбора эмбриона для селективного переноса на основе анализа эмбрионов и компонентов среды культивирования

1.3.1. Визуальная оценка качества эмбриона

Традиционным и наиболее частым подходом к оценке качества ооцитов и переносимого эмбриона является световая микроскопия [77, 78]. В первые сутки после оплодотворения оценивают количество и морфологию пронуклеусов, их взаимное расположение [79–81]. Наличие в яйцеклетке двух пронуклеусов и двух полярных тел указывает на нормальное развитие процесса оплодотворения.

На 2-е и 3-и сутки оценивают количество и размер бластомеров, их симметричность, наличие и степень фрагментации, наличие многоядерности бластомеров, а также состояние блестящей оболочки. По этим критериям эмбрионы подразделяются на 4 класса (А – эмбрион отличного качества; В – эмбрион хорошего качества; С – эмбрион с дефектами развития; D – эмбрион, не рекомендуемый для переноса). Эмбрион отличного качества на 2-е сутки развития состоит из 4 бластомеров, на 3-и сутки – из 7-8 бластомеров, имеет степень фрагментации менее 10 %, нормальную блестящую оболочку, бластомеры такого эмбриона симметричны, не имеют вакуолей и многоядерности [82].

На 4-е сутки оценивают степень компактизации морулы и ее морфологию [82, 83]. Признаками морулы хорошего качества считают протекание 4-й стадии дробления и вовлечение всех бластомеров в компактизацию [82]. На 5-6-е сутки оценивают морфологию бластоцисты (плотность упаковки и количество клеток внутренней клеточной массы, количество и размеры клеток трофэктодермы).

Степень зрелости бластоцисты обозначают цифрами [82]: 1-я степень – ранняя бластоциста, полость бластоцисты меньше половины объема эмбриона; 2-я степень – полная бластоциста, полость полностью занимает объем эмбриона; 3-я степень – расширенная бластоциста, полость бластоцисты становится больше и начинает истончаться блестящая оболочка; 4-я степень – бластоциста, совершающая или совершившая хетчинг.

Помимо оценки степени зрелости бластоцисты, на 5-е-6-е сутки проводят оценку внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы. ВКМ должна быть легко различима, выпуклой формы, состоять из большого количества клеток, компактно и плотно связанных вместе. Трофэктодерма должна состоять из большого количества плотно связанных эпителиоподобных клеток [82].

Не смотря на кажущуюся простоту данного подхода, морфологическая оценка эмбрионов связана с рядом трудностей. В первую очередь, она крайне зависит от опыта специалиста, проводящего оценку. Вариабельность оценки как между различными специалистами, так и при повторной оценке одним и тем же специалистом, крайне высока [84, 85].

Другой проблемой является недостаточное клиническое соответствие морфологического качества эмбриона и его имплантационного потенциала. С одной стороны, перенос эмбриона отличного качества не гарантирует наступления беременности. С другой стороны, даже ПЭ низкого морфологического качества может привести к наступлению беременности и рождению здорового ребенка. Кроме того, отсутствует прямая зависимость

между морфологическим качеством эмбриона и его хромосомным набором. Диагностика анеуплоидий при внешней, морфологической, оценке эмбриона, на сегодняшний день не представляется возможной.

Наконец, изменение скорости определенных этапов преимплантационного развития может остаться незамеченным при оценке морфологии в конкретный момент времени, что приводит к ошибочной оценке потенциала эмбриона. Таким образом, единичных наблюдений оказывается недостаточно для точной оценки, а более частые наблюдения невозможны в виду негативного влияния изменений окружающей среды при нахождении эмбриона вне инкубатора. В связи с этим, актуальным методом оценки качества эмбриона является морфокинетический анализ.

В основе морфокинетического анализа качества эмбриона лежит цейтраферная съемка (англ. time-lapse monitoring) – фотосъемка, при которой осуществляется многократное фотографирование одного и того же объекта с одной и той же точки съемки через равные промежутки времени, например, каждые 20 мин, каждые 5 мин или даже каждые 10 с. При традиционной микроскопии изображения могут быть получены не чаще, чем 1 раз в сутки, в результате чего исследователь получает информацию о морфологии эмбриона, но никак не о динамике процесса его развития. Системы морфокинетического анализа сконструированы таким образом, что позволяют наблюдать за эмбрионами внутри инкубатора в течение всего времени культивирования. Полученные в результате такого наблюдения серии снимков могут быть проанализированы с целью оценки качества эмбриона.

Преимущества цейтраферной микроскопии – возможность наблюдения за эмбрионами в оптимальных условиях культивирования. Изменения pH и температуры окружающей среды во время перемещения образцов из инкубатора на столик микроскопа и обратно для наблюдения могут негативно влиять на качество эмбриона. Отсутствие необходимости

перемещения эмбрионов снижает вероятность возникновения ошибок идентификации эмбрионов и облегчает анализ данных [86, 87]. Кроме того, имеется возможность интеграции систем цейтраферной съемки со специальным программным обеспечением, которое позволит не только автоматически анализировать и хранить полученные данные, но также моделировать и прогнозировать биологические процессы [87].

Большое количество исследований подтверждает, что использование систем цейтраферной съемки не оказывает влияния на количество эмбрионов высокого качества [88], потенциал их развития [89], формирование и жизнеспособность бластоцисты [90], частоту имплантации и наступления беременности [88, 89], а также профиль генетической экспрессии [91].

В ряде исследований авторы оценивали связь между наличием анеуплоидии и морфокинетическими показателями эмбрионов: продолжительностью первого, второго и третьего митотического делений, временем от оплодотворения до начала и до завершения бластуляции, что позволило выделить группу эмбрионов с низким развитием анеуплоидии [92–94]. В одной из подобных работ авторы сообщают об увеличении частоты живорождения при ПЭ с низким риском развития анеуплоидии более чем в 1,5 раза [94], однако другой авторский коллектив обращает внимание на недостатки проведенного исследования: недостаточный объем выборки и отсутствие учета кофакторов [95].

1.3.2. Оценка состава среды культивирования эмбриона

Не все зуплоидные эмбрионы оказываются способны к имплантации. ЧНБ при переносе зуплоидного (по данным ПГТ-А) эмбриона составляет от 60% до 70% [96, 97], что оставляет значительную возможность для применения других технологий, направленных на выявление эмбрионов с высоким потенциалом к имплантации. Одной из таких технологий является анализ метаболитов среды культивирования эмбрионов для выявления

индивидуальных биомаркеров или мультианалитических профилей, связанных с высоким потенциалом развития эмбриона [98, 99]. Преимуществом данного подхода является возможность неинвазивной оценки физиологии развивающегося эмбриона [100].

Несмотря на значительное число исследований в данной области, информации о «правильном» наборе метаболических путей, которые должны быть активны в развивающемся эмбрионе, на сегодняшний день крайне мало [98]. Основная проблема заключается в том, что метаболизм эмбрионов достаточно пластичен и адаптируется к различным условиям культивирования и составу культуральной среды [101, 102]. Возможно, наиболее важной детерминантой метаболического выхода является состав среды, используемой для поддержки эмбрионов в культуре, поскольку несколько исследований показали, что различия в культуральной среде могут существенно влиять на выводы экспериментов по оценке метаболизма эмбрионов [100–102].

Определение потребления глюкозы

На ранних этапах преимплантационного развития эмбрион потребляет пируват, лактат и аминокислоты, позднее – преимущественно глюкозу [100]. Как показали исследования, эмбрионы с более высоким поглощением глюкозы имеют повышенный имплантационный потенциал, по сравнению с эмбрионами с низким поглощением глюкозы [103–105]. Кроме того, при более подробном анализе было показано, что чрезмерное потребление глюкозы также является неблагоприятным прогностическим признаком. По всей видимости, такие эмбрионы утратили способность регулировать свой метаболизм, что привело к значительному ухудшению их жизнеспособности. Несмотря на обнадеживающие предварительные данные, рандомизированные исследования не подтвердили клинической эффективности данной методики [100, 106].

Определение потребления аминокислот

Аминокислоты играют важную роль в преимплантационном развитии эмбриона, служат источниками энергии, биосинтетическими предшественниками, буферами внутриклеточного рН, антиоксидантами и регуляторами клеточной дифференцировки [107–109]. Добавление заменимых и незаменимых аминокислот в культуральную среду значительно повышает скорость формирования бластоцисты [110, 111].

Для 2-3-дневных эмбрионов, развивающихся в дальнейшем до стадии бластоцисты, характерно более низкое поглощение глутамина, аргинина и метионина, а также более низкое выделение аланина и аспарагина, по сравнению с эмбрионами, не формирующими бластоцисту [112]. Снижение уровня глицина и лейцина, повышение содержания аспарагина и глутамата в среде культивирования связаны с повышением ЧНБ и частоты живорождения [112, 113].

Одним из наиболее интересных наблюдений было то, что эмбрионы с наибольшим потенциалом демонстрировали более низкие показатели метаболизма аминокислот. Это привело к появлению гипотезы «тихого эмбриона», которая постулировала, что увеличение метаболической активности отражает ответ на усиление внутриклеточного стресса [114, 115]. Однако другие исследования пришли к противоположному выводу и указали, что увеличение метаболической активности было связано с повышенной жизнеспособностью [104, 116]. Оказалось, что исследования, подтверждающие гипотезу «тихого эмбриона», были проведены с использованием 20% кислорода, тогда как исследования, противоречащие гипотезе, были проведены при более низких концентрациях кислорода [100]. Это указывает на то, что снижение скорости метаболизма аминокислот может обеспечить избирательное преимущество в среде с высокими концентрациями кислорода, но может нарушить жизнеспособность эмбриона

при культивировании с более физиологической (низкой) концентрацией кислорода [117].

К сожалению, как и в случае оценки поглощения глюкозы, оценка поглощения аминокислот может быть применена только в рамках исследовательских работ, поскольку отсутствуют рандомизированные исследования, подтверждающие клиническую эффективность данной методики [100]. Два заметных препятствия стоят на пути использования целевого метаболического профилирования для проспективной идентификации жизнеспособных эмбрионов в клинической практике. Во-первых, как описано ранее, способность эмбрионов адаптировать метаболизм в зависимости от состава культуральной среды и концентрации кислорода значительно затрудняет воспроизводимость результатов, полученных различными исследователями. Во-вторых, необходимо широкое внедрение в клиническую практику высокоточных аналитических инструментов, способных работать с малым объемом биологического материала [100, 118].

Комплексная оценка метаболического статуса эмбриона

Применение метаболомных подходов к выбору эмбриона для переноса стало возможным благодаря разработке новых технологий, включая спектроскопию комбинационного рассеяния, спектроскопию ядерного магнитного резонанса, ближнюю инфракрасную спектроскопию (БИКС) и масс-спектрометрию (МС). Эти аналитические инструменты позволяют одновременно идентифицировать и количественно определять тысячи различных метаболитов или создавать детальные спектры поглощения образцов среды культивирования эмбрионов [113, 119–121].

Наиболее изученным методом в данной области является БИКС. В ретроспективном исследовании Seli E. et al. (2010) на большой выборке эмбрионов авторы сгенерировали оценку жизнеспособности на основании метаболического профиля и подтвердили, что эмбрионы с индексом жизнеспособности $\geq 0,3$ имели более высокие шансы имплантации [122]. Это

исследование легло в основу множества проспективных рандомизированных клинических испытаний [123–125]. К сожалению, эти исследования не смогли продемонстрировать более высокую частоту живорождения в группе БИКС. Последующий метаанализ Vergouw C.G. et al. (2014) подтвердил, что БИКС не позволяет выбрать эмбрион для селективного переноса более точно, чем традиционная оценка морфологии [126].

Одной из причин этого является высокая восприимчивостью платформы БИКС к аналитическому «шуму», что затрудняет выявление тонких различий между эмбрионами с высоким и низким имплантационным потенциалом. Более перспективным методом оценки среды культивирования эмбриона является масс-спектрометрия [127]. Так, в исследовании Pes R.K. et al. (2019) авторы на основании данных масс-спектрометрии 136 образцов сред культивирования эмбрионов построили алгоритм предикции наступления беременности (PPV = 82,9%, $p = 0,0018$) [128]. Для проведения анализа авторы использовали всего 1 мкл среды культивирования эмбриона, а алгоритм был построен на основании девяти массовых пиков. Тем не менее, проспективные рандомизированные исследования, подтверждающие эффективность данной методики, на сегодняшний день отсутствуют [100].

Оценка содержания митохондриальной ДНК

Определение митохондриальной ДНК в среде культивирования эмбрионов человека является одновременно одним из наиболее простых и наименее изученных подходов. Одной из причин этого является невысокая чувствительность метода, связанная с низким содержанием свободной внеклеточной ДНК в малом объеме культуральной среды, наряду с высокой вероятностью контаминации образца [129].

Связь содержанием свободной митохондриальной ДНК в среде культивирования с показателями эмбрионального развития (клеточной фрагментацией на 2-е и 3-е сутки культивирования) была продемонстрирована Stigliani S. et al. (2013) [130]. Клеточная фрагментация

часто используется в качестве одного из морфологических параметров для оценки качества эмбрионов. Количество клеточных фрагментов считается важным морфологическим параметром для потенциала имплантации эмбрионов. Исследователи продемонстрировали, что низкое качество эмбрионов ассоциировано с более высоким общим содержанием ДНК в среде культивирования эмбрионов, а уровень фрагментации более 5% связан как с более высоким общим содержанием ДНК, так и с повышением соотношения митохондриальной к геномной ДНК [130].

В свою очередь, Hashimoto S. et al. (2017) показали, что содержание митохондриальной ДНК в клетках эмбриона прогрессивно снижается в процессе его развития от $2,1 \times 10^5$ в ооците до $3,2 \times 10^2$ в клетках бластоцисты [131]. Кроме того, уровень митохондриальной ДНК был выше в клетках трофэктодермы, что было связано с более высоким уровнем аэробной активности митохондрий, по сравнению с клетками внутренней клеточной массы [131].

Fragouli E. et al. (2017) в своём исследовании проанализировали содержание митохондриальной ДНК в клетках трофэктодермы эмбрионов в рамках проведения программы ВРТ с ПГТ-А [132]. Согласно полученным данным, ЧНБ при переносе эуплоидных бластоцист отличного качества с нормальным или низким уровнем митохондриальной ДНК составила 64% (121/190), при переносе таких же эмбрионов с аномально высоким уровнем митохондриальной ДНК – 0% (0/9), $p < 0,001$. Таким образом, высокий уровень митохондриальной ДНК в клетках трофэктодермы был ассоциирован с крайне низким имплантационным потенциалом эмбриона [132]. В похожем исследовании Victor A.R. et al. (2017) были получены несколько отличающиеся результаты [133]. Соотношение митохондриальной ДНК не различалось в зависимости от наличия хромосомной патологии эмбриона и его имплантационного потенциала, однако различия в дизайне исследований значительно затрудняют сравнение их результатов [133].

Так или иначе, наибольший интерес представляет определение митохондриальной и геномной ДНК в среде культивирования эмбрионов, а не в клетках трофэктодермы, поскольку данный метод является неинвазивным. Stigliani S. et al. (2014) в своем исследовании проанализировали среды культивирования 669 эмбрионов третьих суток развития и показали, что эмбрионы, оказавшиеся способными к формированию бластоцисты, имели более высокое соотношение митохондриальной и геномной ДНК в среде культивирования, чем эмбрионы, не сформировавшие впоследствии бластоцисту [134]. Более того, эмбрионы хорошего качества с высоким соотношением митохондриальной и геномной ДНК имплантировались значительно чаще, чем эмбрионы с низким соотношением ($p = 0,0452$) [134].

Таким образом, несмотря на большое количество существующих инвазивных и неинвазивных методик оценки имплантационного потенциала развивающихся эмбрионов человека, их внедрение в рутинную клиническую практику требует проведения дальнейших исследований.

1.4. Влияние микровибрации на качество эмбрионов человека при культивировании *in vitro* и исходы программ ВРТ

1.4.1. Контролируемая механическая микровибрация

Впервые использование механической агитации ооцитов было предложено в Испании в 1998 году для созревания *in vitro* (IVM) ооцитов свиньи [135]. Культивирование ооцитов проводили на механической платформе, обеспечивающей мягкое перемешивание культуральной среды. К сожалению, небольшой объем выборки и недостаточность методической базы не позволили сделать однозначных выводов по данной методике [135].

Следующая поисковая работа была также выполнена с использованием эмбрионов свиньи в 2010 году [136]. В данной работе были определены

оптимальные временные параметры микровибрации, что послужило существенным толчком для исследований в данной области. Высокий процент бластуляции был достигнут при продолжительности микровибрации 5 и 10 секунд ($27,1\% \pm 3,5\%$ и $25,8\% \pm 1,8\%$, соответственно, по сравнению с $15,7\% \pm 1,9\%$ в контрольной группе). При этом повышение времени микровибрации до 30 секунд приводило к значительному снижению частоты бластуляции ($9,0\% \pm 2,0\%$) [136]. Эти результаты легли в основу планирования многих дальнейших работ по изучению влияния КММВ на эмбрионы человека [137].

Одной из систем культивирования с применением вибрации является система культивирования со встряхиванием (англ. – *tilting embryo culture system*). В исследовании Matsuura K. et al. (2010), при культивировании эмбрионов человека была применена следующая схема встряхивания. Плашка с эмбрионом в 20 мкл культуральной среды находилась на динамической платформе, которая совершала наклоны по одной оси с амплитудой 20° (от -10° до $+10^\circ$) каждые 10 минут со скоростью наклона $1^\circ/\text{с}$ [6]. Было показано положительное влияние этой системы культивирования на человеческие эмбрионы, что проявлялось ускорением деления эмбрионов и повышением числа эмбрионов, способных к формированию бластоцисты, по сравнению с группой контроля [6]. Однако в исследовании не было изучено влияние применения вышеуказанной системы культивирования на ЧНБ и частоту живорождения в программах ВРТ.

В исследовании Isachenko E. et al. (2010) было проанализировано влияние микровибрации не только на преимплантационное развитие эмбриона, но и на ЧНБ при переносе эмбрионов (ПЭ) в программах ВРТ [1]. В работе была использована микровибрация с частотой 20 Гц и продолжительностью 5 секунд с интервалом покоя 1 час. Частота вибрации и временные интервалы были выбраны на основании исследования, проведенного японскими авторами с использованием животной модели:

свиных эмбрионов, полученных при переносе ядра соматической клетки в ооцит стадии метафазы II. Исследователи показали, что механическая активация ооцитов/эмбрионов с использованием микровибрации по 5 секунд с интервалом покоя 30 или 60 минут или по 10 секунд с интервалом покоя 60 минут приводит к значимому увеличению частоты формирования бластоцисты по сравнению с группой контроля [136]. По данным Isachenko E. et al. (2010), применение нового способа культивирования эмбрионов приводило к увеличению числа эмбрионов отличного и хорошего качества при оценке на 2-е и 3-и сутки культивирования (на 14% и 22%, соответственно), повышению вероятности успешного формирования бластоцисты на 18% и снижению вероятности остановки эмбриона в развитии. Кроме того, применение системы культивирования с использованием микровибрации позволило повысить вероятность наступления беременности с 50% до 80% и с 36% до 73% при ПЭ 3-х и 5-х суток культивирования, соответственно [1].

В другом исследовании авторы использовали прибор, позволяющий осуществлять микровибрацию одновременно по трем осям с различным ускорением и частотой 42,4 Гц по 5 секунд с интервалом покоя 60 минут. В исследование были включены как мышинные, так и человеческие эмбрионы, полученные путем оплодотворения ооцитов пациенток с «бедным» овариальным ответом. Оказалось, что применение систем культивирования с использованием микровибрации значительно улучшает качество мышинных эмбрионов, в то время как качество эмбрионов человека изменяется незначительно [138]. Это может быть связано с меньшей чувствительностью эмбрионов человека к физическому воздействию из-за большей толщины блестящей оболочки [139]. Однако ЧНБ была значимо выше в группе применения микровибрации по сравнению с группой контроля (21,1% по сравнению с 11,3%), что свидетельствует о положительном влиянии

микровибрации на потенциал развития эмбрионов человека в программах ВРТ [138].

По данным исследований Isachenko V. et al. (2017), выполненных на большой выборке, применение микровибрации с частотой 44 Гц по 5 секунд с интервалом покоя 60 минут в программах ВРТ способствует повышению частоты живорождения у пациенток 30 лет и старше [7]. В возрастной группе 30 – 34 года ЧНБ составила 44% в группе микровибрации и 36% в контрольной группе, частота рождения живого ребенка – 37% в группе микровибрации и 28% в контрольной группе. В возрастной группе 35 – 39 лет ЧНБ составила 35% и 34%, соответственно, однако частота рождения живого ребенка различалась и составила 29% и 23%, соответственно. У пациенток 40 лет и старше ЧНБ была в 2 раза выше в группе микровибрации – 32% против 16%, частота рождения живого ребенка составила 15% и 9%, соответственно.

При этом, применение систем культивирования с использованием микровибрации не улучшает исходы программ ВРТ у пациенток младше 30 лет – ЧНБ была выше в группе микровибрации (51% против 30%, соответственно), однако частота рождения живого ребенка составила только 31% в группе микровибрации и 30% в контрольной группе. Значимым ограничением этого исследования является перенос 2-х или 3-х эмбрионов в обеих группах [7]. Известно, что перенос более чем одного эмбриона не приводит к улучшению исходов программ ВРТ, но сопровождается повышением числа осложнений беременности и родоразрешения, что связано с развитием многоплодной беременности [140, 141].

Учитывая вышесказанное, необходимо проведение дальнейших исследований применения системы культивирования эмбрионов с микровибрацией с селективным переносом одного эмбриона отличного качества в полость матки.

1.4.2. Звуковая вибрация

Во всех вышеупомянутых работах авторы изучали влияние КММВ на качество эмбрионов человека, однако другие возможные источники вибрации не были рассмотрены. В литературе имеется ряд публикаций, подтверждающих влияние звуковой вибрации на рост клеток, их митотическую активность и репликацию ДНК [142–144]. Коллектив авторов Teijon M.L. et al. (2015) предложил использовать звуковую вибрацию в качестве средства улучшения качества эмбрионов человека при культивировании *in vitro* [145].

Перед оплодотворением 967 ооцитов, полученные от 114 пациенток, были рандомизированы в две группы. Ооциты и эмбрионы первой группы культивировали в условиях звуковой вибрации (постоянного звучания музыки), ооциты и эмбрионы второй группы – в стандартных условиях. Исследователи оценивали уровень оплодотворения ооцитов и качество полученных эмбрионов на вторые сутки культивирования [145].

Согласно полученным данным, культивирование ооцитов и эмбрионов в условиях звуковой вибрации (музыки) позволяет значительно увеличить частоту успешного оплодотворения ооцитов (с 77,8% до 81,1%). Однако в исследовании не было выявлено различий при оценке качества эмбрионов на вторые сутки культивирования. Тип музыки (поп-музыка, рок, классическая музыка) также не оказывал влияния на уровень оплодотворения ооцитов и качество эмбрионов. Полученные данные, по мнению авторов исследования, свидетельствуют о возможности использования вибрации, создаваемой при проигрывании музыки, для улучшения исходов программ ВРТ при культивировании ооцитов и эмбрионов человека *in vitro*, а также о необходимости дальнейших исследований в этой области с определением влияния звуковой вибрации на качество эмбрионов на пятые сутки культивирования [145].

1.4.3. Со-культивирование эмбрионов человека в условиях микровибрации

Существуют два принципиально различных подхода к со-культивированию эмбрионов в программах ВРТ. Первый подход – групповое культивирование эмбрионов, второй – со-культивирование эмбриона человека с клетками не эмбрионального происхождения. Положительные эффекты со-культивирования могут быть объяснены кумуляцией факторов роста (EGF, TGF β), продуцируемых, соответственно, самим эмбрионом или клетками, выбранными для со-культивирования [146].

Эффективность группового культивирования эмбрионов в условиях микровибрации была изучена в ретроспективном исследовании El-Danasourî I. et al. (2014) [147]. Эмбрионы культивировали в условиях микровибрации по трем осям с частотой 56 Гц по 5 секунд с интервалом покоя 60 минут. Групповое культивирование эмбрионов в указанных условиях привело к значимому увеличению частоты имплантации эмбрионов, а также к увеличению частоты наступления клинической беременности, хотя и не статистически значимого, по сравнению с группой контроля. Недостатком исследования является одновременное изучение влияния группового культивирования и микровибрации на эффективность программ ВРТ, что не позволяет сделать вывода о вкладе каждого из этих факторов в продемонстрированный результат [147].

В другом исследовании было изучено со-культивирования эмбрионов с клетками кумулюса у пациенток с «бедным» овариальным ответом в условиях микровибрации с частотой 42 Гц по 5 секунд с интервалом покоя 60 минут [148]. Большиншей части пациенток было перенесено два эмбриона. Качество эмбрионов в группе со-культивирования в условиях микровибрации было лучше, чем в группе культивирования в условиях микровибрации и в контрольной группе. Частота наступления клинической беременности была выше в обеих группах сравнения (24,2% в группе

микровибрации с со-культивированием и 23,1% в группе микровибрации без со-культивирования) по сравнению с контрольной группой (18,1%). Таким образом, со-культивирование эмбрионов с клетками кумулюса приводило к значимому улучшению качества эмбрионов у пациенток с «бедным» овариальным ответом, но не сопровождалось значимым увеличением ЧНБ при переносе 2-х и более эмбрионов [148].

Использование систем культивирования с применением микровибрации является новым подходом к культивированию эмбрионов в программах ВРТ. Применение микровибрации позволяет улучшить качество эмбрионов и исходы программ ВРТ, особенно у пациенток старше 30 лет и у пациенток с «бедным» овариальным ответом [7, 138, 148]. Однако четкие показания к применению культивирования в условиях микровибрации до сих пор не определены. Кроме того, нет однозначного мнения об оптимальной частоте и длительности микровибрации. Для определения эффективности применения микровибрации при селективном переносе одного эмбриона необходимы дальнейшие исследования.

1.4.4. Созревание ооцитов *in vitro* (IVM) в условиях микровибрации

Созревание ооцитов *in vitro* (IVM) уже вошло в клиническую практику врачей-репродуктологов [149]. У пациенток высокого риска IVM может снизить риск развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) и побочных эффектов, связанных со стимуляцией гонадотропинами [150]. Пациенты с СПКЯ, у которых риск развития СГЯ высокий, долгое время были основной группой для лечения применением IVM [151, 152]. Тем не менее, слабый потенциал развития ооцитов стадии зародышевого пузырька (англ. *GV – germinal vesicle*) все еще является существенной проблемой данной технологии [153, 154].

При IVM незрелые ооциты переходят из стадии *GV* в метафазу II (MII) мейоза. Затем ооциты подвергаются оплодотворению и используются для

проведения стандартной программы ЭКО. Влиянии условий культивирования ооцитов и эмбрионов при IVМ изучается во многих исследованиях, однако оптимальные физические условия культивирования *in vitro* изучены недостаточно [16, 153, 155].

Seong-Ho Yang et al. (2019) в своем исследовании провели попытку оценить влияние системы культивирования с микровибраций на потенциал развития ооцитов человека GV-стадии развития, полученных в рамках программы IVМ, у пациенток с СПКЯ [156]. У всех пациенток для получения ооцитов был использован прайминг с хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ). Все пациентки, вошедшие в исследование, были разделены на 4 группы:

- SS (статическая система при IVМ и дальнейшем культивировании);
- SV (статическая система при IVМ, система с микровибрацией при дальнейшем культивировании);
- VS (система с микровибрацией при IVМ, статическая система при дальнейшем культивировании);
- VV (система с микровибрацией при IVМ и дальнейшем культивировании).

При IVМ была использована микровибрация частотой 26,3 ГЦ – по 5 секунд через 60 минут. При дальнейшем культивировании – микровибрация частотой 41,2 ГЦ – по 5 секунд через 1 час. В исследовании не было выявлено разницы в частоте успешного ооцитов и частоте успешного оплодотворения. Тем не менее, доля эмбрионов хорошего качества была несколько выше в группе VV (32,0%), по сравнению с группой SS (23,8%). Значимых различий при сравнении с группами SV (28,6%) и VS (25,9%) выявлено не было [156].

ЧНБ и частота рождения живого ребенка была несколько выше в группах SV и VS, по сравнению с группой SS. Что более важно, оба показателя оказались значимо выше в группе VV, по сравнению с группой

SS. ЧНБ составила 41,5% и 23,2%, соответственно. Частота рождения живого ребенка – 30,2% и 14,3%, соответственно [156].

Таким образом, применение КММВ позволяет значительно повысить эффективность лечения бесплодия. Изучение влияния КММВ на исходы программ ВРТ является важной и актуальной задачей современной биомедицины в области репродукции человека, особенно в подгруппах пациенток с заведомо сниженным потенциалом эмбрионов к развитию и имплантации. Тем не менее, малое число проведенных исследований диктует необходимость дальнейшего изучения данной методики на больших выборках пациенток.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материал исследования

Исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (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 по август 2020 года в исследование были включены 923 пары, обратившиеся для лечения бесплодия методами ВРТ. Все пациенты подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. На проведение исследования было получено разрешение комиссии по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

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 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.

На первом этапе работы были проанализированы клиничко-лабораторные данные пациентов, влияющие на эффективность программ ВРТ. На втором этапе оценивались и сравнивались эмбриологические параметры в 2-х группах. На третьем этапе была оценена ЧНБ, и частота живорождения в двух группах и подгруппах пациентов с учетом клиничко-лабораторных и эмбриологических параметров. На четвертом этапе было проведено исследование метаболического статуса эмбрионов с учетом их морфологически характеристик, наличия микровибрации и наступления беременности.

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.

Проводили оценку следующих клинико-лабораторных показателей, влияющих на ЧНБ в программах ВРТ:

- возраст;
- ИМТ;
- овариальный резерв: количество антральных фолликулов (КАФ), уровень антимюллера гормона (АМГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ);
- продолжительность бесплодия;
- наличие и число программ ВРТ в анамнезе;
- гинекологические заболевания в анамнезе;
- соматические заболевания в анамнезе;
- тип и особенности протокола овариальной стимуляции;
- параметры спермограммы;

- число полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), число зрелых ооцитов (МII), число успешно оплодотворившихся ооцитов (2pn), число и качество бластоцист на 5-е сутки культивирования, число криоконсервированных эмбрионов.

Оценивали следующие исходы программ ВРТ:

- частота биохимической беременности (на основании определения сывороточной концентрации β -субъединицы ХГЧ (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.

Расчет объема выборки был произведен с помощью программы STATISTICA 10 (США). Согласно проведенному анализу, для достижения уровня значимости (А) 5% и мощности исследования (В) 90%, с целью выявления разницы ЧНБ в 10% (согласно литературным данным) необходимо включить в исследование не менее 800 супружеских пар [138].

2.2. Методы исследования

Полное клинико-лабораторное обследование проведено в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации №107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Обязательные исследования для обоих супругов включали:

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

- микроскопическое исследование отделяемого половых органов на аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, на грибы рода *Candida*, на атрофозоиты трихомонад;
- исследование соскоба из цервикального канала на хламидии, микоплазму и уреоплазму методом ПЦР;
- исследование соскоба из цервикального канала на вирус простого герпеса 1, 2, цитомегаловирус методом ПЦР;
- определение кариотипа супругов, медико-генетическое консультирование.

Обязательные исследования для женщин включали:

- общеклинический анализ крови;
- биохимический анализ крови;
- гемостазиограмму;
- определение групповой и резус-принадлежности крови;
- общий анализ мочи;
- количественный анализ антител класса М, G к вирусу краснухи в сыворотке крови;
- цитологическое исследование соскоба эндоцервикса и экзоцервикса;
- УЗИ органов малого таза на 5-8 день менструального цикла;
- флюорографию;
- электрокардиографию;
- консультацию терапевта;
- УЗИ молочных желез (пациенткам до 35 лет) или маммографию (пациенткам 35 лет и старше);
- УЗИ щитовидной железы;
- гормональный профиль (на 2-3 день менструального цикла): АМГ, ЛГ, ФСГ, Е2, ТТГ, свободный тироксин (Т₄_{св}), дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭАС), пролактин, кортизол, тестостерон (Т).

Обязательное исследование для мужчин – анализ эякулята (спермограмма).

Исследования по показаниям включали:

- исследование состояние матки, оценка проходимости маточных труб (гистеросальпингография (ГСГ), ЭХО-гистеросальпингоскопия (ЭХО-ГСС), гистероскопия и лапароскопия);
- консультации смежных (профильных) специалистов (невролога, эндокринолога, уролога).

Специальные методы исследования включали метаболомное профилирование культуральной среды 5-дневных эмбрионов.

2.2.1. Общеклинические методы исследования

У всех пациенток, включенных в исследование, был проведен сбор и анализ данных соматического и акушерско-гинекологического анамнеза. На первом этапе измеряли рост и массу тела пациентки, определяли ИМТ, оценивали тип телосложения, измеряли артериальное давление и пульс, проводили пальпацию молочных желез. Изучали акушерско-гинекологический анамнез: особенности менструальной функция, число родов в анамнезе с учетом срока и способа родоразрешения, наличие в анамнезе прерываний беременности – самопроизвольных и искусственных, особенности течения предыдущих беременностей и родов.

Фиксировали наличие в анамнезе гинекологических заболеваний и операций на органах малого таза. Оценивали перенесенные инфекционные заболевания, хронические и соматические заболевания, иные оперативные вмешательства и травмы в анамнезе. Уточняли данные о продолжительности бесплодия, о наличии в анамнезе лечебных и диагностических мероприятий, включая проведение программ ВРТ и их особенности (тип протокола контролируемой овариальной стимуляции, применяемые препараты и их

дозировки, число полученных ооцитов и эмбрионов, их качество, исход программы).

При гинекологическом исследовании проводили осмотр наружных половых органов, влагалища и шейки матки. При бимануальном исследовании определяли форму, размеры, подвижность и консистенцию тела матки, оценивали наличие болезненности при пальпации, а также – наличие опухолевидных образований в области придатков матки.

2.2.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза

УЗИ органов малого таза выполнялось в отделении функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (заведующий – профессор А.И. Гус). Оценивали форму и размер тела матки, толщину и структурные особенности эндометрия, объем яичников, количество антральных фолликулов, наличие или отсутствие объемных образований в полости малого таза.

Ультразвуковой мониторинг фолликулогенеза и роста эндометрия проводили на 2-3 день менструального цикла (в день начала овариальной стимуляции), на 6-й день овариальной стимуляции и затем – каждые 2-3 дня до назначения триггера овуляции. В зависимости от динамики фолликулогенеза проводили определение дня назначения аГнРГ и триггера овуляции, корректировку дозировки гонадотропинов – при необходимости. В дальнейшем УЗИ органов малого таза выполняли на 21-й день после ПЭ в полость матки при наличии положительного результата β -ХГЧ с целью определения плодного яйца в полости матки и через 5-6 недель после ПЭ в полость матки с целью визуализации сердцебиения эмбриона.

2.2.3. Гормональное обследование

Гормональное обследование проводили с целью оценки овариального резерва и функционального состояния эндокринной системы на 2-5 дни менструального цикла, предшествующего циклу овариальной стимуляции. Определение гормонального профиля крови пациенток проведено в клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (заведующий – д.м.н. Т.Ю. Иванец). Использовали радио иммунологический метод определения концентрации гормонов в сыворотке крови (тест-системы «Hoffmann La Roche, Ltd.» Швейцария): лютеинизирующий гормон (ЛГ), ФСГ, эстрадиол (Е2), тиреотропный гормон (ТТГ), тироксин (Т₄_{св}), дигидроэпиандростерон (ДГЭАС), пролактин, кортизол, тестостерон (Т), АМГ.

2.2.4. Исследование эякулята

Анализ эякулята (спермограмма) всем пациентам перед вступлением в программу ВРТ проводил эмбриолог. Эякулят собирали в стерильный пластмассовый контейнер для сбора эякулята путем мастурбации после 3-4 дней полового воздержания. Оценивали объем эякулята, цвет, время разжижения и вязкость эякулята, рН, а также следующие клеточные характеристики: концентрацию и подвижность сперматозоидов, морфологические изменения сперматозоидов, число лейкоцитов, наличие незрелых клеток сперматогенеза.

Для оценки патологии эякулята руководствовались следующими критериями:

- 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%).

2.2.5. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов

Овариальную стимуляцию проводили по протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) препаратами рекомбинантного ФСГ (рФСГ) или человеческого менопаузального гонадотропина (чМГ). Для определения стартовой дозы препарата учитывали возраст пациентки, анамнез хирургических вмешательств на яичниках, данные гормонального обследования и ЧАФ по данным УЗИ. Коррекцию дозировки гонадотропинов проводили при необходимости с учетом динамики фолликулогенеза по данным УЗ-мониторинга.

Введение экзогенных гонадотропинов начинали со 2-3 дня менструального цикла. Введение ант-ГнРГ с целью профилактики преждевременного пика ЛГ начинали при достижении лидирующим фолликулом диаметра 14 мм и проводили ежедневно до дня введения триггера овуляции (включительно). Триггер овуляции вводили при достижении лидирующими фолликулами диаметра 19 мм. В качестве триггера овуляции использовали ХГЧ (8 000 – 10 000 МЕ, однократно) или комбинацию ХГЧ с аГнРГ.

Трансвагинальную пункция фолликулов под ультразвуковым контролем проводили через 36 часов после введения триггера овуляции. Пункцию проводили в малой операционной с применением кратковременного внутривенного обезболивания. Для пункции использовали одноразовые однопросветные пункционные иглы.

2.2.6. Морфологическая оценка ооцитов и оплодотворение

Просмотр аспирированной фолликулярной жидкости осуществлял эмбриолог под контролем стереомикроскопа. После подсчета числа полученных ОКК эмбриолог проводил отмывку ооцитов от фолликулярной жидкости и крови, затем ОКК помещали в стерильные планшеты с культуральной средой и инкубировали в течение 2-3 часов.

После предварительной инкубации производили денудирование ооцитов (удаление клеток кумулюса) – ОКК инкубировали 20 секунд в растворе гиалуронидазы, отмывали в буферной среде и инкубировали 30 минут в исходной культуральной среде, затем механически удаляли оставшиеся клетки кумулюса. После денудирования ооцитов оценивали их степень зрелости:

- если в цитоплазме клетки визуализируется ядро и отсутствует полярное тельце, ооцит находится на стадии зародышевого пузырька (GV-germinal vesicle), что соответствует профазе первого деления мейоза;
- если в цитоплазме клетки отсутствует ядро и полярное тельце, ооцит находится на стадии метафазы первого деления мейоза (M1);
- если полярное тельце визуализируется в перивителлиновом пространстве, ооцит находится на стадии второго деления мейоза (MII).

Одновременно с денудированием ооцитов проводили центрифугирование, флотирование и обработку эякулята супруга. 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. Нормальное оплодотворение регистрировали при наличии в цитоплазме двух симметричных по размеру пронуклеусов через 16-18 часов после оплодотворения. Аномальное оплодотворение регистрировали при наличии одного или трех и более пронуклеусов. Если визуализировать пронуклеусы не удавалось, ооцит считали не оплодотворившимся.

Культивирование эмбрионов проводили в средах культивирования COOK (Австралия).

2.2.7. Культивирование и морфологическая оценка эмбрионов

При культивировании в условиях механической микровибрации инкубатор помещали на платформу ArisTT180-s (K&S Advanced Systems Ltd, Израиль) 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 СК и криоконсервировали при -80°C . Оценку реальной частоты и амплитуды микровибрации проводили при помощи встроенного осциллографа.

Морфологическая оценка эмбрионов проводилась через 120-122 часа (на 5-е сутки) культивирования. Учитывались морфологические характеристики эмбрионов по классификации Гарднера (степень зрелости бластоцист, качество ТЭ и ВКМ [157]).

Степень зрелости бластоцисты классифицировалась следующим образом:

1. ранняя бластоциста – полость бластоцисты занимает менее половины объема эмбриона;
2. полость бластоцисты больше половины объема эмбриона;
3. полная бластоциста – полость занимает весь объем эмбриона;
4. расширенная бластоциста – полость бластоцисты становится больше, начинается истончение блестящей оболочки;
5. трофэктодерма начинает проникать через блестящую оболочку;
6. бластоциста покинула блестящую оболочку.

ВКМ классифицировалась следующим образом:

- A. плотная упаковка большого числа клеток легко визуализируемой ВКМ;

- В. свободная упаковка среднего числа клеток легко визуализируемой ВКМ;
- С. незначительное число клеток ВКМ.

Трофэктодерма классифицировался следующим образом:

- А. большое число клеток формируют единый эпителиальный слой;
- В. небольшое число клеток формируют неплотный эпителиальный слой;
- С. незначительное число клеток.

2.2.8. Метаболомное профилирование

Экстракция метаболитов проводилась путем добавления трёх объемов метанола к одному объему среды культивирования (СК). Затем смесь вортиксовали, центрифугировали при 14000 g, надосадок использовали для анализа. Для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) в хроматографические флаконы со стеклянными вставками отбирали 20 мкл экстракта каждого образца. Разделение проб проводили на колонке Atlantis T3 C18 диаметром 1 мм, длиной 150 мм и размером частиц 3 мкм (Waters, США) в хроматографической системе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Scientific, США).

Элюирование компонентов образцов проводили в градиенте подвижной фазы «В» (Ацетонитрил с добавлением 0,1% муравьиной кислоты по объему): 5% в течение первых 11 минут, затем градиент 5-95% фазы «В» в течение 10 минут, затем промывка в течение 5 минут при 95% фазы «В» затем возврат 95-5% фазы «В» в течение 1 минуты, с последующим уравниванием колонки в течение 3 минут при концентрации фазы «В» 5%. Скорость потока была равна 40 мкл/мин, общее время хроматографии одного образца составило 30 минут. Детекция метаболитов проводилась на гибридном масс-спектрометре Bruker Maxis Impact (Bruker Daltonics, Германия), со следующими параметрами: напряжение на капилляре — 4100

В, давление небулайзера 0.4 бар, осушающий газ – 4 л/мин при температуре 180 С, масс – 100-1500 m/z.

Детекцию пиков и дальнейшую обработку масс-спектров проводили программным пакетом XCMS со следующими параметрами: алгоритм детекции пиков «Centwave» со временем выхода пиков от 10 до 45 с и точностью 15 ppm; алгоритм группировки пиков «Matched filter» [158].

Для статистического анализа полученных данных использовалась платформа MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca) [159]. Для многомерного статистического анализа использовался метод ортогональных частичных наименьших квадратов с дискриминантным анализом (OPLS-DA) [160]. Для одномерного анализа использовался t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считались различия с уровнем $p < 0,05$ и разницей сигналов (интегрированная площадь пика) минимум в два раза. Для первичной идентификации отобранных таким образом молекулярных ионов была использована база данных метаболитов человека – Human metabolome database (HMDB, www.hmdb.ca) с допустимой погрешностью m/z в 15 ppm [161].

2.2.9. Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода

ПЭ в полость матки осуществляли на 5-е сутки культивирования при помощи «мягкого» катетера Wallace (Германия) или Cook (Австралия). В полость матки переносили один или два эмбриона лучшего морфологического качества. Поддержку посттрансферного периода индуцированного цикла проводили путем вагинального введения микронизированного прогестерона в дозировке 600 мг в день.

С целью определения наступления беременности проводили определение уровня β -ХГЧ в сыворотке крови пациентки через 14 дней после проведения ПЭ в полость матки. Тест на беременность считали

положительным, если уровень β -ХГЧ превышал 20 МЕ/л. Через 21 день после ПЭ при визуализации плодного яйца в полости матки по данным УЗИ регистрировали клиническую беременность.

2.3. Методы статистической обработки данных

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). Для определения нормальности распределения использовали обобщённый тест Д'Агостино-Пирсона. При анализе параметрических данных рассчитывали среднее значение и среднеквадратичное отклонение, использовали t-test. При анализе непараметрических данных – медиану и интерквартильный размах, использовали тест Манна-Уитни. При анализе качественных данных использовали точный тест Фишера. При проведении ROC-анализа рассчитывали порог отсечки, площадь под ROC-кривой (AUC), отношение шансов наступления беременности ($ОШ_{БЕР}$). Для выявления корреляции между признаками определяли коэффициент корреляции Спирмена. При модуле коэффициента корреляции от 0 до 0,29 связь расценивали как слабую, от 0,3 до 0,69 – как среднюю, от 0,7 до 1 – как сильную. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Клинико-анамнестическая характеристика пациенток, включенных в исследование

Пациентки группы микровибрации (n=166) не отличались от пациенток группы сравнения (n=757) по возрасту и антропометрическим характеристикам (табл. 3.1.1). Средний возраст пациенток составил 34 (31 – 39) года в группе 1 и 35 (31 – 39) лет в группе 2 (p = 0,689). Средний возраст супруга – 35 (33 – 40) лет в группе 1 и 35 (32 – 41) лет в группе 2 (p = 0,953). Антропометрические характеристики пациенток, включенных в исследование, также не различались в группах сравнения. Средний рост пациенток составил $165,4 \pm 7,9$ см в группе микровибрации и $166,2 \pm 5,5$ см в группе сравнения. Средняя масса тела – $63,6 \pm 11,1$ и $64,5 \pm 12,7$ кг, соответственно (p = 0,673). Индекс массы тела (ИМТ) – $23,2 \pm 3,8$ и $23,3 \pm 4,3$ кг/м², соответственно (p = 0,876). Наличие вредных привычек (курение) отмечено у 7 (4,2%) пациенток группы 1 и 34 (4,5%) пациенток группы 2 (p = 0,537).

Таблица 3.1.1. Антропометрическая характеристика пациенток, включенных в исследование

Параметр	Группа 1 (n = 166)	Группа 2 (n = 757)	p-value
Возраст, лет	34 (31 – 39)	35 (31 – 39)	0,689**
Возраст супруга, лет	35 (33 – 40)	35 (32 – 41)	0,953**
Рост, см	$165,4 \pm 7,9$	$166,2 \pm 5,5$	0,485*
Масса тела, кг	$63,6 \pm 11,1$	$64,5 \pm 12,7$	0,673*
ИМТ, кг/м ²	$23,2 \pm 3,8$	$23,3 \pm 4,3$	0,876*

* t-test; ** тест Манна-Уитни.

Не было выявлено особенностей менструального цикла пациенток (возраст менархе, длительность менструального цикла, длительность менструации, регулярность цикла, наличие дисменореи) группы микровибрации по сравнению с группой сравнения (табл. 3.1.2). Разницы возраста начала половой жизни также не было выявлено.

Таблица 3.1.2. Особенности менструального цикла и сексуальной функции пациенток, включенных в исследование

Параметр	Группа 1 (n = 166)	Группа 2 (n = 757)	p-value
Возраст менархе, лет	13 (12 – 14)	13 (12 – 14)	0,916**
Длительности цикла, дней	5 (4 – 5)	5 (4 – 5)	0,472**
Длительность менструации, дней	28 (27 – 29)	28 (27 – 29)	0,481**
Нерегулярные менструации	8 (4,8%)	46 (6,1%)	0,340***
Болезненные менструации	23 (13,9%)	95 (12,6%)	0,365***
Возраст начала половой жизни, лет	18 (17 – 20)	18 (17 – 20)	0,918**

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

При анализе репродуктивного анамнеза значимых различий между группами выявлено не было. Беременности в анамнезе (вторичное бесплодие) были у 83 (50,0%) пациенток группы микровибрации и у 373 (49,3%) пациенток группы сравнения ($p = 0,467$). Из них роды были в анамнезе у 28 (16,9%) пациенток группы микровибрации и 151 (20,0%) пациентки группы сравнения ($p = 0,213$). Аборты – у 32 (19,3%) и 141 (18,6%) пациентки, соответственно ($p = 0,460$). Внематочные беременности – у 28 (16,9%) и 105 (13,9%) пациенток, соответственно ($p = 0,190$). Неразвивающиеся беременности – у 27 (16,3%) и 154 (20,3%) пациенток, соответственно ($p = 0,137$).

Для 88 (53,0%) пациенток группы 1 и 415 (54,8%) пациенток группы 2 данная попытка ВРТ была первой ($p = 0,367$). Среднее число попыток ВРТ в анамнезе составило 0 (0 – 1) в обеих группах ($p = 0,456$). Средняя продолжительность бесплодия – 5 (3 – 7) лет в обеих группах ($p = 0,297$).

Особенности овариальной стимуляции у пациенток обеих групп представлены в таблице 3.1.3. Не было выявлено значимых отличий в обеих группах пациенток.

Таблица 3.1.3. Особенности протокола овариальной стимуляции

Параметр	Группа 1 (n = 166)	Группа 2 (n = 757)	p-value
Овариальная стимуляция			
рФСГ, %	46 (27,7%)	206 (27,2%)	0,483***
рФСГ, МЕ	1282 ± 350	1344 ± 424	0,406*
чМГ, %	42 (25,3%)	190 (25,1%)	0,514***
чМГ, МЕ	1596 ± 391	1609 ± 566	0,881*
рФСГ+чМГ, %	61 (36,8%)	299 (39,5%)	0,285***
рФСГ+чМГ, МЕ	2025 ± 582	2014 ± 588	0,910*
Кориолитропин альфа, %	17 (10,2%)	62 (8,2%)	0,237***
Триггер овуляции			
ХГЧ, %	119 (71,7%)	574 (75,8%)	0,155***
ХГЧ+Трипторелин, %	47 (28,3%)	183 (24,2%)	0,155***

* t-test; *** точный тест Фишера.

Значимых различий гормонального профиля в группах также выявлено не было (табл. 3.1.4).

Таблица 3.1.4. Особенности гормонального профиля пациенток, включенных в исследование

Параметр	Группа 1 (n = 166)	Группа 2 (n = 757)	p-value
АМГ, нг/мл	2,6 ± 2,1	2,8 ± 2,0	0,665*
ФСГ, мЕд/мл	6,7 ± 2,4	6,8 ± 2,5	0,473*
ЛГ, мЕд/мл	5,1 ± 2,0	5,7 ± 2,4	0,470*
Эстрадиол, пмоль/л	169,3 ± 76,1	161,8 ± 78,4	0,338*
Кортизол, нмоль/л	355,4 ± 132,0	362,5 ± 146,7	0,665*
Пролактин, мЕд/л	331,2 ± 168,5	308,9 ± 159,2	0,166*
Тестостерон, нмоль/л	1,5 ± 0,9	1,5 ± 0,9	0,540*
ТТГ, мЕд/л	1,8 ± 1,0	1,7 ± 1,1	0,585*
ДГЭАС, мкмоль/л	4,9 ± 2,4	4,6 ± 2,3	0,182*
Тироксин, пмоль/л	14,4 ± 2,9	14,1 ± 2,6	0,406*

* t-test.

Таким образом, не было выявлено различий в клинико-лабораторных показателях и параметрах овариальной стимуляции у пациенток группы микровибрации и группы с ее отсутствием (группа 1 и группа 2).

3.2. Клинико-анамнестические факторы, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий

Для решения задачи 1 все пациентки были разделены на две группы в зависимости от наступления беременности. В группу А вошли пациентки с наступившей беременностью (n=270), в группу Б вошли пациентки, у которых беременность не наступила (n=653). Таким образом, общая частота наступления беременности составила 29,3%.

На первом этапе работы мы проанализировали клинико-анамнестические данные пациенток в группах сравнения. Возраст обоих супругов был значимо ниже в супружеских парах с наступившей беременностью (табл. 3.2.1). Средний возраст женщины составил 33 (30 – 36) года в группе А и 36 (31 – 40) лет в группе Б ($p < 0,001$). Средний возраст супруга составил 34 (31 – 38) года в группе А и 36 (32 – 42) лет в группе Б ($p < 0,001$). Рост, масса тела и ИМТ пациенток были сопоставимы в группах сравнения. Наличие вредных привычек (курение) отмечено у 13 (4,8%) пациенток группы А и у 28 (4,3%) пациенток группы Б ($p = 0,421$).

Таблица 3.2.1. Антропометрическая характеристика пациенток, включенных в исследование

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
Возраст пациентки, лет	33 (30 – 36)	36 (31 – 40)	<0,001**
Возраст супруга, лет	34 (31 – 38)	36 (32 – 42)	<0,001**
Рост, см	165,6 ± 6,8	166,2 ± 5,5	0,435*
Масса тела, кг	64,4 ± 13,3	64,4 ± 12,2	0,993*
ИМТ, кг/м ²	23,5 ± 4,5	23,3 ± 4,1	0,757*

* t-test; ** тест Манна-Уитни.

При проведении ROC-анализа ($AUC = 0,629$) пороговым возрастом пациентки был возраст 35,5 лет, отношение шансов наступления беременности (ОШ) в зависимости от возраста пациентки составило 2,0 (95% ДИ=1,1; 3,7). Пороговым возрастом супруга составил возраст 39,5 лет ($AUC = 0,593$), ОШ беременности в зависимости от возраста партнера пациентки составило 1,8 (95% ДИ=1,0; 3,4).

При анализе особенностей менструального цикла и сексуальной функции пациенток в зависимости от наступления беременности обращает на себя внимание несколько большая длительность менструального цикла и продолжительности менструации в группе А, а также большая частота нарушений менструального цикла по типу олигоменореи в группе Б (табл. 3.2.2). Оба этих фактора в первую очередь связаны с возрастом пациенток – коэффициент корреляции (r) составил $-0,199$ ($p < 0,001$) для длительности менструального цикла и $-0,247$ ($p < 0,001$) для длительности менструации. При этом различия длительности цикла и длительности менструации были минимальными и клинически не значительными. Также с возрастом повышалась частота нерегулярных менструаций. Однако скорректированное отношение шансов ($ОШ_{кор}$) составило 1,2 (95% ДИ=1,0; 1,5). Таким образом, нарушение менструального цикла является фактором, снижающим частоту наступления беременности независимо от возраста. Возраст менархе и частота дисменореи не различалась в группах сравнения. Возраст начала половой жизни был несколько ниже у пациенток группы А по сравнению с пациентками группы Б.

При анализе репродуктивного анамнеза мы выявили, что частота неразвивающихся беременностей была значимо выше в группе Б. Беременности в анамнезе (вторичное бесплодие) были у 130 (49,2%) пациенток группы А и у 331 (50,7%) пациентки группы Б ($p = 0,264$). Из них роды были в анамнезе у 50 (18,5%) пациенток группы А и 129 (19,8%)

пациенток группы Б ($p = 0,369$). Аборты – у 46 (17,0%) и 121 (18,5%) пациентки, соответственно ($p = 0,332$). Внематочные беременности – у 46 (17,0%) и 87 (13,3%) пациенток, соответственно ($p = 0,088$). Неразвивающиеся беременности – у 44 (16,3%) и 139 (21,3%) пациенток, соответственно ($p = 0,049$).

Таблица 3.2.2. Особенности менструального цикла и сексуальной функции пациенток, включенных в исследование

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
Возраст менархе, лет	13 (12 – 14)	13 (12 – 14)	0,168**
Длительности цикла, дней	28 (28 – 29,5)	28 (27 – 29)	<0,001**
Длительность менструации, дней	5 (4,5 – 5,375)	5 (4 – 5)	0,009**
Нерегулярные менструации	15 (5,6%)	39 (12,9%)	<0,001***
Болезненные менструации	34 (12,6%)	84 (12,9%)	0,503***
Возраст начала половой жизни, лет	18 (17 – 20)	18 (18 – 20)	0,070**

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

При оценке особенностей гинекологического анамнеза пациенток обращает на себя внимание высокая распространенность эндометриоза (аденомиоза), миомы матки и кист яичников (табл. 3.2.3). При этом частота эндометриоза (аденомиоза) не различалась в группах сравнения, тогда как миома матки преобладала в группе Б (16,7% против 23,9%, $p = 0,009$). Миома матки у всех пациенток с миомой матки была малых размеров (<4 см), с узлами, расположенными интрамурально или субсерозно. ОШ ЧНБ в зависимости от наличия миомы матки составило 1,43 (95% ДИ=1,06; 1,93).

Продолжительность бесплодия у пациенток группы А колебалась от одного года до 18 лет и в среднем составила 5 (3 – 8) лет, у пациенток группы Б – от одного года до 22 лет и в среднем составила 5 (3 – 7) лет ($p = 0,649$). Число попыток ВРТ в анамнезе пациенток составило 0 (0 – 1) в группе А и 1 (0 – 2) в группе Б ($p < 0,001$).

Таблица 3.2.3. Особенности гинекологического анамнеза пациенток, включенных в исследование

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
Эндометриоз и/или аденомиоз	69 (25,6%)	162 (24,8%)	0,436***
Миома матки	45 (16,7%)	156 (23,9%)	0,009***
Кисты яичников	47 (17,4%)	111 (17,0%)	0,475***
Цервикальная интраэпителиальная неоплазия	10 (3,7%)	43 (6,6%)	0,056***
Синдром поликистозных яичников	16 (5,9%)	25 (3,8%)	0,111***
Гиперплазия эндометрия	7 (2,6%)	17 (2,6%)	0,582***

*** точный тест Фишера.

При анализе оперативного анамнеза пациенток (табл. 3.2.4) наиболее распространенными операциями были выскабливание эндометрия, тубэктомия и резекция яичника (яичников). Значимых различий между группами сравнения выявлено не было.

Таблица 3.2.4. Наличие оперативных вмешательств в анамнезе у пациенток, включенных в исследование

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
Резекция яичника (яичников)	54 (20,0%)	109 (16,7%)	0,135***
Тубэктомия	69 (25,6%)	140 (21,4%)	0,102***
Миомэктомия	25 (9,3%)	71 (10,9%)	0,273***
Выскабливание эндометрия	112 (41,5%)	290 (44,4%)	0,229***
Оперативные вмешательства с вовлечением яичника без резекции	29 (10,7%)	70 (10,7%)	0,538***

*** точный тест Фишера.

При анализе сопутствующих соматических заболеваний было показано, что наиболее часто имели место заболевания органов пищеварительной системы (хронический гастрит, хронический дуоденит, хронический холецистит, желчекаменная болезнь), нарушения эндокринной системы и аллергические реакции (табл. 3.2.5). Частота сопутствующих соматических заболеваний была сопоставима в обеих группах, за исключением частоты эндокринологических нарушений (гипотиреоза аутоиммунного генеза),

которые были отмечены у 80 (29,6%) пациенток группы А и у 250 (38,3%) пациенток группы Б ($p = 0,007$). ОШ ЧНБ в зависимости о наличия гипотиреоза составила 1,47 (95% ДИ=1,08; 2,03).

Таблица 3.2.5. Наличие соматических заболеваний у пациенток, включенных в исследование

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
Аллергические реакции	46 (17,0%)	112 (17,2%)	0,525***
Заболевания органов дыхательной системы	14 (5,2%)	26 (4,0%)	0,257***
Заболевания органов сердечно-сосудистой системы	4 (1,5%)	23 (3,5%)	0,066***
Заболевания органов пищеварительной системы	61 (22,6%)	149 (20,0%)	0,507***
Заболевания органов мочевыделительной системы	14 (5,2%)	42 (6,4%)	0,289***
Заболевания ЛОР-органов	25 (9,3%)	80 (12,3%)	0,116***
Заболевания органов зрения	18 (6,7%)	56 (8,6%)	0,202***
Нарушения эндокринной системы	80 (29,6%)	250 (38,3%)	0,007***

*** точный тест Фишера.

При анализе гормонального профиля было выявлено, что у пациенток группы А (с наступившей беременностью) уровень ФСГ был в среднем на 1,0 мМЕ/мл ниже ($6,5 \pm 2,0$ против $7,5 \pm 3,0$ мМЕ/мл; $p = 0,012$), а уровень АМГ – на 1,3 нг/мл выше ($3,4 \pm 1,7$ против $2,1 \pm 0,9$ нг/мл; $p = 0,003$), чем у пациенток группы Б (у которых беременность не наступила). Уровни других гормонов были сопоставимы в обеих группах и не выходили за пределы референсных значений (табл. 3.2.6).

Таблица 3.2.6. Особенности гормонального профиля пациенток, включенных в исследование

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
АМГ, нг/мл	3,4 ± 1,7	2,1 ± 0,9	0,0003*
ФСГ, мЕд/мл	6,5 ± 2,0	7,5 ± 3,0	0,012*
ЛГ, мЕд/мл	4,7 ± 1,9	5,8 ± 12,3	0,463*
Эстрадиол, пмоль/л	143,0 ± 66,9	152,8 ± 76,8	0,369*
Кортизол, нмоль/л	340,1 ± 116,7	323,9 ± 135,9	0,457*
Пролактин, мЕд/л	335,1 ± 191,4	294,0 ± 143,6	0,162*
Тестостерон, нмоль/л	1,5 ± 0,8	1,5 ± 1,0	0,790*
ТТГ, мЕд/л	2,0 ± 1,2	1,7 ± 1,1	0,188*
ДГЭАС, мкмоль/л	4,5 ± 1,7	5,0 ± 2,7	0,244*
Тироксин, пмоль/л	14,1 ± 2,9	14,2 ± 2,6	0,842*

* t-test.

3.3. Особенности овариальной стимуляции, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий

Особенности овариальной стимуляции у пациенток обеих групп представлены в таблице 3.3.1. У пациенток группы А для овариальной стимуляции препараты рФСГ для ежедневного введения были использованы значительно чаще (34,4%), чем у пациенток группы Б (24,4%, $p = 0,001$). Различий в суммарной дозировке препаратов выявлено не было.

Таблица 3.3.1. Особенности протокола овариальной стимуляции

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
Овариальная стимуляция			
рФСГ, %	93 (34,4%)	159 (24,4%)	0,001***
рФСГ, МЕ	1289 ± 359	1364 ± 444	0,178
чМГ, %	58 (21,5%)	174 (26,7%)	0,058***
чМГ, МЕ	1542 ± 498	1632 ± 554	0,209
рФСГ+чМГ, %	99 (36,7%)	261 (40,0%)	0,195***
рФСГ+чМГ, МЕ	1964 ± 557	2040 ± 598	0,351
Кориоллитропин альфа, %	20 (7,4%)	59 (9,0%)	0,253***
Триггер овуляции			
ХГЧ, %	209 (77,4%)	484 (74,1%)	0,167***
ХГЧ+Трипторелин, %	61 (22,6%)	169 (25,9%)	0,167***

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

3.4. Эмбриологические факторы, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий

При анализе параметров спермограммы (табл. 3.4.1) концентрация сперматозоидов в эякуляте супруга, подвижность сперматозоидов и процент сперматозоидов с нормальной морфологией не различались в группах А и Б.

Таблица 3.4.1. Параметры спермограммы супруга

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
Концентрация сперматозоидов в эякуляте, млн/мл	48 (25,5 – 73,5)	56 (28 – 81)	0,363**
Процент подвижных сперматозоидов (a+b)	46 (33,75 – 58,25)	48 (34 – 59)	0,994**
Процент сперматозоидов с нормальной морфологией	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	0,453**

** тест Манна-Уитни.

При анализе используемых эмбриологических методик (табл. 3.4.2) обращает на себя внимание высокая частота оплодотворения ооцитов методом ИКСИ – более 90%. Оплодотворение методом ИКСИ проводили при мужском факторе бесплодия, который проявлялся в значительном снижении параметров эякулята: концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов. Также оплодотворение методом ИКСИ проводили при неудаче оплодотворения в предыдущей попытке ЭКО. Значимых различий между группами по частоте проведения ИКСИ выявлено не было.

Вспомогательный хетчинг (микроманипуляция, во время которой блестящую оболочку эмбриона перфорируют химически, механически, с помощью лазера или ферментативно) проводили по следующим показаниям: изменение морфологии блестящей оболочки эмбриона, плохой прогноз (предыдущие неудачные попытки ЭКО, эмбрионы низкого качества). Частота

проведения вспомогательного хетчинга также была сопоставима в группах сравнения.

Таблица 3.4.2. Дополнительные эмбриологические методики

Параметр	Группа А (n = 270)	Группа Б (n = 653)	p-value
Оплодотворение методом ИКСИ	248 (91,9%)	612 (93,7%)	0,118***
Вспомогательный хетчинг	122 (45,2%)	305 (46,7%)	0,364***

*** точный тест Фишера.

На наступление беременности оказывали влияние число полученных ооцит-кумулюсных комплексов, число ооцитов МП-стадии и число успешно оплодотворенных ооцитов (2рп). Частота успешного оплодотворения также была выше в группе А, тогда как число эмбрионов, перенесенных в полость матки, было сопоставимо в группах сравнения (табл. 3.4.3).

Таблица 3.4.3. 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**
в т.ч. «высокого» качества	0,5 (0 – 1)	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.

Для оценки качества эмбриона, перенесенного в полость матки, была рассчитана доля эмбрионов каждого морфологического класса в обеих группах, выраженная в процентах. Разница долей (группа А минус группа Б) приведена в таблице 3.4.4. Как видно из таблицы, в группе А перенос бластоцисты в полость матки был произведен на 29,3% чаще, чем в группе Б

($p < 0,001$). В группе Б на 7,6% чаще была перенесена кавитирующая морула ($p < 0,001$), на 18,9% чаще – морула ($p < 0,001$). При анализе стадии развития перенесенных бластоцист по классификации Гарднера (Gardner DK, 1999), было выявлено, что в группе А на 28,0% чаще были перенесены эмбрионы 4 стадии развития ($p < 0,001$) и на 1,9% чаще – эмбрионы 5 стадии развития ($p = 0,035$). При анализе качества внутренней клеточной массы и трофэктодермы перенесенных эмбрионов 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 ($p = 0,048$).

Таблица 3.4.4. Качество эмбриона, перенесенного в полость матки

Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты						Всего
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	
А	А	-0,9%	-1,1%	0,6%	25,0%*	1,3%	0,1%	25,0%*
А	В	–	-0,5%	1,2%	2,5%*	0,6%	–	3,8%
А	С	–	–	–	0,3%	–	–	0,3%
В	А	–	0,1%	0,6%	0,1%	–	–	0,8%
В	В	–	-0,1%	-0,8%	0,3%	–	–	-0,6%
В	С	–	0,1%	-0,4%	-0,2%	–	–	-0,4%
С	А	–	–	–	–	–	–	0,0%
С	В	–	–	0,3%	–	–	–	0,3%
С	С	–	–	–	–	–	–	0,0%
Всего		-0,9%	-1,4%	1,5%	28,0%*	1,9%*	0,1%	29,3%*
Кавитирующая морула				-7,6%*	Морула		-18,9%*	

Разница долей (группа 1 минус группа 2) рассчитана для каждого морфологического класса эмбриона. * – $p < 0,05$ (точный тест Фишера)

Учитывая выявленные различия и одинаковую ЧНБ при переносе в полость матки одного и двух эмбрионов, мы рассчитали ЧНБ для каждого морфологического класса (табл. 3.4.5). Общая ЧНБ при переносе бластоцисты составила 47,9%, при переносе кавитирующей морулы – 21,3%, при переносе морулы – 18,0%. ЧНБ выше 50% была достигнута при переносе бластоцисты класса 4АА, 5АА, 4АВ и 3ВА. При переносе бластоцисты класса 3АА, 3АВ, 3ВВ, 2АА, 2ВВ ЧНБ варьировала в диапазоне от 30 до 50%.

Таблица 3.4.5. Частота наступления беременности в зависимости от качества эмбриона, перенесенного в полость матки

Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты						
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	Всего
А	А	27,8%	31,6%	38,4%	56,6%	58,3%	n < 5	49,1%
А	В	n = 0	25,0%	46,2%	53,3%	n < 5	n = 0	48,5%
А	С	n = 0	n = 0	n = 0	n < 5	n = 0	n = 0	n < 5
В	А	n = 0	n < 5	60,0%	n < 5	n = 0	n = 0	55,6%
В	В	n = 0	35,7%	30,4%	n < 5	n = 0	n = 0	34,1%
В	С	n < 5	n < 5	n < 5	n = 0	n = 0	n = 0	20,0%
С	А	n = 0	n = 0	n = 0	n = 0	n = 0	n = 0	n = 0
С	В	n = 0	n = 0	n < 5	n = 0	n = 0	n = 0	n < 5
С	С	n = 0	n = 0	n = 0	n = 0	n = 0	n = 0	n = 0
Всего		27,8%	32,8%	39,2%	56,1%	64,3%		47,9%
Кавитирующая морула				21,3%	Морула		18,0%	

Частота рассчитана для каждого морфологического класса в случае переноса минимум 5 эмбрионов данного класса (n).

Подытоживая анализ клинико-лабораторных данных пациенток, можно заключить, что пациентки группы А (у которых беременность наступила) по сравнению с пациентками группы В (у которых беременность не наступила) были моложе, имели более молодых супругов, более регулярный менструальный цикл, реже имели миомы матки и заболевания щитовидной железы, они имели более высокие показатели овариального резерва, и им чаще назначались препараты рФСГ для овариальной стимуляции. Как следствие, у них было получено больше ооцитов и была выше частота оплодотворения. Как результат, им чаще были перенесены бластоцисты отличного качества.

3.5. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту оплодотворения ооцитов и развитие эмбрионов первых пяти суток культивирования

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. Статистически значимых различий выявлено не было ($p = 0,715$). При оплодотворении методом ЭКО средняя частота

оплодотворения составила 75,3% в группе микровибрации и 85,4% в группе 2 ($p = 0,128$). При оплодотворении методом ИКСИ средняя частота оплодотворения составила 86,7% в группе микровибрации и 86,8% в группе контроля ($p = 1,000$). 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. При этом число бластоцист отличного и хорошего качества не различалось в 2-х группах (табл. 3.5.1).

Таблица 3.5.1. Особенности эмбриологического этапа программы ВРТ

Параметр	Группа 1 (n = 166)	Группа 2 (n = 757)	p-value
Число полученных ооцит-кумулюсных комплексов	6 (4 – 10)	6 (3 – 9)	0,452**
Число ооцитов МII-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**
в т.ч. «высокого» качества	2 (1 – 3)	2 (1 – 2)	0,065**
Число перенесенных эмбрионов:			0,347***
- один;	112 (73,5%)	510 (67,4%)	
- два.	23 (13,9%)	92 (12,2%)	

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

Для более подробной оценки влияния контролируемой механической микровибрации на развитие эмбрионов первых суток культивирования было проанализировано качество всех эмбрионов пятых суток культивирования в соответствующих группах. 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. Не оплодотворенные или аномально оплодотворенные ооциты не учитывали при проведении анализа.

При детальном анализе были выявлены следующие особенности (табл. 3.5.2). При культивировании в условиях контролируемой механической микровибрации 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 внутренней клеточной массы и трофэктодермы было показано, что в группе микровибрации было на 2,6% больше эмбрионов класса AA ($p = 0,084$) и на 1,3% больше эмбрионов класса BA ($p = 0,019$), чем в группе сравнения. В целом при подсчете влияния КММВ на эмбрионы отличного и хорошего качества (6BB, 5AA, 5BV, 4AA, 4AB, 4BA, 4BB, 3AA, 3AB, 3BA, 3BB) в отличие от влияния на эмбрионы плохого качества (1CC, 1CA, 1B, 1AA, 2CC, 2BC, 2BV, 2AB, 2BA, 2AA, 3CC, 3CB, 4CC, 4BC, 4AC) 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 3.5.2. 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%	Дегградация 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 у всех пациенток вне зависимости от того, проводилась им криоконсервация эмбрионов или нет, составило 1 (0 – 3) у пациенток микровибрации и 0 (0 – 2) у пациенток группы 2 ($p = 0,003$). Среднее число криоконсервированных эмбрионов у пациенток, которым была проведена криоконсервация эмбрионов, составило 3 (1 – 4) у пациенток микровибрации и 2 (1 – 4) у пациенток группы 2 ($p = 0,052$).

Таким образом, при сравнении группы 1 (группа микровибрации) и группы 2 (группа без микровибрации) были выявлены следующие отличия. У пациенток группы 1 было больше число полученных бластоцист, число бластоцист первой и пятой степени зрелости, АА и ВА-классов по классификации Гарднера. Микровибрация оказывала положительное влияние на быстро развивающиеся эмбрионы и отрицательное влияние на эмбрионы низкого качества. При проведении микровибрации повышаются шансы получения и большее число бластоцист, годных для криоконсервации.

3.6. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту наступления беременности в зависимости от клинико-анамнестических данных пациенток

Среди пациенток группы микровибрации ($n = 166$) беременность наступила у 56 пациенток (ЧНБ = 33,7%), среди пациенток группы 2 ($n = 757$)

– у 214 пациенток (ЧНБ = 28,3%), $p = 0,096$. Т.е. применение КММВ позволило повысить ЧНБ на 5,4% – с 28,3 до 33,7%, что подтверждает данные о положительном влиянии микровибрации на имплантационный потенциал эмбрионов человека в программах ВРТ.

Частота клинической беременности была значимо выше в группе 1 (32,5%), чем в группе 2 (24,3%), $p=0,019$. 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.

3.6.1. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту наступления беременности у пациенток позднего репродуктивного возраста

Для оценки факторов, влияющих на исходы ВРТ у пациенток разного возраста, были выделены 2 подгруппы пациенток: группа 1.1 – пациентки 37-45 лет (пациентки позднего репродуктивного возраста) и группа 1.2 – пациентки 18-36 лет. Пациентки группы 1.1 имели в анамнезе больше беременностей, родов, аборт, неразвивающихся и внематочных беременностей. Продолжительность их бесплодия была выше, также они имели в анамнезе большее число неудачных программ ВРТ (табл. 3.6.1).

Возраст супруга, масса тела и ИМТ были выше в группе пациенток позднего репродуктивного возраста (табл. 3.6.2).

Таблица 3.6.1. Репродуктивный анамнез пациенток позднего репродуктивного возраста

	Группа 1.1 37+ лет (n = 344)	Группа 1.2 36- лет (n = 579)	p-value
Беременности, число, %	1 (0 – 2) 63,3%	0 (0 – 1) 40,9%	<0,001** <0,001***
Роды, число, %	0 (0 – 0) 28,5%	0 (0 – 0) 14,0%	<0,001** <0,001***
Аборты, число, %	0 (0 – 1) 29,9%	0 (0 – 0) 11,1%	<0,001** <0,001***
Неразвивающиеся беременности, число, %	0 (0 – 1) 11,6%	0 (0 – 0) 16,1%	<0,001** 0,038***
Внематочные беременности, число, %	0 (0 – 0) 25,9%	0 (0 – 0) 14,9%	<0,058** <0,001***
Программы ВРТ в анамнезе, число, %	1 (0 – 2) 55,5%	0 (0 – 1) 37,8%	<0,001** <0,001***
Продолжительность бесплодия, лет	5 (3 – 8)	5 (3 – 6)	<0,001**

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

Таблица 3.6.2. Антропометрические характеристики пациенток позднего репродуктивного возраста

	Группа 1.1 37+ лет (n = 344)	Группа 1.2 36- лет (n = 579)	p-value
Возраст супруга, лет	41 (37 – 45)	33 (31 – 36)	<0,001**
Рост, см	166,5 ± 6,0	165,8 ± 5,8	0,369*
Масса тела, кг	67,5 ± 13,3	62,6 ± 11,6	0,002*
ИМТ, кг/м ²	24,3 ± 4,4	22,8 ± 4,0	0,004*

* t-test; ** тест Манна-Уитни.

Для пациенток позднего репродуктивного возраста были характерны меньшая длина менструального цикла, меньшая длительность менструации, у них реже отмечались жалобы на нерегулярные или болезненные менструации. Возраст начала половой жизни был выше у пациенток позднего репродуктивного возраста (табл. 3.6.3).

Таблица 3.6.3. Особенности менструального цикла и сексуальной функции пациенток позднего репродуктивного возраста

Параметр	Группа 1.1 37+ лет (n = 344)	Группа 1.2 36- лет (n = 579)	p-value
Возраст менархе, лет	13 (12 – 14)	13 (12 – 14)	0,328**
Длительности цикла, дней	28 (26 – 28)	28 (28 – 29)	0,001**
Длительность менструации, дней	5 (4 – 5)	5 (4,5 – 5)	0,003**
Нерегулярные менструации	8 (2,3%)	46 (7,9%)	<0,001***
Болезненные менструации	36 (10,5%)	82 (14,2%)	0,062***
Возраст начала половой жизни, лет	18 (18 – 20)	18 (17 – 20)	<0,001**

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

У пациенток позднего репродуктивного возраста чаще встречалась миома матки (37,8% против 12,3%, соответственно, $p < 0,001$), миомэктомия (17,7% против 6,0%, $p < 0,001$) вмешательства на эндометрии (47,7% против 41,1%, $p = 0,030$) в анамнезе, чаще диагностировались заболевания сердечно-сосудистой системы (4,4% против 2,1%, $p = 0,038$) и эндокринные расстройства (40,4% против 33,0%, $p = 0,014$).

У пациенток группы 1.1 были выше дозировки гонадотропинов, чаще применялись препараты ЧМГ для овариальной стимуляции, в том числе, в комбинации с рФСГ, в качестве триггера овуляции в подавляющем большинстве случаев назначался ХГЧ (табл. 3.6.4).

Таблица 3.6.4. Особенности протокола овариальной стимуляции у пациенток позднего репродуктивного возраста

Параметр	Группа 1.1 37+ лет (n = 344)	Группа 1.2 36- лет (n = 579)	p-value
Овариальная стимуляция			
рФСГ, %	43 (12,5%)	209 (36,1%)	<0,001***
рФСГ, МЕ	1493 ± 522	1306 ± 385	0,024**
чМГ, %	116 (33,7%)	116 (20,0%)	<0,001***
чМГ, МЕ	1739 ± 557	1494 ± 499	<0,001**
рФСГ+чМГ, %	160 (46,5%)	200 (34,5%)	<0,001***
рФСГ+чМГ, МЕ	2147 ± 590	1919 ± 565	0,001**
Кориоллитропин альфа, %	25 (7,3%)	54 (9,3%)	0,169***
Триггер овуляции			
ХГЧ, %	337 (98,0%)	356 (61,5%)	<0,001***
ХГЧ+Трипторелин, %	7 (2,0%)	223 (38,5%)	<0,001***

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

У пациенток позднего репродуктивного возраста было получено меньшее число ОКК и бластоцист и более низкое количество полученных ооцитов и эмбрионов (табл. 3.6.5).

Таблица 3.6.5. Особенности эмбриологического этапа у пациенток позднего репродуктивного возраста

Параметр	Группа 1.1 37+ лет (n = 344)	Группа 1.2 36- лет (n = 579)	p-value
Число полученных ОКК	4 (2 – 7)	7 (4 – 12)	< 0,001 **
Число ооцитов МП-стадии	3 (2 – 5)	6 (3 – 9)	< 0,001 **
Число зигот	3 (2 – 5)	5 (3 – 8)	< 0,001 **
Частота оплодотворения	85,0%±22,3%	87,5%±16,5%	0,835*
Число бластоцист	1 (1 – 2)	3 (1 – 4)	< 0,001 **
в т.ч. «отличного» качества	0 (0 – 1)	2 (1 – 3)	< 0,001 **
в т.ч. «высокого» качества	1 (0 – 2)	2 (2 – 3)	< 0,001 **
Число перенесенных эмбрионов:			0,024
- один;	192 (55,8%)	430 (74,3%)	
- два.	47 (13,7%)	68 (11,7%)	

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

У пациенток позднего репродуктивного возраста беременность наступила у 60 человек, что составило 17,4%. У пациенток младше 37 лет беременность наступила у 210 человек, т.е. ЧНБ составила 36,3% ($p < 0,001$). ОШ ЧНБ с учетом возраста пациенток, таким образом, составило 2,69, (95% ДИ=1,93; 3,80). При проведении многофакторного анализа с учетом значимых конфаундеров, таких как возраст мужчины, ИМТ, миома матки и число полученных бластоцист ОШ_{кор} ЧНБ составило 2,55; 95% ДИ=1,65; 3,74). Роды живым плодом произошли у 32 пациенток группы 1.1 (9,3%) и у 154 пациенток группы 1.2 (26,6%) ($p < 0,001$). ОШ составило 3,53 (95% ДИ=2,33; 5,49). При проведении многофакторного анализа с учетом значимых конфаундеров, таких как ИМТ и миома матки ОШ_{кор} живорождения составило 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%). Было выявлено, что в целом

КММВ не оказывала значимого эффекта на ЧНБ, однако у пациенток группы 1.2 (младше 37 лет) она оказывала несколько больший благоприятный эффект ($\Delta = 5,1\%$), чем у пациенток 37-45 лет ($\Delta = 4,3\%$) (табл. 3.6.6).

Таблица 3.6.6. Влияние возраста на частоту наступления беременности, в зависимости от способа культивирования эмбрионов

Наступление беременности	Группа 1 (n = 166)	Группа 2 (n = 757)	p-value
Возраст 18-36 лет (n = 579)	44/109 (40,4%)	166/470 (35,3%)	0,190*** $\Delta = 5,1\%$
Возраст 37-45 лет (n = 344)	12/57 (21,0%)	48/287 (16,7%)	0,270*** $\Delta = 4,3\%$
p-value	0,009*** $\Delta = 19,4\%$	<0,001*** $\Delta = 18,6\%$	

Δ – разница между частотой наступления беременности в группах микровибрации и контроля. *** точный тест Фишера.

Так как наступление беременности является многофакторным процессом, на который в значительной степени оказывает маточный фактор, а также с учетом того, что в общей выборке пациенток было выявлено влияние КММВ не на ЧНБ, а на число и качество полученных бластоцист, мы провели анализ влияния КММВ на развитие бластоцист в зависимости от возраста пациенток (табл. 3.6.7).

В обобщенном виде влияние КММВ на качество эмбрионов пациенток в зависимости от возраста представлено на рисунке 3.6.1. Было выявлено, что у пациенток позднего репродуктивного возраста микровибрация оказывала негативный эффект на качество эмбрионов, а у пациенток до 37 лет – микровибрация оказывала положительный эффект. Так, 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%).

Таблица 3.6.7. Качество эмбрионов в зависимости от условий культивирования у пациенток разных возрастных групп

Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты пациенток 37 лет и старше						
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	Всего
А	А	1,01%	-0,44%	0,80%	0,83%	-0,22%		1,98%
А	В		0,79%	-2,01%	-1,22%			-2,10%
А	С							
В	А				0,90%	0,34%		0,57%
В	В		0,23%	0,24%	-1,78%			-1,54%
В	С							-0,11%
С	А							
С	В							0,34%
С	С	1,80%	-0,67%					-0,66%
Всего		3,70%	0,24%	-2,75%	-1,61%	-0,22%		
Кавитирующая морула		0,70%	Морула	-1,82%	Отдельные бластомеры	-3,57%	Дегградация эмбриона	5,31%
Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты пациенток моложе 37 лет						
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	Всего
А	А	0,32%	0,43%	1,27%	-0,30%	0,84%		2,52%
А	В		-0,67%	0,30%	-0,82%	0,07%		-1,20%
А	С				0,02%			-0,02%
В	А		-0,11%	0,78%	1,03%			1,55%
В	В		-0,80%	-0,22%	-0,13%	0,40%		-0,65%
В	С		-0,05%	0,13%	-0,31%			-0,23%
С	А							
С	В							
С	С	0,20%	-0,12%	-0,66%	-0,18%			-0,80%
Всего		0,44%	-1,32%	1,73%	-0,69%	1,12%	0,02%	1,30%
Кавитирующая морула		0,54%	Морула	1,51%	Отдельные бластомеры	-1,20%	Дегградация эмбриона	-2,16%

Разница долей (дельта) (группа микровибрации минус группа сравнения) рассчитана для каждого морфологического класса эмбриона. Черным цветом отмечены ячейки с бластоцистами отличного и хорошего качества, красным цветом – с эмбрионами плохого качества.

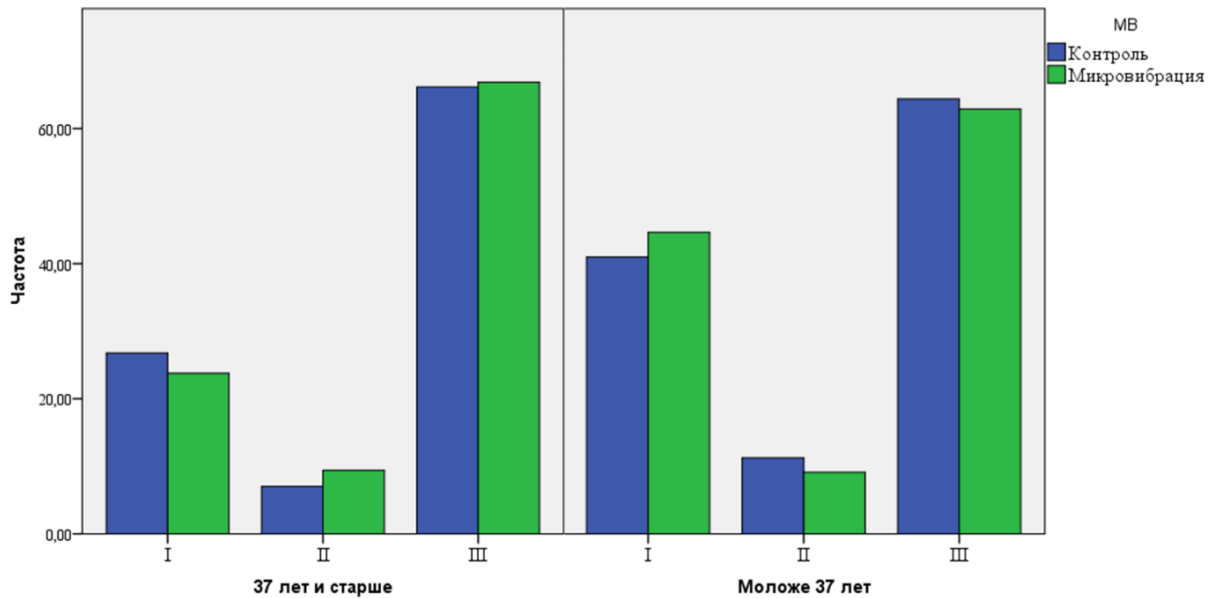


Рисунок 3.6.1. Качество эмбрионов в зависимости от условий культивирования у пациенток разных возрастных групп. I – бластоцисты отличного и хорошего качества, II – бластоцисты плохого качества, III – эмбрионы, не сформировавшие бластоцисту.

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.

3.6.2. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту наступления беременности у пациенток с ожирением

Для оценки факторов, влияющих на исходы ВРТ у пациенток с разным ИМТ были выделены подгруппы пациенток: группа 1.3 – пациентки с ожирением и избыточной массой тела (ИМТ ≥ 25 кг/м²) и группа 1.4 – пациентки без ожирения (ИМТ < 25 кг/м²). Пациентки с ожирением и избыточной массой тела реже имели в анамнезе роды, чаще –

неразвивающиеся беременности, продолжительность их бесплодия была несколько выше, чем у пациенток с нормальным ИМТ (табл. 3.6.8).

Таблица 3.6.8. Репродуктивный анамнез пациенток с ожирением и избыточной массой тела

	Группа 1.3 ИМТ ≥ 25 (n = 72)	Группа 1.4 ИМТ < 25 (n = 851)	p-value
Беременности, число, %	0 (0 – 2) 47,2%	0 (0 – 1) 49,2%	0,718** 0,419***
Роды, число, %	0 (0 – 0) 6,9%	0 (0 – 0) 20,4%	0,005** 0,002***
Аборты, число, %	0 (0 – 0,75) 25,0%	0 (0 – 0) 17,5%	0,136** 0,080***
Неразвивающиеся беременности, число, %	0 (0 – 1) 26,4%	0 (0 – 0) 18,3%	0,079** 0,004***
Внематочные беременности, число, %	0 (0 – 0) 18,1%	0 (0 – 0) 14,1%	0,359** 0,068***
Программы ВРТ в анамнезе, число, %	0 (0 – 1) 47,2%	0 (0 – 1) 44,2%	0,873** 0,353***
Продолжительность бесплодия, лет	5,5 (3 – 10)	5 (3 – 7)	0,010

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

Возраст пациентки и возраст её супруга был сопоставим в обеих группах, тогда как масса тела и ИМТ были закономерно выше в группе пациенток с ожирением и избыточной массой тела (табл. 3.6.9).

Таблица 3.6.9. Антропометрические характеристики пациенток с ожирением и избыточной массой тела

	Группа 1.3 ИМТ ≥ 25 (n = 72)	Группа 1.4 ИМТ < 25 (n = 851)	p-value
Возраст , лет	35 (32 – 39)	34 (31 – 39)	0,140**
Возраст супруга, лет	37 (33 – 43)	35 (32 – 41)	0,887**
Рост, см	165,6 \pm 5,4	166,2 \pm 5,9	0,853*
Масса тела, кг	81,7 \pm 12,5	60,0 \pm 6,8	<0,001*
ИМТ, кг/м ²	29,7 \pm 3,8	21,5 \pm 2,0	<0,001*

* t-test; ** тест Манна-Уитни.

Для пациенток с ожирением и избыточной массой тела несколько более ранний возраст менархе и высокая частота нарушений менструального цикла (нерегулярные менструации), других особенностей менструального цикла и сексуальной функции, по сравнению с нормальным ИМТ, выявлено не было (табл. 3.6.10).

Таблица 3.6.10. Особенности менструального цикла и сексуальной функции пациенток с ожирением и избыточной массой тела

Параметр	Группа 1.3 ИМТ \geq 25 (n = 72)	Группа 1.4 ИМТ < 25 (n = 851)	p-value
Возраст менархе, лет	13 (12 – 13)	13 (12 – 14)	0,003**
Длительности цикла, дней	28 (26 – 31)	28 (27 – 29)	0,584**
Длительность менструации, дней	5 (3,5 – 5)	5 (4 – 5)	0,136**
Нерегулярные менструации	8 (22,9%)	46 (5,2%)	0,001***
Болезненные менструации	2 (5,7%)	116 (13,2%)	0,147***
Возраст начала половой жизни, лет	18 (16,25-19)	18 (17 – 20)	0,116**

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

У пациенток с ожирением и избыточной массой тела в анамнезе чаще была отмечена миома матки (33,3% против 20,78, $p=0,012$). Других особенностей гинекологического и соматического анамнеза в данной группе пациенток выявлено не было.

При анализе особенностей овариальной стимуляции пациенток с ожирением и избыточной массой тела было выявлено, что овариальная стимуляция у них проводилась преимущественно путем назначения высоких доз рФСГ в комбинации с чМГ (табл. 3.6.11).

У пациенток с ожирением и избыточной массой тела было получено меньшее число ОКК и бластоцист и более низкое количество полученных ооцитов и эмбрионов (табл. 3.6.12).

Таблица 3.6.11. Особенности протокола овариальной стимуляции у пациенток с ожирением и избыточной массой тела

Параметр	Группа 1.3 ИМТ \geq 25 (n = 72)	Группа 1.4 ИМТ < 25 (n = 851)	p-value
Овариальная стимуляция			
рФСГ, %	10 (13,9%)	242 (28,4%)	0,004***
рФСГ, МЕ	1300 \pm 473	1335 \pm 413	0,948**
чМГ, %	16 (22,2%)	216 (25,4%)	0,332***
чМГ, МЕ	1633 \pm 484	1605 \pm 543	0,717**
рФСГ+чМГ, %	44 (61,1%)	316 (37,2%)	0,001***
рФСГ+чМГ, МЕ	2278 \pm 490	1996 \pm 588	0,019**
Корифоллитропин альфа, %	2 (2,8%)	77 (9,1%)	0,176***
Триггер овуляции			
ХГЧ, %	57 (85,7%)	636 (74,4%)	0,248***
ХГЧ+Трипторелин, %	15 (14,3%)	215 (25,6%)	0,248***

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

Таблица 3.6.12. Особенности эмбриологического этапа у пациенток с ожирением и избыточной массой тела

Параметр	Группа 1.3 ИМТ \geq 25 (n = 72)	Группа 1.4 ИМТ < 25 (n = 851)	p-value
Число полученных ооцит-кумулюсных комплексов	5 (2 – 7,5)	6 (3 – 10)	<0,011**
Число ооцитов МП-стадии	4 (2 – 6)	5 (3 – 8)	<0,007**
Число зигот	3 (2 – 5)	4 (2 – 7)	<0,026**
Частота оплодотворения	91,1% \pm 14,2%	86,2% \pm 19,0%	0,235*
Число бластоцист	3 (2 – 3)	3 (2 – 4)	<0,012**
в т.ч. «отличного» качества	2 (1 – 2)	2 (1 – 3)	<0,016**
в т.ч. «высокого» качества	2 (1 – 3)	2 (2 – 3)	<0,028**
Число перенесенных эмбрионов:			0,465
- один;	50 (69,4%)	572 (67,2%)	
- два.	10 (13,9%)	105 (12,3%)	

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

Несмотря на выявленные отличия в подгруппах пациенток, 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%). Было выявлено, что в целом КММВ не оказывала значимого эффекта на ЧНБ, однако у пациенток группы 1.4 (без ожирения) она оказывала погранично значимый благоприятный эффект ($\Delta = 5,9\%$), тогда как у пациенток с ожирением и избыточной массой тела эффекта практически не наблюдалось ($\Delta = -0,6\%$).

Таблица 3.6.13. Влияние ожирения и избыточной массы тела на частоту наступления беременности, в зависимости от способа культивирования эмбрионов

Наступление беременности	Группа 1 (n = 166)	Группа 2 (n = 757)	p-value
Группа 1.3 (ИМТ ≥ 25) (n = 72)	3/11 27,3%	17/61 27,9%	0,644*** $\Delta = -0,6\%$
Группа 1.4 (ИМТ < 25) (n = 851)	53/155 34,2%	197/696 28,3%	0,088*** $\Delta = 5,9\%$
p-value	0,339*** $\Delta = -17,7\%$	0,286*** $\Delta = 6,5\%$	

Δ – разница между частотой наступления беременности в группах микровибрации и контроля. *** точный тест Фишера.

Далее мы провели анализ влияния КММВ на развитие бластоцист в зависимости от ИМТ пациенток (табл. 3.6.14). В обобщенном виде влияние КММВ на качество эмбрионов пациенток в зависимости от ИМТ представлено на рисунке 3.6.2. Было выявлено, что у пациенток с ожирением и избыточной массой тела микровибрация оказывала негативный эффект на качество эмбрионов, а у пациенток с нормальным ИМТ – микровибрация оказывала положительный эффект. Так, 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%).

Таблица 3.6.14. Качество эмбриона в зависимости от условий культивирования у пациенток с различным ИМТ

Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты пациенток с ожирением и избытком массы тела						
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	Всего
A	A	6,1%	-2,1%	0,7%	-10,7%	2,6%		-3,4%
A	B		3,4%	-2,9%	1,8%	-0,8%		1,5%
A	C							
B	A			-0,4%	-1,7%	-0,4%		-2,5%
B	B		-0,4%	-0,8%	-2,1%	3,0%		-0,3%
B	C				-0,4%			-0,4%
C	A							
C	B							
C	C	-0,4%	-0,8%	-0,4%	-0,4%			-2,1%
Всего		5,7%	0,1%	-3,9%	-13,4%	4,4%		-7,1%
Кавитирующая морула		-4,4%	Морула	18,8%	Отдельные бластомеры	3,5%	Деградация эмбриона	-10,8%
Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты пациенток с нормальным ИМТ						
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	Всего
A	A	0,3%	0,3%	1,3%	0,5%	0,5%		2,9%
A	B	0,1%	-0,5%	-0,1%	-1,1%	0,1%		-1,5%
A	C	0,1%						0,2%
B	A		-0,1%	0,5%	1,1%			1,5%
B	B		-0,6%	-0,2%	-0,5%	0,2%	0,1%	-1,0%
B	C		0,1%		-0,3%			-0,2%
C	A							
C	B			0,2%				0,2%
C	C	0,6%	-0,2%	-0,9%	-0,2%			-0,8%
Всего		1,1%	-1,0%	0,8%	-0,4%	0,8%		1,3%
Кавитирующая морула		0,8%	Морула	0,1%	Отдельные бластомеры	-2,2%	Деградация эмбриона	0,0%

Разница долей (дельта) (группа микровибрации минус группа сравнения) рассчитана для каждого морфологического класса эмбриона. Черным цветом отмечены ячейки с бластоцистами отличного и хорошего качества, красным цветом – с эмбрионами плохого качества.

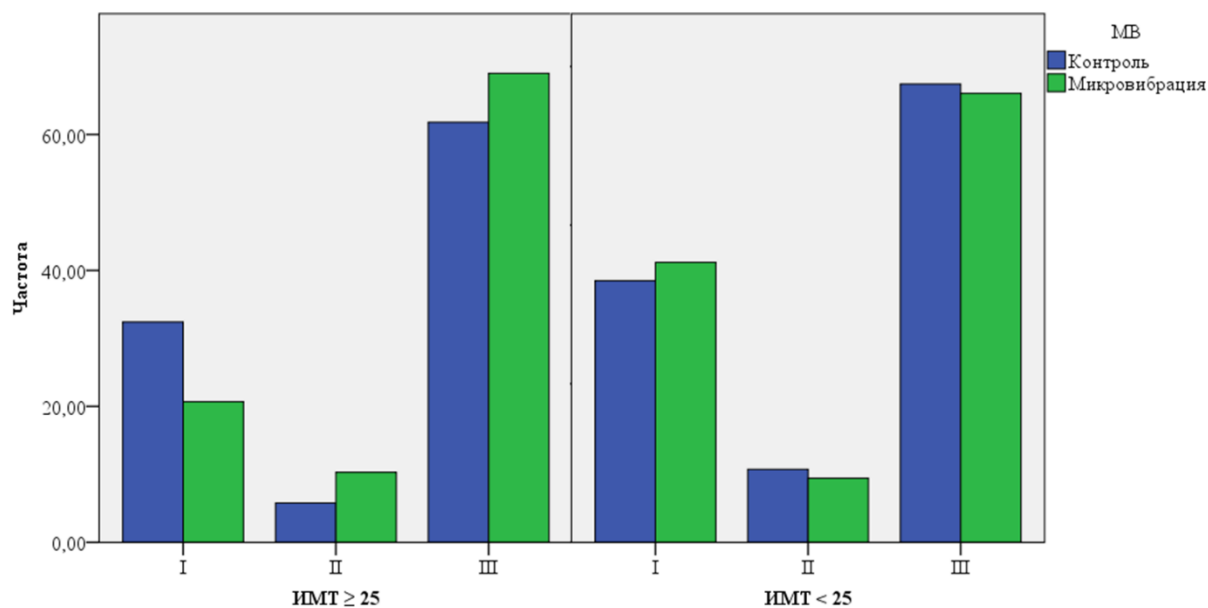


Рисунок 3.6.2. Качество эмбрионов в зависимости от условий культивирования у пациенток в зависимости от ИМТ. I – бластоцисты отличного и хорошего качества, II – бластоцисты плохого качества, III – эмбрионы, не сформировавшие бластоцисту.

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.

3.6.3. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту наступления беременности у пациенток с эндометриозом

Для оценки факторов, влияющих на исходы ВРТ у пациенток в зависимости от наличия эндометриоза, были выделены подгруппы пациенток: группа 1.5 – пациентки с эндометриозом и/или аденомиозом (перенесшие операции по поводу наружного генитального эндометриоза и/или аденомиоза в анамнезе) и группа 1.6 – пациентки без эндометриоза.

Пациентки с эндометриозом имели в анамнезе меньше беременностей, абортов и внематочных беременностей. Кроме того, пациентки с эндометриозом чаще имели в анамнезе неудачные попытки ВРТ (табл. 3.6.15).

Таблица 3.6.15. Репродуктивный анамнез пациенток с эндометриозом

	Группа 1.5. эндометриоз+ (n = 231)	Группа 1.6. Эндометриоз- (n = 692)	p-value
Беременности, число, %	0 (0 – 1) 41,6%	0 (0 – 2) 51,6%	0,007** 0,005***
Роды, число, %	0 (0 – 0) 16,9%	0 (0 – 0) 20,2%	0,269** 0,154***
Аборты, число, %	0 (0 – 0) 13,0%	0 (0 – 0) 19,8%	0,018** 0,011***
Неразвивающиеся беременности, число, %	0 (0 – 0) 18,2%	0 (0 – 0) 19,2%	0,727** 0,404***
Внематочные беременности, число, %	0 (0 – 0) 9,5%	0 (0 – 0) 16,0%	<0,016** 0,008***
Программы ВРТ в анамнезе, число, %	1 (0 – 2) 48,9%	0 (0 – 1) 42,9%	0,062** 0,065***
Продолжительность бесплодия, лет	5 (3 – 7)	5 (3 – 6)	0,597**

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

Пациентки с эндометриозом и их супруги были несколько старше, чем пациентки без эндометриоза (табл. 3.6.16).

Таблица 3.6.16. Антропометрические характеристики пациенток с эндометриозом

	Группа 1.5. эндометриоз+ (n = 231)	Группа 1.6. Эндометриоз- (n = 692)	p-value
Возраст, лет	35 (32 – 39)	34 (31 – 39)	0,036**
Возраст супруга, лет	36 (33 – 42)	35 (32 – 40)	0,008**
Рост, см	167,8 ± 5,5	165,4 ± 5,9	0,004*
Вес, кг	64,7 ± 13,1	64,3 ± 12,2	0,822*
ИМТ, кг/м ²	23,0 ± 4,3	23,5 ± 4,2	0,372*

* t-test; ** тест Манна-Уитни.

Для пациенток с эндометриозом были характерны следующие особенности менструальной и сексуальной функции: их менструальный цикл был короче, жалобы на нерегулярные менструации встречались реже, а жалобы на болезненные менструации – чаще, чем у пациенток без эндометриоза. Возраст начала половой жизни был несколько выше у пациенток с эндометриозом (табл. 3.6.17).

Таблица 3.6.17. Особенности менструального цикла и сексуальной функции пациенток с эндометриозом

Параметр	Группа 1.5. эндометриоз+ (n = 231)	Группа 1.6. Эндометриоз- (n = 692)	p-value
Возраст менархе, лет	13 (12 – 14)	13 (12 – 14)	0,065**
Длительности цикла, дней	28 (27 – 29)	28 (28 – 29)	0,037**
Длительность менструации, дней	5 (4 – 5,5)	5 (4 – 5)	0,460**
Нерегулярные менструации	13 (2,3%)	41 (7,9%)	<0,001***
Болезненные менструации	39 (16,9%)	79 (11,4%)	0,023***
Возраст начала половой жизни, лет	18 (18 – 20)	18 (17 – 19)	<0,001**

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

У пациенток с эндометриозом чаще встречалась миома матки (33,7% против 17,8%, соответственно, $p < 0,001$), миомэктомия (18,6% против 7,7%, $p < 0,001$), резекция яичников (43,7% против 9,0%, $p < 0,001$), сальпингоовариолизис (22,5% против 12,6%, $p < 0,001$) и вмешательства на эндометрии (47,7% против 41,1%, $p = 0,034$) в анамнезе.

У пациенток с эндометриозом реже применялись препараты рФСГ без добавления чМГ, а если и назначались, то в более высоких дозировках, чем у пациенток без эндометриоза (табл. 3.6.18).

Таблица 3.6.18. Особенности протокола овариальной стимуляции у пациенток с эндометриозом

Параметр	Группа 1.5. эндометриоз+ (n = 231)	Группа 1.6. Эндометриоз- (n = 692)	p-value
Овариальная стимуляция			
рФСГ, %	42 (18,2%)	210 (30,4%)	< 0,001 ***
рФСГ, МЕ	1489 ± 471	1302 ± 394	0,009 **
чМГ, %	54 (23,4%)	178 (25,7%)	0,268***
чМГ, МЕ	1605 ± 545	1607 ± 539	0,951**
рФСГ+чМГ, %	112 (48,5%)	248 (35,8%)	< 0,001 ***
рФСГ+чМГ, МЕ	2104 ± 556	1989 ± 593	0,106**
Корифоллитропин альфа, %	23 (10,0 %)	56 (8,1%)	0,227***
Триггер овуляции			
ХГЧ, %	174 (75,0%)	519 (75,3%)	0,499***
ХГЧ+Трипторелин, %	57 (25,0%)	173 (24,7%)	0,499***

** тест Манна-Уитни; *** точный тест Фишера.

У пациенток с эндометриозом было получено меньшее число ОКК и бластоцист и более низкое количество полученных ооцитов и эмбрионов (табл. 3.6.19).

Таблица 3.6.19. Особенности эмбриологического этапа у пациенток с эндометриозом

Параметр	Группа 1.5. эндометриоз+ (n = 231)	Группа 1.6. Эндометриоз- (n = 692)	p-value
Число полученных ооцит-кумулясных комплексов	5 (2 – 8)	7 (4 – 11)	< 0,001 **
Число ооцитов МП-стадии	4 (2 – 6)	5 (3 – 8)	< 0,001 **
Число зигот	3 (2 – 6)	4 (2 – 7)	< 0,004 **
Частота оплодотворения	86,7%±20,8%	86,6%±18,1%	0,935*
Число бластоцист	2 (1 – 3)	3 (1 – 4)	< 0,012 **
в т.ч. «отличного» качества	1 (1 – 1)	2 (1 – 2)	< 0,046 **
в т.ч. «высокого» качества	1 (1 – 2)	2 (1 – 3)	< 0,045 **
Число перенесенных эмбрионов:			0,160
- один;	133 (57,6%)	489 (70,7%)	
- два.	30 (13,0%)	85 (12,3%)	

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

Несмотря на выявленные отличия в подгруппах пациенток, ЧНБ у пациенток с эндометриозом не отличалась от ЧНБ пациенток без эндометриоза 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 в целом КММВ не оказывала значимого эффекта на ЧНБ, однако у пациенток группы 1.6 (без эндометриоза) она оказывала несколько больший благоприятный эффект ($\Delta = 6,5\%$), чем у пациенток с эндометриозом ($\Delta = 2,4\%$) (табл. 3.6.20).

Таблица 3.6.20. Влияние эндометриоза на частоту наступления беременности, в зависимости от способа культивирования эмбрионов

Наступление беременности	Группа 1 (n = 166)	Группа 2 (n = 757)	p-value
Эндометриоз + (n = 231)	14/44 (31,8%)	55/187 (29,4%)	0,442*** $\Delta = 2,4\%$
Эндометриоз – (n = 692)	42/122 (34,4%)	159/570 (27,9%)	0,092*** $\Delta = 6,5\%$
p-value	0,453*** $\Delta = -2,6\%$	0,377*** $\Delta = 1,5\%$	

Δ – разница между частотой наступления беременности в группах микровибрации и контроля *** точный тест Фишера.

Далее мы провели анализ влияния КММВ на развитие бластоцист в зависимости от наличия эндометриоза (табл. 3.6.21).

В обобщенном виде влияние КММВ на качество эмбрионов пациенток в зависимости от наличия эндометриоза представлено на рисунке 3.6.3.

Было выявлено, что у пациенток с эндометриозом микровибрация оказывала наиболее выраженный положительный эффект на качество эмбрионов. Так, у пациенток с эндометриозом число бластоцист отличного и хорошего морфологического качества было на 6,8% выше в группе микровибрации (34,8% против 28,0%), число бластоцист низкого качества – на 3,2% ниже в группе микровибрации (7,3% против 10,5%), число

эмбрионов, не сформировавших бластоцисту – на 3,6% ниже в группе микровибрации (57,9% против 61,5%). У пациенток без эндометриоза 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%).

Таблица 3.6.21. Качество эмбриона в зависимости от условий культивирования у пациенток с эндометриозом

Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты пациенток с эндометриозом						Всего
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	
А	А	0,0%	-0,9%	2,0%	2,4%	2,0%		5,5%
А	В	-0,1%	0,8%	-0,2%	-0,5%	0,6%		0,6%
А	С				-0,1%			-0,1%
В	А			-0,6%	0,8%	-0,1%		0,1%
В	В	-0,1%	-0,7%	-1,2%	0,4%	1,3%		-0,4%
В	С		0,3%	-0,1%	-0,4%			-0,3%
С	А							0,0%
С	В							0,0%
С	С	0,5%	-0,5%	-1,6%	0,0%	-0,1%		-1,7%
Всего		0,3%	-0,9%	-1,7%	2,5%	3,5%		3,7%
Кавитирующая морула		0,4%	Морула	2,8%	Отдельные бластомеры	-5,5%	Дегградация эмбриона	-1,3%
Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты пациенток без эндометриоза						Всего
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	
А	А	0,6%	0,5%	1,0%	-0,4%	0,3%	0,0%	1,8%
А	В	0,1%	-0,6%	-0,2%	-1,0%	-0,1%	0,0%	-1,8%
А	С				0,2%	0,0%		0,1%
В	А		-0,1%	0,7%	1,1%	0,0%	0,0%	1,6%
В	В		-0,5%	0,1%	-0,7%	0,0%	0,1%	-1,0%
В	С		0,0%	0,1%	-0,2%			-0,2%
С	А							
С	В			0,3%	0,0%			0,2%
С	С	0,6%	-0,2%	-0,6%	-0,3%			-0,5%
Всего		1,3%	-0,9%	1,3%	-1,5%	0,2%	0,0%	0,4%
Кавитирующая морула		0,6%	Морула	0,0%	Отдельные бластомеры	-0,9%	Дегградация эмбриона	-0,2%

Разница долей (дельта) (группа микровибрации минус группа сравнения) рассчитана для каждого морфологического класса эмбриона. Черным цветом отмечены ячейки с бластоцистами отличного и хорошего качества, красным цветом – с эмбрионами плохого качества.

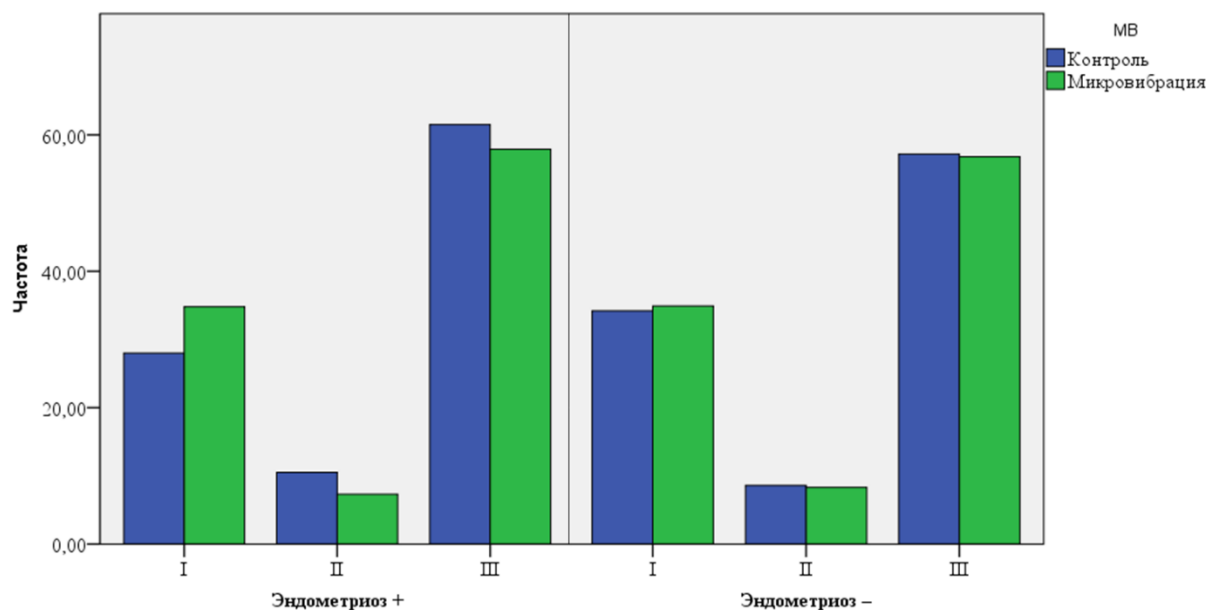


Рисунок 3.6.3. Качество эмбрионов в зависимости от условий культивирования у пациенток в зависимости от наличия эндометриоза. I – бластоцисты отличного и хорошего качества, II – бластоцисты плохого качества, III – эмбрионы, не сформировавшие бластоцисту.

Далее мы провели анализ влияния КММВ на развитие бластоцист в зависимости от наличия аденомиоза или НГЭ (табл. 3.6.22, рис. 3.6.4.).

В обобщенном виде влияние КММВ на качество эмбрионов пациенток с эндометриозом представлено на рисунке 3.6.4. Было выявлено, что у пациенток с аденомиозом микровибрация оказывала положительный эффект на качество эмбрионов. Так, у пациенток с аденомиозом число бластоцист отличного и хорошего морфологического качества было на 10,8% выше в группе микровибрации (37,5% против 26,7%), число бластоцист низкого качества – на 5,0% ниже в группе микровибрации (5,5% против 10,5%), число эмбрионов, не сформировавших бластоцисту – на 5,8% ниже в группе микровибрации (57,0% против 62,8%). У пациенток с наружным генитальным эндометриозом 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%).

Таблица 3.6.22. Качество эмбриона в зависимости от условий культивирования у пациенток с аденомиозом и НГЭ

Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты пациенток с аденомиозом						
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	Всего
A	A	-0,6%	-1,2%	2,7%	5,0%	2,1%		8,0%
A	B	0,0%	0,6%	0,4%	-1,0%	0,8%		0,7%
A	C				0,0%			0,0%
B	A			-0,6%	1,0%	0,0%		0,4%
B	B		-0,8%	-1,2%	0,6%	1,2%		-0,5%
B	C		0,4%	-0,2%	-0,4%			-0,2%
C	A							
C	B			0,0%	0,0%			0,0%
C	C	0,2%	-0,8%	-1,4%	-0,4%			-2,6%
Всего		-0,6%	-1,8%	-0,3%	4,7%	3,9%	0,0%	5,8%
Кавитирующая морула		0,1%	Морула	2,6%	Отдельные бластомеры	-6,8%	Дегградация эмбриона	-1,7%
Бластоциста		Степень зрелости бластоцисты пациенток с НГЭ						
ВКМ	ТЭ	1	2	3	4	5	6	Всего
A	A	0,4%	0,0%	0,1%	-1,1%	0,4%		-0,1%
A	B	-0,1%	0,4%	-0,4%	0,3%	0,0%		0,1%
A	C				-0,1%			-0,1%
B	A			-0,1%	0,1%	-0,1%		-0,2%
B	B		-0,1%	-0,3%	0,0%	0,4%		0,0%
B	C		0,0%	0,0%	-0,1%			-0,1%
C	A							0,0%
C	B							0,0%
C	C	0,4%	0,1%	-0,6%	0,3%			0,3%
Всего		0,7%	0,4%	-1,3%	-0,7%	0,7%		-0,2%
Кавитирующая морула		0,4%	Морула	1,0%	Отдельные бластомеры	-0,4%	Дегградация эмбриона	-0,0%

Разница долей (дельта) (группа микровибрации минус группа сравнения) рассчитана для каждого морфологического класса эмбриона. Черным цветом отмечены ячейки с бластоцистами отличного и хорошего качества, красным цветом – с эмбрионами плохого качества.

Таким образом, в общей группе пациенток с эндометриозом микровибрация приводит к выраженному повышению числа бластоцист отличного и хорошего качества за счет снижения числа бластоцист низкого качества и эмбрионов, не достигших стадии бластоцисты, за счет пациенток с аденомиозом. У пациенток без эндометриоза наблюдается сходный эффект,

который, однако, носит менее выраженный характер. У пациенток с НГЭ эффект носит обратный характер.

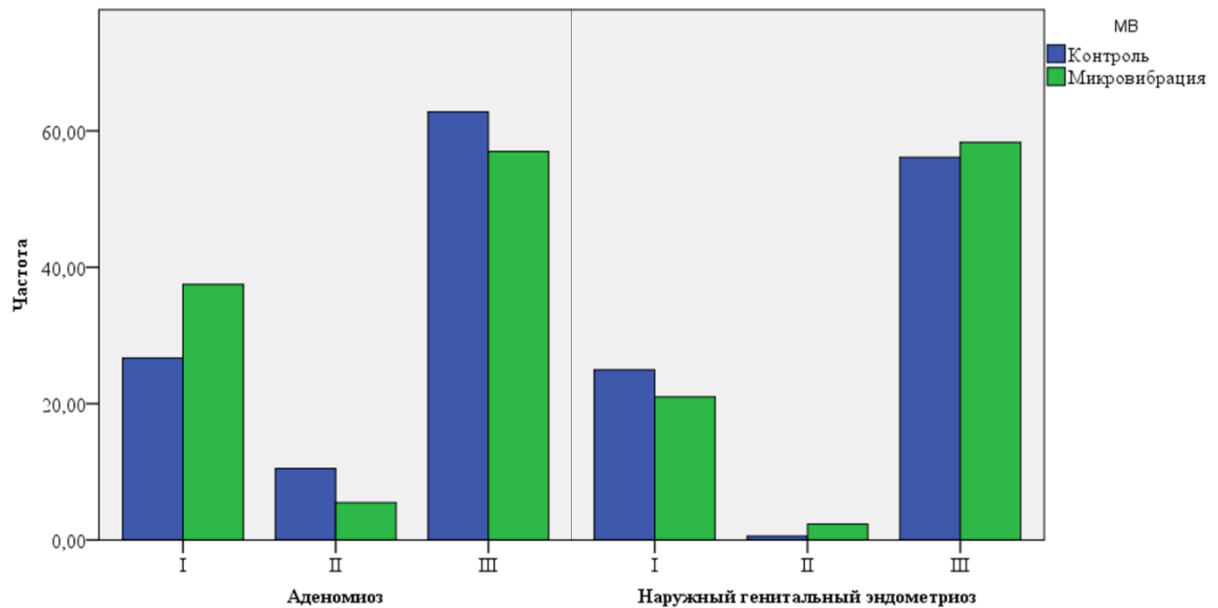


Рисунок 3.6.4. Качество эмбрионов в зависимости от условий культивирования у пациенток с аденомиозом и НГЭ.

I – бластоцисты отличного и хорошего качества, II – бластоцисты плохого качества, III – эмбрионы, не сформировавшие бластоцисту.

3.7. Влияние контролируемой механической микровибрации на течение беременности и частоту живорождения

На данном этапе работы мы проанализировали частоту прерывания беременности и частоту живорождения (табл. 3.7.1), частоту внутриутробной гибели плода, антропометрические данные новорожденных детей.

Частота клинической беременности была значимо выше в группе 1 (32,5%), чем в группе 2 (24,3%), $p = 0,019$. Частота рождения живого здорового ребенка была также выше в группе 1 (32,5%), чем в группе 2 (19,2%), $p = 0,049$. При расчете на число клинических беременностей, частота многоплодной беременности составила 3,7% в группе 1 и 5,4% в группе 2 ($p = 0,462$), частота неразвивающихся беременностей – 18,5% и 19,6%, соответственно ($p = 0,519$), частота внематочных беременностей – 3,7% и 1,6%, соответственно ($p = 0,318$). В группе 2 одна беременность была

прервана по медицинским показаниям (ВПП плода), четыре беременности закончились внутриутробной гибелью плода.

Таблица 3.7.1. Исходы беременностей у наблюдаемых пациенток

Параметр	Группа 1 (n = 166)	Группа 2 (n = 757)	p-value
Беременность (ХГЧ)	56 (33,7%)	214 (28,3%)	0,096***
Беременность (УЗИ)	54 (32,5%)	184 (24,3%)	0,019***
Роды	42 (25,3%)	145 (19,2%)	0,049***
- одноплодные	40 (24,1%)	135 (17,8%)	0,469***
- двойней	2 (1,2%)	10 (1,3%)	
Прерывание беременности:	12 (7,2%)	39 (5,2%)	0,189***
- неразвивающаяся	10 (6,0%)	36 (4,8%)	0,304***
- внематочная	2 (1,2%)	3 (0,4%)	0,222***
- по медицинским показаниям (ВПП)	0	1 (0,1%)	1,000***
Внутриутробная гибель плода	0	4 (0,5%)	0,452***

*** точный тест Фишера.

Применение КММВ не оказывало влияния на пол и антропометрические данные новорожденных. В группе 1 было рождено 23 здоровых мальчика (52,3%) и 21 здоровая девочка (47,7%). В группе 2 было рождено 77 (50,0%) здоровых мальчиков и 77 (50,0%) здоровых девочек ($p = 0,462$). Масса тела при рождении составила 3400 (3140 – 3650) г и 3260 (2975 – 3570) г, соответственно ($p = 0,102$). Длина тела при рождении составила 52 (51 – 54) см и 52 (50 – 54) см, соответственно ($p = 0,091$). Статистически значимых различий между группами выявлено не было.

3.8. Влияние контролируемой механической микровибрации на метаболомный профиль сред культивирования эмбрионов человека пятых суток развития

В данную часть исследования были включены культуральные среды 30 пациенток: 20 пациенток группы 1 и 30 пациенток группы 2. При анализе

клинико-лабораторных данных пациенток было выявлено, что пациентки, включенные в анализ, не различались по антропометрическим, клинико-лабораторным и анамнестическим данным. Средний возраст пациенток составил 32 (31 – 36,5) лет ($p = 0,134$). Все эмбрионы соответствовали бластоцистам отличного и хорошего морфологического качества.

В результате обработки масс-спектров в СК от 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 (рис. 3.8.1).

Для выявления наиболее значимых метаболитов, обуславливающих различия между исследуемыми группами, были отобраны метаболиты, статистически значимо различающиеся между группами с разницей общей площади соответствующих пиков (пропорциональной концентрациям веществ) в 2 и более раза между группами. Первичная идентификация найденных молекулярных ионов проводилась с помощью поиска в специализированной базе данных HMDB. Таким образом был выявлен ряд потенциальных метаболитов, изменяющихся под действием КММВ (Приложение 1).

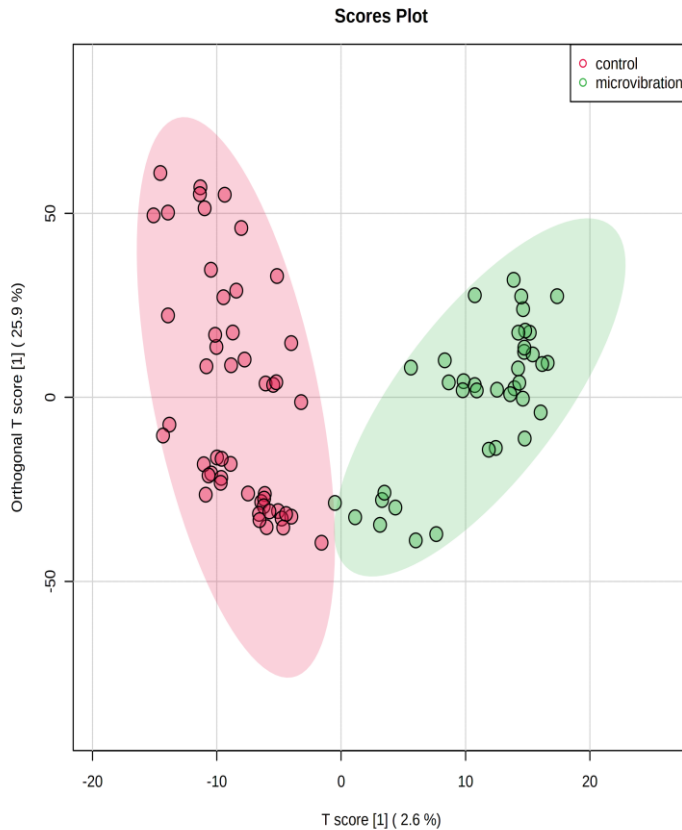


Рисунок 3.8.1. Результаты OPLS-DA анализа профилей метаболитов сред культивирования эмбрионов человека группы контролируемой механической микровибрации (microvibration) и группы контроля (control).

Наиболее значимыми молекулами, уровень которых различался в группах сравнения, являлись прогестерон, глутамин, гидроксипролил-глутамат, лизил-гамма-глутамат, ацетилхолин, олеамид, простагландин A_2 и его конъюгат с глутатионом, 2,3-Динор-Тромбоксан B_2 и 20-Гидрокси-Простагландин E_2 .

Прогестерон – важнейший эндогенный стероид, оказывающий влияние на менструальный цикл, беременность и развитие эмбрионов человека [162]. Согласно полученным данным, содержание прогестерона в СК группы КММВ было в 2,8 раза выше, чем в группе контроля.

Глутамин – одна из 20 стандартных аминокислот, входящих в состав белка. Аминокислоты играют важную роль в преимплантационном развитии эмбриона, служат источниками энергии, биосинтетическими

предшественниками, буферами внутриклеточного рН, антиоксидантами и регуляторами клеточной дифференцировки [107–109]. Потребление аминокислот является одним из развивающихся методов оценка качества и имплантационного потенциала эмбрионов [103, 163]. Известно, что потребление глутамина в СК эмбрионов ассоциировано с развитием эмбрионов первых трех суток развития [164]. Кроме того, потребление аспартата и глутамина связано с функцией митохондрий развивающегося эмбриона [165]. Согласно полученным данным, содержание глутамина в СК группы КММВ было в 2,3 раза ниже, чем в группе контроля. Важно учитывать, что при 37°C, аминокислоты спонтанно дезаминируют и высвобождают аммоний, причем глутамин является наиболее лабильным. Накопление аммония ингибирует развитие эмбриона, изменяет их метаболизм и экспрессию генов [166].

Другой важной для метаболизма эмбриона аминокислотой является глутамат. Так, для 2-3-дневных эмбрионов, развивающихся в дальнейшем до стадии бластоцисты, характерно более низкое поглощение глутамина, аргинина и метионина, а также более низкое выделение аланина и аспарагина, по сравнению с эмбрионами, не формирующими бластоцисту [112]. Снижение уровня глицина и лейцина, повышение содержания аспарагина и глутамата в СК связаны с повышением частоты наступления беременности и живорождения [12, 113]. В исследовании было выявлено положительное влияние КММВ на метаболизм глутамата развивающимся эмбрионов – уровень гидроксипролил-глутамата был в 4,8 раза выше, а уровень лизил-гамма-глутамата – в 6,9 раз выше, чем в группе контроля.

Ацетилхолин – важный возбуждающий нейромедиатор, может деполяризовать или гиперполяризовать клеточную мембрану в зависимости от типа рецепторов. Известно, что добавление холина (предшественник ацетилхолина) в СК эмбрионов крупного рогатого скота повышает долю эмбрионов, развивающихся до стадии бластоцисты, число клеток

бластоцисты, долю эмбрионов, способных к самопроизвольному хетчингу [167]. Согласно полученным данным, содержание ацетилхолина в СК группы КММВ было в 3,1 раза выше, чем в группе контроля.

Олеамид представляет собой амид олеиновой кислоты и, вероятно, взаимодействует с несколькими системами нейротрансмиттеров. Крайне важным свойством олеамида является разобщение межклеточных щелевых контактов [168, 169]. В норме разобщение щелевых контактов происходит только на стадии декомпактизированной морулы и не характерно для других стадий развития эмбриона. Согласно полученным данным, содержание олеамида в СК группы КММВ было в 2,2 раза ниже, чем в группе контроля.

Также было выявлено четыре метаболита различия, относящихся к эйкозаноидам или их производным. Эйкозаноиды состоят из простагландинов (PG), тромбоксанов (TX), лейкотриенов (LT) и липоксинов (LX). Все эйкозаноиды действуют локально в месте синтеза через рецептор-опосредованные сигнальные пути.

Простагландин A_2 или медуллин (PGA_2) – эндогенный метаболит, полученный из арахидоновой кислоты. В высоких концентрациях проявляет антипролиферативную активность. Согласно полученным данным, содержание простагландина A_2 в СК группы КММВ было в 3,0 раза выше, чем в группе контроля, а содержание его метаболита (S-(PGA_2)-glutathione) – было в 3,8 раза ниже.

2,3-Динор-Тромбоксан B_2 – метаболит тромбоксана B_2 . Его экскреция с мочой изучена у пациенток в программах ВРТ и имеет важное прогностическое значение в отношении наступления беременности [170, 171], однако влияние тромбоксана и его метаболитов на развивающийся эмбрион на сегодняшний день изучено недостаточно [172, 173]. Согласно полученным данным, содержание 2,3-Динор-Тромбоксана B_2 в СК группы КММВ было в 2,5 раза выше, чем в группе контроля.

20-Гидрокси-Простагландин E_2 – метаболит простагландина E_2 . В литературе описана значимая роль простагландина E_2 в возобновлении мейоза ооцитов и экспансии кумулюса. Изучено его положительное влияние на поглощение глюкозы развивающимся эмбрионом, качество бластоцисты, а также – антиоксидантное действие [174–176]. Согласно полученным данным, содержание 20-Гидрокси-Простагландина E_2 в СК группы КММВ было в 2,5 раза выше, чем в группе контроля.

Проведенный анализ метаболических путей позволил выявить два наиболее значимых (рис. 3.8.2) – путь биосинтеза фосфолипидов, входящих в состав всех клеточных мембран; и путь метаболизма фенилацетата, отвечающий, в первую очередь, за выведение азотистых оснований при метаболизме аминокислот.

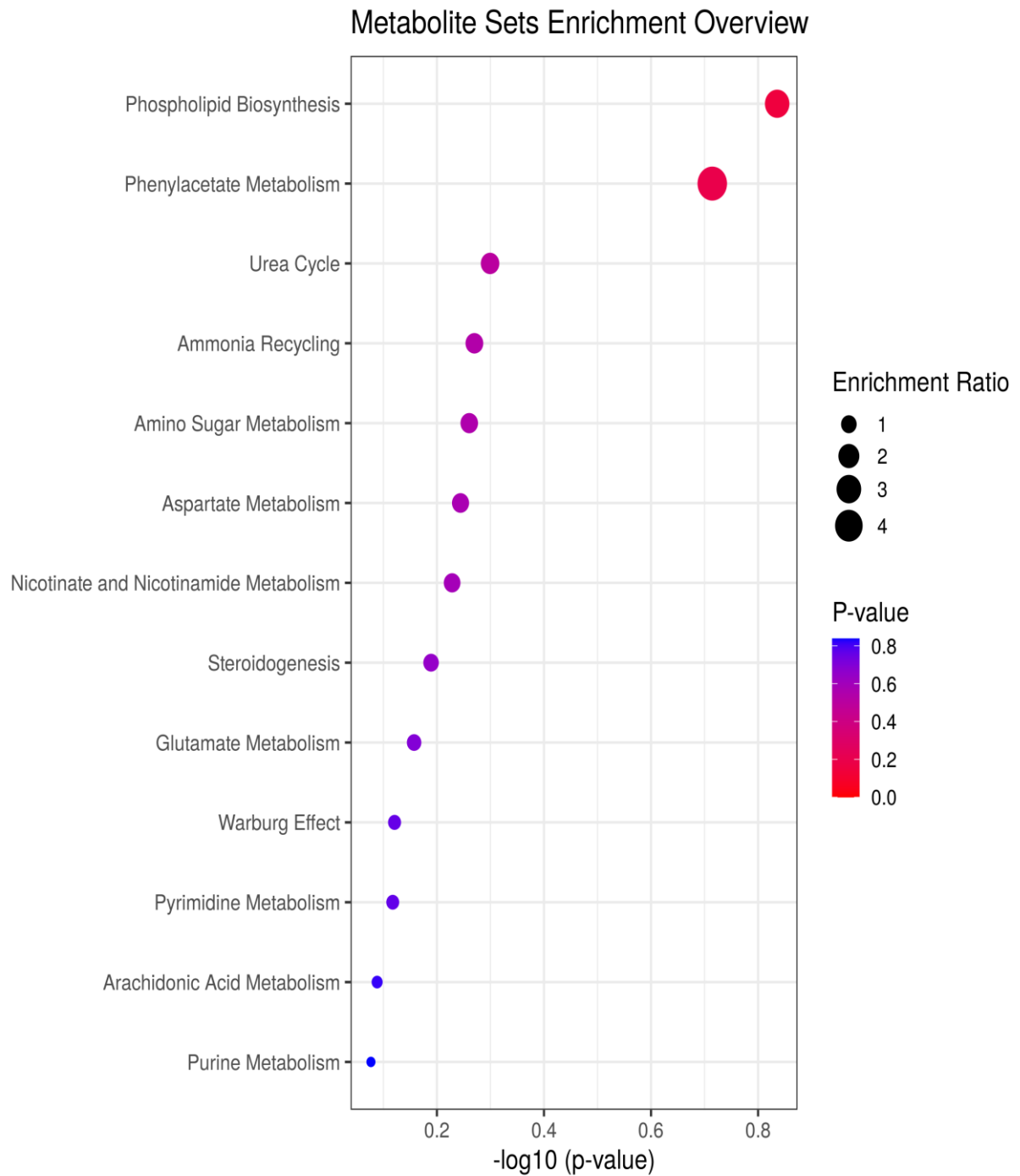


Рисунок 3.8.2. Метаболические пути, подверженные влиянию контролируемой механической микровибрации при культивировании эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Клинико-анамнестические факторы, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий

Для решения задачи 1 все пациентки были разделены на две группы в зависимости от наступления беременности. В группу А вошли пациентки с наступившей беременностью ($n = 270$), в группу Б вошли пациентки, у которых беременность не наступила ($n = 653$). Таким образом, общая частота наступления беременности составила 29,3%.

На первом этапе работы мы проанализировали клинико-анамнестические данные пациенток в группах сравнения. Возраст обоих супругов был ожидаемо ниже в супружеских парах с наступившей беременностью. При проведении ROC-анализа ($AUC = 0,629$) пороговым возрастом пациентки был возраст 35,5 лет, относительный риск наступления беременности ($OR_{БЕР}$) составил 2,0 (95% ДИ=1,1; 3,7). Пороговым возрастом супруга составил возраст 39,5 лет ($AUC = 0,593$), $OR_{БЕР} = 1,8$ (95% ДИ=1,0; 3,4). Полученные результаты связаны со снижением количества и качества гамет, а также – значительным повышением частоты хромосомных аномалий [177–179].

Согласно данным мета-анализа Sermondade N. et al. (2019), ожирение пациентки значительно снижает эффективность лечения бесплодия методами ВРТ [180]. Однако средний ИМТ пациенток не различался в группах сравнения. Это было связано с тем, что у подавляющего большинства пациенток ИМТ был нормальным или незначительно повышенным (избыточная масса тела). Ожирение было диагностировано только у 21 пациентки (2,3%), из них ожирение I степени – у 16 пациенток, ожирение II

степени – у 3 пациенток, ожирение III степени – у 2 пациенток. Из них беременность наступила у шести пациенток (28,6%).

При анализе особенностей менструального цикла пациенток в группе с наступившей беременностью пациентки характеризовались большей длительностью менструального цикла и продолжительностью менструаций. Однако оба факторы были в первую очередь связаны с возрастом пациенток – коэффициент корреляции (r) составил $-0,199$ ($p < 0,001$) для длительности менструального цикла и $-0,247$ ($p < 0,001$) для длительности менструации. Кроме того, сами различия длительности цикла и длительности менструации были минимальными и клинически не значительными. Также с возрастом повышалась частота нерегулярных менструаций. Однако скорректированное отношение шансов ($OШ_{КОР}$) составило 1,2 (95% ДИ=1,1; 1,4). Таким образом, нарушение менструального цикла является фактором, снижающим частоту наступления беременности независимо от возраста.

Литературные данные о влиянии различных форм миомы матки и её размеров, необходимости выполнения миомэктомии перед проведением программы ВРТ достаточно противоречивы [181–184]. При оценке особенностей гинекологического анамнеза пациенток миома матки была ассоциирована с низкой частотой наступления беременности, однако проведение миомэктомии в анамнезе не повышало вероятность наступления беременности.

Важно отметить, что в исследование вошли только пациентки с отсутствием показаний к оперативному лечению миомы матки, поскольку в данном случае проведение программы ВРТ не рекомендовано [185–189], [190].

При анализе сопутствующих соматических заболеваний было показано, что для пациенток с не наступившей беременностью частота нарушений эндокринной системы (преимущественно – гипотиреоз) была на 8,7% выше, чем у пациенток с наступившей беременностью. В литературе имеются

доказательства того, что заболевания щитовидной железы неблагоприятно влияют как на естественную фертильность, так и на исходы программ ВРТ [191–193].

4.2. Особенности овариальной стимуляции, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий

Овариальную стимуляцию проводили по протоколу с анТГнРГ. У пациенток группы 1 для овариальной стимуляции препараты рФСГ для ежедневного введения были использованы значительно чаще (34,4%), чем у пациенток группы 2, что было связано с более молодым возрастом пациенток группы 1 [194]. Более высокие дозы ХГЧ в качестве триггера овуляции в группе 1 также были связаны с возрастом пациенток и большим числом фолликулов в день назначения триггера овуляции.

4.3. Эмбриологические факторы, влияющие на частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий

При анализе особенностей эмбриологического этапа, на наступление беременности оказывали влияние число полученных ООК, число ооцитов МII-стадии и число успешно оплодотворенных ооцитов (2pn). С одной стороны, это было обусловлено более молодым возрастом пациенток. С другой стороны, особенно у пациенток позднего возраста, большое число ооцитов и эмбрионов, полученное в программе ВРТ, повышает шансы получения эуплоидного эмбриона отличного качества для переноса в полость матки [195, 196].

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 и трофэктодермы [197]. ЧНБ выше 50% была достигнута при переносе бластоцисты класса 4АА, 5АА, 4АВ и 4ВА. При переносе бластоцисты класса 3АА, 3АВ, 3ВВ, 2АА, 2ВВ ЧНБ варьировала в диапазоне от 30 до 50%.

4.4. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту оплодотворения ооцитов и эмбриональное развитие первых пяти суток культивирования

Значимых различий частоты оплодотворения ооцитов в зависимости от условий культивирования эмбрионов выявлено не было. Несколько выше в группе микровибрации была эффективность оплодотворения методом ЭКО, однако различия не достигли уровня статистической значимости. По всей видимости, современный уровень развития лабораторных технологий в данной области уже является достаточным для обеспечения предельно высокого уровня оплодотворения ооцитов в рамках программ ВРТ. Сходные данные были получены в других исследованиях последних лет [147].

Затем мы провели морфологическую оценку качества 952 эмбрионов группы микровибрации и 3369 эмбрионов контрольной группы. В литературе присутствуют противоречивые данные о влиянии КММВ на частоту бластуляции эмбрионов [7, 15, 136, 139, 148]. Согласно полученным данным, частота формирования морулы и бластоцисты не различалась в группах сравнения. Тем не менее, при более подробном анализе был выявлен ряд особенностей – при культивировании в условиях КММВ повышалось число эмбрионов первой и пятой степеней зрелости. Более выраженное положительное влияние КММВ на качество эмбрионов заключалось в повышении числа эмбрионов АА и ВА классов.

Важным методом увеличения кумулятивной частоты наступления беременности в программах ВРТ является криоконсервация эмбрионов [198–201]. Криоконсервация эмбрионов представляется крайне важной в свете

целесообразности селективного переноса одного эмбриона в полость матки [202, 203]. При этом данные о возможности криоконсервации эмбрионов при культивировании в условиях КММВ в литературе отсутствуют. Согласно полученным данным, применение КММВ позволило увеличить частоту криоконсервации эмбрионов с 41,1 до 59,0%, а также повысить число эмбрионов, пригодных для проведения криоконсервации.

4.5. Влияние контролируемой механической микровибрации на частоту наступления беременности в зависимости от клинико-анамнестических данных пациенток

Главной целью применения КММВ является повышение эффективности программ ВРТ – ЧНБ и рождения живого здорового ребенка [7, 15]. Применение КММВ позволило повысить ЧНБ на 5,4% – с 28,3 до 33,7%, что подтверждает данные о положительном влиянии микровибрации на имплантационный потенциал эмбрионов человека в программах ВРТ [138].

Крайне важным для всех дополнительных эмбриологических методик является определение показаний (и противопоказаний) к их применению [196, 204–207]. Показания определяются в первую очередь соотношением предполагаемой пользы методики и возможных рисков её применения. С целью выделения более четких показаний к КММВ, мы проанализировали ЧНБ в различных клинических группах пациенток.

У пациенток 18-36 лет контролируемая механическая микровибрация оказывала больший благоприятный эффект на ЧНБ, чем у пациенток 37-45 лет, что связано с более позитивным влиянием на бластуляцию эмбрионов у более молодых пациенток по сравнению с пациентками позднего репродуктивного возраста. Наши данные не согласуются с данными Isachenko V. et al. (2017), согласно которым применение микровибрации в программах ВРТ способствовало повышению частоты живорождения у

пациенток 30 лет и старше [7]. Данные различия, по всей видимости, могут быть обусловлены разницей в условиях культивирования эмбрионов, частотой и продолжительностью КММВ.

Ожирение и избыточная масса тела также являются неблагоприятными прогностическими факторами исхода лечения бесплодия методами ВРТ [180, 212]. Наличие ожирения или избыточной массы тела у пациентки несколько снижало эффективность КММВ, что также было ассоциировано с качеством полученных эмбрионов. Кроме того, ожирение также оказывает негативный эффект на имплантацию и течение беременности, не связанный с качеством ооцитов, что наглядно продемонстрировано в работах с использованием ооцитов донора [213, 214]. В исследовании было выявлено отрицательное влияние микровибрации на качество эмбрионов у пациенток с ожирением и избыточной массой тела, что позволяет предположить, что негативное влияние ожирения на качество ооцитов и развитие эмбрионов носит органический характер, поэтому коррекция данных нарушений при помощи изменения условий культивирования эмбрионов представляется затруднительной.

Затем мы проанализировали влияние эндометриоза, влияние которого на эффективность программ ВРТ доказано во множестве исследований [5, 208–211]. Наличие эндометриоза в анамнезе несколько снижало эффективность КММВ, что может быть обусловлено как отрицательным влиянием НГЭ на качество ооцитов [5], так и общим негативным влиянием на процесс имплантации и наступления беременности [208]. Тем не менее, было выявлено положительное влияние микровибрации на качество эмбрионов у пациенток с эндометриозом, что позволяет предположить, что в изучаемой группе пациенток с эндометриозом несколько меньшая ЧНБ в группе КММВ при лучшем качестве бластоцист была обусловлена преимущественно дефектами имплантации, например, вследствие большей заболеваемости миомой матки и вмешательств на эндометрии в анамнезе в

данной группе пациенток. При стратификации пациенток с эндометриозом на группы с аденомиозом и НГЭ, было выявлено, что данный позитивный эффект влияния КММВ на бластоцисты был достигнут только у пациенток с аденомиозом, но не у пациенток с НГЭ. Это свидетельствует о том, что влияние НГЭ на качество ооцитов и развитие эмбрионов носит органический характер, поэтому коррекция данных нарушений при помощи изменения условий культивирования эмбрионов представляется затруднительной.

Учитывая вышеизложенное, был разработан алгоритм применения контролируемой механической микровибрации при культивировании эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий (Приложение 2).

4.6. Влияние контролируемой механической микровибрации на метаболомный профиль сред культивирования эмбрионов человека пятых суток развития

Культивирование эмбрионов в условиях КММВ является новым подходом к оптимизации условий культивирования эмбрионов человека в программах ВРТ, направленным на приближение условий культивирования к естественным. Тем не менее, влияние КММВ на преимплантационное развитие эмбриона человека и отдаленные исходы изучено недостаточно.

Наиболее благоприятным завершением программы ВРТ является селективный перенос одного эмбриона в полость матки, однако морфологической оценки может быть недостаточно для выбора эмбриона с максимальным имплантационным потенциалом. Метаболическое профилирование является многообещающим инструментом дополнительной оценки качества и имплантационного потенциала эмбриона человека в программах ВРТ [163]. В данной работе мы изучили влияние КММВ на профиль метаболитов СК эмбрионов человека, выявили 30 метаболитов различия, а именно: липиды и липидоподобные молекулы (17), органические

кислоты и их производные (6), азотсодержащие органические соединения (2), бензеноиды (1).

Выявленные молекулы относились в основном к регуляторным молекулам (прогестерон, ацетилхолин, олеамид, простагландин A_2 и его конъюгат с глутатионом, 2,3-Динор-Тромбоксан B_2 и 20-Гидрокси-Простагландин E_2), аминокислотам и их метаболитам (глутамин, гидроксипролил-глутамат, лизил-гамма-глутамат). Многие из них обладают доказанным действием на развитие эмбрионов человека и млекопитающих, роль других остается малоизученной.

Было выявлено, что содержание таких веществ, как: прогестерон, лизил-гамма-глутамат, ацетилхолин, простагландин, 2,3-Динор-Тромбоксан B_2 , 20-Гидрокси-Простагландин E_2 повышается в культуральной среде эмбриона при проведении КММВ, а содержание таких веществ как: глутамин и олеамид – понижается. Повышение выше указанных веществ в культуральной среде эмбрионов отличного и хорошего качества под влиянием КММВ свидетельствует о повышении метаболизма эмбрионов в данных условиях культивирования и может быть критерием оценки «здоровья эмбриона».

Снижение уровня глутамина в среде культивирования эмбриона обусловлено его активным потреблением в качестве питательного субстрата, поскольку данная аминокислота является одним из основных источников АТФ для развивающегося эмбриона [215]. Таким образом, снижение уровня глутамина также связано с активацией метаболических процессов эмбриона человека, направленных на его рост и развитие.

Снижение уровня олеамида также является отражением развития эмбриона человека. Одна из основных его функций – разобщение межклеточных щелевых контактов [168, 169]. В норме разобщение щелевых контактов происходит только на стадии декомпактизированной морулы и не характерно для других стадий развития эмбриона. Таким образом, падение

синтеза олеаида является необходимым для дальнейшего физиологического развития эмбриона человека и поддержания морфофункциональной целостности его внутренней клеточной массы и трофэктодермы.

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 [216, 217]. Кроме того, они вовлечены в широкий спектр сигнальных путей и являются предшественниками таких биологически активных молекул как лизофосфатидилхолины и эйкозаноиды [218]. 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 фенилпируват, 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 blastocyst (на 29,3%) и blastocyst класса 4AA и 4AB 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 blastocyst отличного и хорошего качества (число эмбрионов класса 6BB, 5AA, 5BB, 4AA, 4AB, 4BA, 4BB, 3AA, 3AB, 3BA, 3BB – повышается на 2,1%), и снижении числа blastocyst плохого качества (число эмбрионов класса 1CC, 1CA, 1B, 1AA, 2CC, 2BC, 2BB, 2AB, 2BA, 2AA, 3CC, 3CB, 4CC, 4BC, 4AC – уменьшается на 0,6%) и эмбрионов, не способных сформировать blastocyst.

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 значение 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.

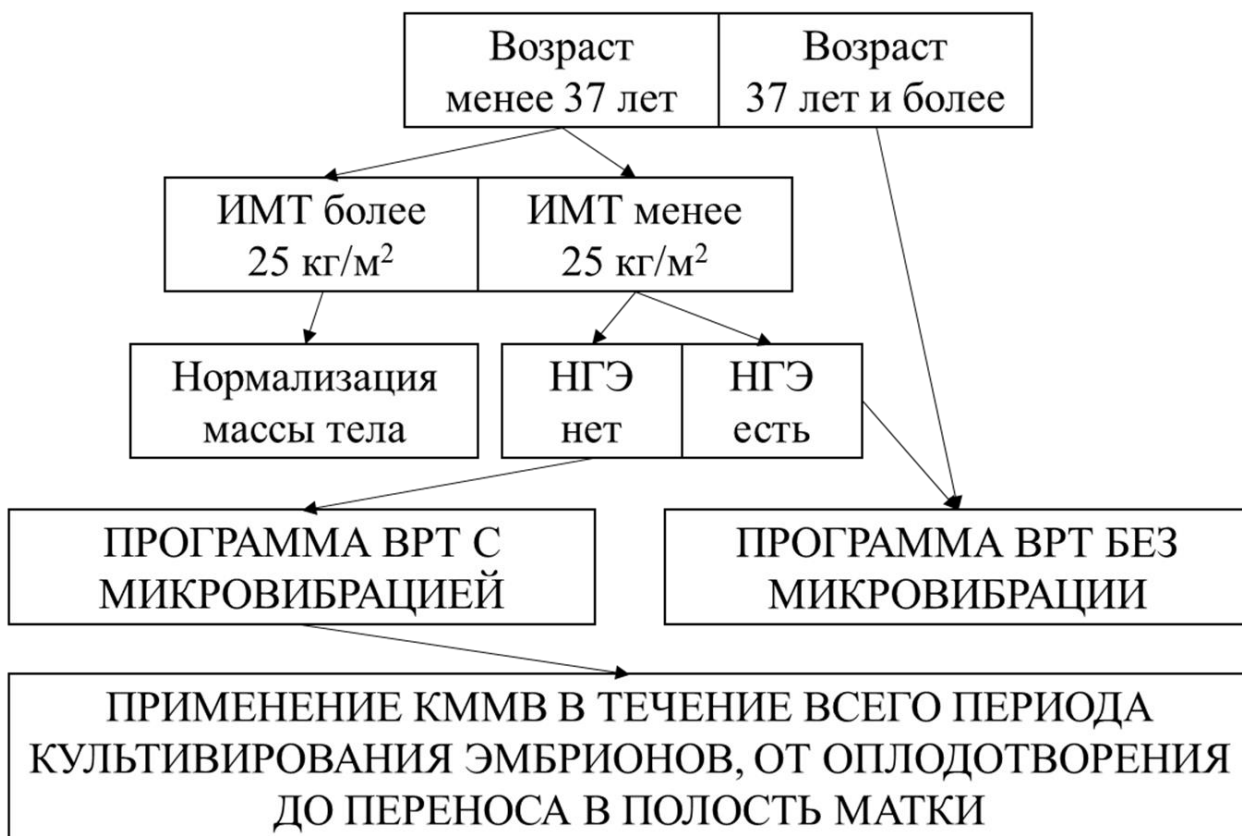
4. Пациенткам группы риска получения эмбрионов плохого качества (с ожирением и избыточной массой тела, с наружным генитальным эндометриозом) применение контролируемой механической микровибрации рекомендовано после лечения данных заболеваний, так как данная методика не оказывает позитивного воздействия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

Приложение 1. Метаболиты различия

m/z	Название	Кратность изменений*
147,0787417	Глутамин (<i>L-Glutamine</i>)	-2,25
140,1183974	Na,Na-Диметилгистамин (<i>Na,Na-Dimethylhistamine</i>)	-2,24
168,0733395	4-гуанидинобутановая кислота (<i>4-Guanidinobutanoic acid</i>)	-2,35
184,0723932	Ацетилхолин (<i>Acetylcholine</i>)	3,11
253,0934554	Валилпролин (<i>Valylproline</i>)	3,68
261,1110391	Гидроксипролил-глутамат (<i>Hydroxyprolyl-Glutamate</i>)	4,82
275,1733379	Лизил-гамма-глутамат (<i>Lysyl-Gamma-glutamate</i>)	6,87
280,2631355	Линолеамид (<i>Linoleamide</i>)	-2,65
300,1146285	Фениндамин (<i>Phenindamine</i>)	2,44
315,2311053	Прогестерон (<i>Progesterone</i>)	2,75
320,2367676	Олеамид (<i>Oleamide</i>)	-2,19
323,1476524	Меланостатин (<i>Melanostatin</i>)	2
351,1937576	12,13-дигидроксиоктадека-9,15-диеновая кислота (<i>12,13-DiHODE</i>)	5,62
357,2030583	Простагландин A ₂ (<i>Prostaglandin A₂</i>)	3,02
363,2522401	19,20-дигидроксидокоза-4,7,10,13,16-пентаеновая кислота (<i>19,20-DiHDPA</i>)	-2,26
365,1961734	2,3-Динор-Тромбоксан B ₂ (<i>2,3-Dinor-TXB₂</i>)	2,53
391,2835878	Октадецил фумарат (<i>Octadecyl fumarate</i>)	-2,2
393,2979029	Фофатидилэтаноламин(48:0) (<i>PE(24:0/24:0)</i>)	2,03
407,189473	20-Гидрокси-Простагландин E ₂ (<i>20-Hydroxy-PGE₂</i>)	2,45
445,3356472	1-моноацилглицерин (<i>MG(0:0/24:6(6Z,9Z,12Z,15Z,18Z,21Z)/0:0)</i>)	-2,52
475,3366368	Диацилглицерин(36:2) (<i>DG(18:1(11Z)/18:1(11Z)/0:0)</i>)	-2,23
489,3391617	Дигидросфингозин-1-фосфохолин (<i>LysoSM(d18:0)</i>)	2,13
496,3401794	1-16:0-лизофосфатидилхолин (<i>LysoPC(16:0/0:0)</i>)	-2,18
558,2874547	1-линолеоилглицерофосфохолин (<i>LysoPC(18:2(9Z,12Z)/0:0)</i>)	3,24
639,4144346	Фосфатидилглицерин (26:0) (<i>PG(i-12:0/i-14:0)</i>)	2,35
642,3091962	11-(S-Глутатионил)-простагландин A ₂ (<i>S-(PGA₂)-glutathione</i>)	-3,84

*Группа микровибрации, по сравнению с группой контроля

Приложение 2. Алгоритм применения контролируемой механической микровибрации при культивировании эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий



Список сокращений

аГнРГ	агонисты гонадотропин-рилизинг гормона
АМГ	антимюллеров гормон
антГнРГ	антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона
БИКС	ближняя инфракрасная спектроскопия
ВЭЖХ-МС	высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ВКМ	внутренняя клеточная масса
ВМИ	внутриматочная инсеминация
ВРТ	вспомогательные репродуктивные технологии
ГСГ	гистеросальпингография
ДГЭАС	дегидроэпиандростерон-сульфат
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
E ₂	эстрадиол
ИКСИ	инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита
ИЛ	интерлейкин
ИМТ	индекс массы тела
КАФ	количество антральных фолликулов
КММВ	контролируемая механическая микровибрация
ЛГ	лютеинизирующий гормон
МЕ	международные единицы
МРТ	магнитно-резонансная томография
МС	масс-спектрометрия
НГЭ	наружный генитальный эндометриоз
ООК	ооцит-кумулюсный комплекс
ОШ	отношение шансов
ПГТ	преимплантационное генетическое тестирование
ПГТ-А	преимплантационное генетическое тестирование

	эмбрионов на анеуплоидии
ПГТ-М/СП	преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на моногенные заболевания или структурные хромосомные перестройки
ПНЯ	преждевременная недостаточность яичников
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЭ	перенос эмбриона(ов) в полость матки
рФСГ	рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон
СГЯ	синдром гиперстимуляции яичников
СК	среда культивирования
СПКЯ	синдром поликистозных яичников
Т	тестостерон
Т ₄ _{св}	свободный тироксин
ТВП	трансвагинальная пункция яичников
ТТГ	тиреотропный гормон
ТЭ	трофэктодерма
УЗИ	ультразвуковое исследование
ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
ХГЧ	хорионический гонадотропин человека
ЧНБ	частота наступления беременности
чМГ	человеческий менопаузальный гонадотропин
ЭКО	экстракорпоральное оплодотворение
ЭХО-ГСС	ЭХО-гистеросальпингоскопия
AUC	площадь под кривой
E2	эстрадиол
GV	ооцит стадии зародышевого пузырька
HBs-Ag	HBs-антиген вируса гепатита В
HCV	вирус гепатита С
HMDB	база данных метаболитов человека

IVM	созревание <i>in vitro</i>
MI	ооцит метафазы первого деления мейоза
MII	зрелый ооцит (вторая стадия деления мейоза)
ROC	график, позволяющий оценить качество бинарной классификации (кривая ошибок)
2pn	успешно оплодотворенный ооцит без аномалий оплодотворения

Список литературы

1. Isachenko E., Maettner R., Isachenko V., Roth S., Kreienberg R., Sterzik K. Mechanical agitation during the in vitro culture of human pre-implantation embryos drastically increases the pregnancy rate. *Clin Lab.* 2010; 56(11–12):569–76.
2. Colaco S., Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet.* 2018; 35(11):1953–68.
3. Keefe D., Kumar M., Kalmbach K. Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fertil Steril.* 2015; 103(2):317–22.
4. Broughton D.E., Moley K.H. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertil Steril.* 2017; 107(4):840–7.
5. Sanchez A.M., Vanni V.S., Bartiromo L., Papaleo E., Zilberberg E., Candiani M., et al. Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature. *J Ovarian Res.* 2017; 10(1):43.
6. Matsuura K., Hayashi N., Kuroda Y., Takiue C., Hirata R., Takenami M., et al. Improved development of mouse and human embryos using a tilting embryo culture system. *Reprod Biomed Online.* 2010; 20(3):358–64.
7. Isachenko V., Sterzik K., Maettner R., Isachenko E., Todorov P., Rahimi G., et al. In Vitro Microvibration Increases Implantation Rate After Embryonic Cell Transplantation. *Cell Transplant.* 2017; 26(5):789–94.
8. Steptoe P.C., Edwards R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet (London, England).* 1978; 2(8085):366.
9. Biggers J.D., Summers M.C. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril.* 2008; 90(3):473–83.
10. Loutradis D., Drakakis P., Kallianidis K., Sofikitis N., Kallipolitis G., Milingos S., et al. Biological factors in culture media affecting in vitro fertilization, preimplantation embryo development, and implantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 900:325–35.
11. Chronopoulou E., Harper J.C. IVF culture media: past, present and future. *Hum Reprod Update.* 2015; 21(1):39–55.
12. Brison D.R., Houghton F.D., Falconer D., Roberts S.A., Hawkhead J., Humpherson P.G., et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod.* 2004; 19(10):2319–24.
13. Thompson J.G. Culture without the petri-dish. *Theriogenology.* 2007; 67(1):16–20.
14. Gardner D.K., Lane M. Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reprod Fertil Dev.* 2005; 17(3):361–70.
15. Isachenko V., Maettner R., Sterzik K., Strehler E., Kreinberg R., Hancke K., et al. In-vitro culture of human embryos with mechanical micro-vibration increases implantation rates. *Reprod Biomed Online.* 2011; 22(6):536–44.
16. Fauci L.J., Dillon R. Biofluidmechanics of reproduction. *Annu Rev Fluid Mech.* 2006; 38(1):371–94.

17. Foo J.Y.A., Lim C.S. Biofluid mechanics of the human reproductive process: modelling of the complex interaction and pathway to the oocytes. *Zygote*. 2008; 16(4):343–54.
18. Muglia U., Motta P.M. A new morpho-functional classification of the Fallopian tube based on its three-dimensional myoarchitecture. *Histol Histopathol*. 2001; 16(1):227–37.
19. Lyons R.A., Djahanbakhch O., Mahmood T., Saridogan E., Sattar S., Sheaff M.T., et al. Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Hum Reprod*. 2002; 17(3):584–8.
20. Lyons R.A., Saridogan E., Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update*. 2006; 12(4):363–72.
21. Xie Y., Wang F., Zhong W., Puscheck E., Shen H., Rappolee D.A. Shear stress induces preimplantation embryo death that is delayed by the zona pellucida and associated with stress-activated protein kinase-mediated apoptosis. *Biol Reprod*. 2006; 75(1):45–55.
22. Torre M.L., Faustini M., Attilio K.M.E., Vigo D. Cell encapsulation in mammal reproduction. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2007; 1(1):81–5.
23. Hoelker M., Rings F., Lund Q., Phatsara C., Schellander K., Tesfaye D. Effect of embryo density on in vitro developmental characteristics of bovine preimplantative embryos with respect to micro and macroenvironments. *Reprod Domest Anim*. 2010; 45(5):e138-45.
24. Lane M., Gardner D.K. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod*. 2003; 69(4):1109–17.
25. Hickman D.L., Beebe D.J., Rodriguez-Zas S.L., Wheeler M.B. Comparison of static and dynamic medium environments for culturing of pre-implantation mouse embryos. *Comp Med*. 2002; 52(2):122–6.
26. Keefe D., Kumar M., Kalmbach K. Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fertil Steril*. 2015; 103(2):317–22.
27. Franasiak J.M., Forman E.J., Hong K.H., Werner M.D., Upham K.M., Treff N.R., et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril*. 2014; 101(3):656-663.e1.
28. Ge Z.-J., Schatten H., Zhang C.-L., Sun Q.-Y. Oocyte ageing and epigenetics. *REPRODUCTION*. 2015; 149(3):R103–14.
29. Mihalas B.P., Redgrove K.A., McLaughlin E.A., Nixon B. Molecular Mechanisms Responsible for Increased Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:1–22.
30. Morin S.J., Patounakis G., Juneau C.R., Neal S.A., Scott R.T., Seli E. Diminished ovarian reserve and poor response to stimulation in patients <38 years old: a quantitative but not qualitative reduction in performance. *Hum Reprod*. 2018; 33(8):1489–98.
31. Ata B., Seyhan A., Seli E. Diminished ovarian reserve versus ovarian aging.

- Curr Opin Obstet Gynecol. 2019; 31(3):139–47.
32. García-Ferreya J., Hilario R., Dueñas J. High percentages of embryos with 21, 18 or 13 trisomy are related to advanced paternal age in donor egg cycles. *JBRA Assist Reprod.* 2018; 22(1):26–34.
 33. Carrasquillo R.J., Kohn T.P., Cinnioglu C., Rubio C., Simon C., Ramasamy R., et al. Advanced paternal age does not affect embryo aneuploidy following blastocyst biopsy in egg donor cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2019; 36(10):2039–45.
 34. Capelouto S.M., Nagy Z.P., Shapiro D.B., Archer S.R., Ellis D.P., Smith A.K., et al. Impact of male partner characteristics and semen parameters on in vitro fertilization and obstetric outcomes in a frozen oocyte donor model. *Fertil Steril.* 2018; 110(5):859–69.
 35. Kasman A.M., Li S., Zhao Q., Behr B., Eisenberg M.L. Relationship between male age, semen parameters and assisted reproductive technology outcomes. *Andrology.* 2020; :andr.12908.
 36. Colaco S., Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet.* 2018; 35(11):1953–68.
 37. Vollenhoven B., Hunt S. Ovarian ageing and the impact on female fertility. *F1000Research.* 2018; 7:1835.
 38. Jain A., Polotsky A.J., Rochester D., Berga S.L., Loucks T., Zeitlian G., et al. Pulsatile luteinizing hormone amplitude and progesterone metabolite excretion are reduced in obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(7):2468–73.
 39. Broughton D.E., Jungheim E.S. A Focused Look at Obesity and the Preimplantation Trophoblast. *Semin Reprod Med.* 2016; 34(1):5–10.
 40. Snider A.P., Wood J.R. Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality. *Reproduction.* 2019; 158(3):R79–90.
 41. Robker R.L., Akison L.K., Bennett B.D., Thrupp P.N., Chura L.R., Russell D.L., et al. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(5):1533–40.
 42. Souter I., Baltagi L.M., Kuleta D., Meeker J.D., Petrozza J.C. Women, weight, and fertility: the effect of body mass index on the outcome of superovulation/intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril.* 2011; 95(3):1042–7.
 43. Fedorcsák P., Dale P.O., Storeng R., Ertzeid G., Bjercke S., Oldereid N., et al. Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment. *Hum Reprod.* 2004; 19(11):2523–8.
 44. Pinborg A., Gaarslev C., Hougaard C.O., Nyboe Andersen A., Andersen P.K., Boivin J., et al. Influence of female bodyweight on IVF outcome: a longitudinal multicentre cohort study of 487 infertile couples. *Reprod Biomed Online.* 2011; 23(4):490–9.
 45. Jungheim E.S., Schoeller E.L., Marquard K.L., Loudon E.D., Schaffer J.E., Moley K.H. Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent

- growth abnormalities in the offspring. *Endocrinology*. 2010; 151(8):4039–46.
46. Luzzo K.M., Wang Q., Purcell S.H., Chi M., Jimenez P.T., Grindler N., et al. High Fat Diet Induced Developmental Defects in the Mouse: Oocyte Meiotic Aneuploidy and Fetal Growth Retardation/Brain Defects. Clarke H, editor. *PLoS One*. 2012; 7(11):e49217.
 47. MacHtinger R., Combelles C.M.H., Missmer S. a., Correia K.F., Fox J.H., Racowsky C. The association between severe obesity and characteristics of failed fertilized oocytes. *Hum Reprod*. 2012; 27(11):3198–207.
 48. Wu L.L.-Y., Dunning K.R., Yang X., Russell D.L., Lane M., Norman R.J., et al. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology*. 2010; 151(11):5438–45.
 49. Igosheva N., Abramov A.Y., Poston L., Eckert J.J., Fleming T.P., Duchon M.R., et al. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *PLoS One*. 2010; 5(4):e10074.
 50. Carrell D.T., Jones K.P., Peterson C.M., Aoki V., Emery B.R., Campbell B.R. Body mass index is inversely related to intrafollicular HCG concentrations, embryo quality and IVF outcome. *Reprod Biomed Online*. 2001; 3(2):109–11.
 51. Metwally M., Cutting R., Tipton a, Skull J., Ledger W., Li T. Effect of increased body mass index on oocyte and embryo quality in IVF patients. *Reprod Biomed Online*. 2007; 15(5):532–8.
 52. Shah D.K., Missmer S.A., Berry K.F., Racowsky C., Ginsburg E.S. Effect of obesity on oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization. *Obstet Gynecol*. 2011; 118(1):63–70.
 53. Адамян Л.В. Состояние репродуктивной системы у больных доброкачественными опухолями внутренних гениталий и принципы восстановительного лечения: Автореф. дис. доктора медицинских наук. – М., 1985.
 54. Dumesic D.A., Meldrum D.R., Katz-Jaffe M.G., Krisher R.L., Schoolcraft W.B. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*. 2015; 103(2):303–16.
 55. Toya M., Saito H., Ohta N., Saito T., Kaneko T., Hiroi M. Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 2000; 73(2):344–50.
 56. Nakahara K., Saito H., Saito T., Ito M., Ohta N., Takahashi T., et al. Ovarian fecundity in patients with endometriosis can be estimated by the incidence of apoptotic bodies. *Fertil Steril*. 1998; 69(5):931–5.
 57. Sanchez A.M., Viganò P., Quattrone F., Pagliardini L., Papaleo E., Candiani M., et al. The WNT/ β -catenin signaling pathway and expression of survival promoting genes in luteinized granulosa cells: endometriosis as a paradigm for a dysregulated apoptosis pathway. *Fertil Steril*. 2014; 101(6):1688–96.
 58. Sanchez A.M., Viganò P., Somigliana E., Panina-Bordignon P., Vercellini P., Candiani M. The distinguishing cellular and molecular features of the

- endometriotic ovarian cyst: from pathophysiology to the potential endometrioma-mediated damage to the ovary. *Hum Reprod Update*. 2014; 20(2):217–30.
59. Sanchez A.M., Somigliana E., Vercellini P., Pagliardini L., Candiani M., Vigano P. Endometriosis as a detrimental condition for granulosa cell steroidogenesis and development: From molecular alterations to clinical impact. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016; 155(Pt A):35–46.
 60. Goud P.T., Goud A.P., Joshi N., Puscheck E., Diamond M.P., Abu-Soud H.M. Dynamics of nitric oxide, altered follicular microenvironment, and oocyte quality in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2014; 102(1):151-159.e5.
 61. Pellicer A., Valbuena D., Bauset C., Albert C., Bonilla-Musoles F., Remohí J., et al. The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril*. 1998; 69(6):1135–41.
 62. Wunder D.M., Mueller M.D., Birkhäuser M.H., Bersinger N.A. Steroids and protein markers in the follicular fluid as indicators of oocyte quality in patients with and without endometriosis. *J Assist Reprod Genet*. 2005; 22(6):257–64.
 63. Mansour G., Sharma R.K., Agarwal A., Falcone T. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. *Fertil Steril*. 2010; 94(5):1894–9.
 64. Singh A.K., Dutta M., Chattopadhyay R., Chakravarty B., Chaudhury K. Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis. *J Assist Reprod Genet*. 2016; 33(10):1363–72.
 65. Isikoglu M., Ozcelik N., Urfan A., Ceviren A., Donmez L. Characteristic cytoplasmic morphology of oocytes in endometriosis patients and its effect on the outcome of assisted reproduction treatments cycles. *IVF Lite*. 2014; 1(2):88.
 66. Borges E., Braga D.P.A.F., Setti A.S., Vingris L.S., Figueira R.C.S., Iaconelli A. Endometriosis Affects Oocyte Morphology in Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles? *JBRA Assist Reprod*. 2015; 19(4):235–40.
 67. Gallo A., Boni R., Tosti E. Gamete quality in a multistressor environment. *Environ Int*. 2020; 138:105627.
 68. Bundhun P.K., Janoo G., Bhurtu A., Teeluck A.R., Soogund M.Z.S., Pursun M., et al. Tobacco smoking and semen quality in infertile males: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2019; 19(1):36.
 69. Mostafa R.M., Nasrallah Y.S., Hassan M.M., Farrag A.F., Majzoub A., Agarwal A. The effect of cigarette smoking on human seminal parameters, sperm chromatin structure and condensation. *Andrologia*. 2018; 50(3).
 70. Budani M.C., Tiboni G.M. Ovotoxicity of cigarette smoke: A systematic review of the literature. *Reprod Toxicol*. 2017; 72:164–81.
 71. Nassan F.L., Arvizu M., Mínguez-Alarcón L., Williams P.L., Attaman J.,

- Petrozza J., et al. Marijuana smoking and markers of testicular function among men from a fertility centre. *Hum Reprod.* 2019; 34(4):715–23.
72. Francou M.M., Girela J.L., De Juan A., Ten J., Bernabeu R., De Juan J. Human sperm motility, capacitation and acrosome reaction are impaired by 2-arachidonoylglycerol endocannabinoid. *Histol Histopathol.* 2017; 32(12):1351–8.
 73. Drobnis E.Z., Nangia A.K. Pain Medications and Male Reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 1034:39–57.
 74. Safarinejad M.R., Asgari S.A., Farshi A., Ghaedi G., Kolahi A.A., Irvani S., et al. The effects of opiate consumption on serum reproductive hormone levels, sperm parameters, seminal plasma antioxidant capacity and sperm DNA integrity. *Reprod Toxicol.* 2013; 36:18–23.
 75. Nazmara Z., Najafi M., Rezaei-Mojaz S., Movahedin M., Zandiyeh Z., Shirinbayan P., et al. The Effect of Heroin Addiction on Human Sperm Parameters, Histone-to-Protamine Transition, and Serum Sexual Hormones Levels. *Urol J.* 2019; 16(3):289–94.
 76. Ricci E., Al Beitawi S., Cipriani S., Candiani M., Chiaffarino F., Viganò P., et al. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2017; 34(1):38–47.
 77. Nel-Themaat L., Nagy Z.P. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta.* 2011; 32:S257–63.
 78. Ebner T., Moser M., Sommergruber M., Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update.* 2003; 9(3):251–62.
 79. Tesarik J., Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.* 1999; 14(5):1318–23.
 80. Scott L., Alvero R., Leondires M., Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod.* 2000; 15(11):2394–403.
 81. Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2003; 9(3):237–49.
 82. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011; 26(6):1270–83.
 83. Tao J., Tamis R., Fink K., Williams B., Nelson-White T., Craig R. The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Hum Reprod.* 2002; 17(6):1513–8.
 84. Baxter Bendus A.E., Mayer J.F., Shipley S.K., Catherino W.H. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril.* 2006; 86(6):1608–15.
 85. Storr A., Venetis C.A., Cooke S., Kilani S., Ledger W. Inter-observer and

- intra-observer agreement between embryologists during selection of a single Day 5 embryo for transfer: a multicenter study. *Hum Reprod.* 2017; 32(2):307–14.
86. Meseguer M., Herrero J., Tejera A., Hilligsoe K.M., Ramsing N.B., Remohi J., et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011; 26(10):2658–71.
 87. Wong C., Chen a. a., Behr B., Shen S. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reprod Biomed Online.* 2013; 26(2):120–9.
 88. Nakahara T., Iwase A., Goto M., Harata T., Suzuki M., Ienaga M., et al. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2010; 27(2–3):93–6.
 89. Kirkegaard K., Hindkjaer J.J., Gr??ndahl M.L., Kesmodel U.S., Ingerslev H.J. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29(6):565–72.
 90. Cruz M., Gadea B., Garrido N., Pedersen K.S., Mart??nez M., P??rez-Cano I., et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28(7):569–73.
 91. Wong C.C., Loewke K.E., Bossert N.L., Behr B., De Jonge C.J., Baer T.M., et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol.* 2010; 28(10):1115–21.
 92. Chavez S.L., Loewke K.E., Han J., Moussavi F., Colls P., Munne S., et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun.* 2012; 3:1251.
 93. Campbell A., Fishel S., Bowman N., Duffy S., Sedler M., Hickman C.F.L. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online.* 2013; 26(5):477–85.
 94. Campbell A., Fishel S., Bowman N., Duffy S., Sedler M., Thornton S. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reprod Biomed Online.* 2013; 27(2):140–6.
 95. Ottolini C., Rienzi L., Capalbo A. A cautionary note against embryo aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging. *Reprod Biomed Online.* 2014; 28(3):273–5.
 96. Forman E.J., Hong K.H., Ferry K.M., Tao X., Taylor D., Levy B., et al. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2013; 100(1):100-7.e1.
 97. Scott R.T., Upham K.M., Forman E.J., Hong K.H., Scott K.L., Taylor D., et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: A randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2013; 100(3):697–

- 703.
98. Leese H.J. History of oocyte and embryo metabolism. *Reprod Fertil Dev.* 2015; 27(4):567.
 99. Krisher R.L., Heuberger A.L., Paczkowski M., Stevens J., Pospisil C., Prather R.S., et al. Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology. *Reprod Fertil Dev.* 2015; 27(4):602.
 100. Nerenz R.D. Omics in Reproductive Medicine. In 2016. p. 55–95.
 101. Gardner D.K., Leese H.J. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *Reproduction.* 1990; 88(1):361–8.
 102. Gandhi A.P., Lane M., Gardner D.K., Krisher R.L. Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. *Mol Reprod Dev.* 2001; 58(3):269–75.
 103. Зорина И.М., Смольникова В.Ю., Эльдаров Ч.М., Ярыгина С.А., Горшинова В.К., Макарова Н.П., et al. Анализ потребления глюкозы и глутамата в питательных средах как метод оценки качества эмбрионов человека пятых суток развития. *Акушерство и гинекология.* 2018; (5):64–9.
 104. Gardner D.K., Wale P.L., Collins R., Lane M. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod.* 2011; 26(8):1981–6.
 105. Gardner D.K., Leese H.J. Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. *J Exp Zool.* 1987; 242(1):103–5.
 106. Devreker F., Hardy K., Van den Bergh M., Winston J., Biramane J., Englert Y. Noninvasive assessment of glucose and pyruvate uptake by human embryos after intracytoplasmic sperm injection and during the formation of pronuclei. *Fertil Steril.* 2000; 73(5):947–54.
 107. Crosby I.M., Gandolfi F., Moor R.M. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *Reproduction.* 1988; 82(2):769–75.
 108. Edwards L.J., Williams D. a., Gardner D.K. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod.* 1998; 13(12):3441–8.
 109. Martin P.M. Amino Acid Transport Regulates Blastocyst Implantation. *Biol Reprod.* 2003; 69(4):1101–8.
 110. Devreker F., Hardy K., Van den Bergh M., Vannin A.S., Emiliani S., Englert Y. Amino acids promote human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod.* 2001; 16(4):749–56.
 111. Lane M., Gardner D.K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *J Assist Reprod Genet.* 1997; 14(7):398–403.
 112. Houghton F.D. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod.* 2002; 17(4):999–1005.

113. Seli E., Botros L., Sakkas D., Burns D.H. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2008; 90(6):2183–9.
114. Baumann C.G., Morris D.G., Sreenan J.M., Leese H.J. The quiet embryo hypothesis: Molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod Dev*. 2007; 74(10):1345–53.
115. Leese H.J., Baumann C.G., Brison D.R., McEvoy T.G., Sturmey R.G. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod*. 2008; 14(12):667–72.
116. Tejera A., Herrero J., Vilorio T., Romero J.L., Gamiz P., Meseguer M. Time-dependent O₂ consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertil Steril*. 2012; 98(4):849-857.e3.
117. Gardner D.K., Wale P.L. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril*. 2013; 99(4):1062–72.
118. Urbanski J.P., Johnson M.T., Craig D.D., Potter D.L., Gardner D.K., Thorsen T. Noninvasive Metabolic Profiling Using Microfluidics for Analysis of Single Preimplantation Embryos. *Anal Chem*. 2008; 80(17):6500–7.
119. Seli E., Bruce C., Botros L., Henson M., Roos P., Judge K., et al. Receiver operating characteristic (ROC) analysis of day 5 morphology grading and metabolomic Viability Score on predicting implantation outcome. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28(2):137–44.
120. Seli E., Sakkas D., Scott R., Kwok S.C., Rosendahl S.M., Burns D.H. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2007; 88(5):1350–7.
121. Vergouw C.G., Botros L.L., Roos P., Lens J.W., Schats R., Hompes P.G.A., et al. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod*. 2008; 23(7):1499–504.
122. Seli E., Vergouw C.G., Morita H., Botros L., Roos P., Lambalk C.B., et al. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril*. 2010; 94(2):535–42.
123. Hardarson T., Ahlstrom A., Rogberg L., Botros L., Hillensjo T., Westlander G., et al. Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Hum Reprod*. 2012; 27(1):89–96.
124. Vergouw C.G., Kieslinger D.C., Kostelijk E.H., Botros L.L., Schats R., Hompes P.G., et al. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2012; 27(8):2304–11.
125. Sfontouris I., Zorzovilis I., Lainas G., Lainas T., Petsas G., Sakkas D. Non-

- invasive metabolomic analysis using a commercial NIR instrument for embryo selection. *J Hum Reprod Sci.* 2013; 6(2):133.
126. Vergouw C.G., Heymans M.W., Hardarson T., Sfontouris I.A., Economou K.A., Ahlstrom A., et al. 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; 29(3):455–61.
 127. Cortezzi S.S., Cabral E.C., Trevisan M.G., Ferreira C.R., Setti A.S., Braga D.P. de A.F., et al. Prediction of embryo implantation potential by mass spectrometry fingerprinting of the culture medium. *REPRODUCTION.* 2013; 145(5):453–62.
 128. Iles R.K., Sharara F.I., Zmuidinaite R., Abdo G., Keshavarz S., Butler S.A. Secretome profile selection of optimal IVF embryos by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Assist Reprod Genet.* 2019; 36(6):1153–60.
 129. Hammond E.R., McGillivray B.C., Wicker S.M., Peek J.C., Shelling A.N., Stone P., et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertil Steril.* 2017; 107(1):220-228.e5.
 130. Stigliani S., Anserini P., Venturini P.L.L., Scaruffi P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Hum Reprod.* 2013; 28(10):2652–60.
 131. Hashimoto S., Morimoto N., Yamanaka M., Matsumoto H., Yamochi T., Goto H., et al. Quantitative and qualitative changes of mitochondria in human preimplantation embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2017; 34(5):573–80.
 132. Fragouli E., McCaffrey C., Ravichandran K., Spath K., Grifo J.A., Munné S., et al. Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: a blinded prospective non-selection study. *Hum Reprod.* 2017; 32(11):2340–7.
 133. Victor A.R., Brake A.J., Tyndall J.C., Griffin D.K., Zouves C.G., Barnes F.L., et al. Accurate quantitation of mitochondrial DNA reveals uniform levels in human blastocysts irrespective of ploidy, age, or implantation potential. *Fertil Steril.* 2017; 107(1):34-42.e3.
 134. Stigliani S., Persico L., Lagazio C., Anserini P., Venturini P.L., Scaruffi P. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20(12):1238–46.
 135. Coy P., Ruiz S., Romar R., Campos I., Gadea J. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology.* 1999; 51(4):799–812.
 136. Mizobe Y., Yoshida M., Miyoshi K. Enhancement of cytoplasmic maturation of in vitro-matured pig oocytes by mechanical vibration. *J Reprod Dev.* 2010; 56(2):285–90.

137. Романов А.Ю., Силачев Д.Н., Макарова Н.П., Долгушина Н.В. Влияние механической микровибрации на качество эмбрионов человека при культивировании *in vitro* и исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2018; (2):86–90.
138. Hur Y.S., Park J.H., Ryu E.K., Park S.J., Lee J.H., Lee S.H., et al. Effect of micro-vibration culture system on embryo development. *J Assist Reprod Genet.* 2013; 30(6):835–41.
139. Asano Y., Matsuura K. Mouse embryo motion and embryonic development from the 2-cell to blastocyst stage using mechanical vibration systems. *Reprod Fertil Dev.* 2014; 26(5):733–41.
140. Баранов И.И., Токова З.З., Тадевосян А.А. Перинатальные исходы при многоплодных родах. *Акушерство и гинекология.* 2012; 1:98–102.
141. Harbottle S., Hughes C., Cutting R., Roberts S., Brison D., Association Of Clinical Embryologists & The (ACE) British Fertility Society (BFS). Elective Single Embryo Transfer: an update to UK Best Practice Guidelines. *Hum Fertil (Camb).* 2015; 18(3):165–83.
142. Jones H., Feth L., Rumpf D., Hefti A., Mariotti A. Acoustic energy affects human gingival fibroblast proliferation but leaves protein production unchanged. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(11):832–8.
143. Shaobin G., Wu Y., Li K., Li S., Ma S., Wang Q., et al. A pilot study of the effect of audible sound on the growth of *Escherichia coli*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2010; 78(2):367–71.
144. Capella M.M., Lestard N.R., Valente R., Lopes A. Direct effects of music in non-auditory cells in culture. *Noise Heal.* 2013; 15(66):307.
145. Teijon M.L., Castello C., Asensio M. Improvement of Fertilization Rates of In Vitro Cultured Human Embryos by Exposure to Sound Vibrations. *J Fertil Vitr - IVF-Worldwide, Reprod Med Genet Stem Cell Biol.* 2015; 03(04).
146. Velker B.A.M., Denomme M.M., Mann M.R.W. Embryo Culture. Smith GD, Swain JE, Pool TB, editors. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. 367–386 p. (Methods in Molecular Biology; vol. 912).
147. El-Danasouri I., Sandi-Monroy N.L., Winkle T., Ott K., Krebs C., Maas D.H.A., et al. Micro-vibration culture of human embryos improves pregnancy and implantation rates. *Fertil Steril.* 2014; 102(3):e217.
148. Hur Y.S., Ryu E.K., Yoon S.H., Lim K.S., Lee W.D., Lim J.H. Comparison of static culture, micro-vibration culture, and micro-vibration culture with co-culture in poor ovarian responders. *Clin Exp Reprod Med.* 2016; 43(3):146.
149. Chian R.C., Uzelac P.S., Nargund G. In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation. *Fertil Steril.* 2013; 99(5):1173–81.
150. Seyhan A., Ata B., Son W.-Y., Dahan M.H., Tan S.L. Comparison of complication rates and pain scores after transvaginal ultrasound-guided oocyte pickup procedures for in vitro maturation and in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2014; 101(3):705–9.
151. Walls M.L., Hunter T., Ryan J.P., Keelan J.A., Nathan E., Hart R.J. In vitro

- maturation as an alternative to standard in vitro fertilization for patients diagnosed with polycystic ovaries: a comparative analysis of fresh, frozen and cumulative cycle outcomes. *Hum Reprod.* 2015; 30(1):88–96.
152. Tannus S., Hatirnaz S., Tan J., Ata B., Tan S.-L., Hatirnaz E., et al. Predictive factors for live birth after in vitro maturation of oocytes in women with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2018; 297(1):199–204.
 153. Son W.-Y., Tan S.L. Laboratory and embryological aspects of hCG-primed in vitro maturation cycles for patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod Update.* 2010; 16(6):675–89.
 154. Gremeau A.-S., Andreadis N., Fatum M., Craig J., Turner K., McVeigh E., et al. In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles. *Fertil Steril.* 2012; 98(2):355–60.
 155. Yanez L.Z., Camarillo D.B. Microfluidic analysis of oocyte and embryo biomechanical properties to improve outcomes in assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod.* 2017; 23(4):235–47.
 156. Yang S.-H., Yoon S.-H., Jung J.-H., Lim J.-H., Ko Y. Improvement of embryonic development and clinical outcomes of germinal vesicle stage oocytes using a microvibration culture system. *Syst Biol Reprod Med.* 2019; 65(4):333–41.
 157. Gardner D.K., Schoolcraft W.B. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999; 11(3):307–11.
 158. Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem.* 2006; 78(3):779–87.
 159. Chong J., Wishart D.S., Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinforma.* 2019; 68(1):e86.
 160. Bylesjö M., Rantalainen M., Cloarec O., Nicholson J.K., Holmes E., Trygg J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J Chemom.* 2006; 20(8–10):341–51.
 161. Wishart D.S., Feunang Y.D., Marcu A., Guo A.C., Liang K., Vázquez-Fresno R., et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1):D608–17.
 162. Puscheck E.E., Awonuga A.O., Yang Y., Jiang Z., Rappolee D.A. Molecular biology of the stress response in the early embryo and its stem cells. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 843:77–128.
 163. Зорина И.М., Смольникова В.Ю., Бобров М.Ю. Изучение продуктов метаболизма эмбрионов в культуральных средах как инструмент определения потенциала к имплантации. *Акушерство и гинекология.* 2017; (2):11–6.
 164. Drábková P., Andrllová L., Hampl R., Kand'ár R. Amino acid metabolism in

- human embryos. *Physiol Res.* 2016; 65(5):823–32.
165. Picton H.M., Elder K., Houghton F.D., Hawkhead J.A., Rutherford A.J., Hogg J.E., et al. Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16(8):557–69.
 166. Gardner D.K., Kelley R.L. Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype. *J Dev Orig Health Dis.* 2017; 8(4):418–35.
 167. Estrada-Cortés E., Negrón-Peréz V.M., Tríbulo P., Zenobi M.G., Staples C.R., Hansen P.J. Effects of choline on the phenotype of the cultured bovine preimplantation embryo. *J Dairy Sci.* 2020; .
 168. Togashi K., Kumagai J., Sato E., Shirasawa H., Shimoda Y., Makino K., et al. Dysfunction in gap junction intercellular communication induces aberrant behavior of the inner cell mass and frequent collapses of expanded blastocysts in mouse embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32(6):969–76.
 169. Ehrlich H.P., Sun B., Saggars G.C., Kromath F. Gap junction communications influence upon fibroblast synthesis of Type I collagen and fibronectin. *J Cell Biochem.* 2006; 98(4):735–43.
 170. van der Weiden R.M., Helmerhorst F.M., Keirse M.J. Which prostanoid metabolites should be determined for the study of reproductive processes? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1998; 58(3):205–7.
 171. van der Weiden R.M., Helmerhorst F.M., Keirse M.J. Prostanoid excretion before in vitro fertilization relates to the likelihood of pregnancy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995; 53(6):419–21.
 172. van der Weiden R.M., Noort W.A., Naaktgeboren N., Helmerhorst F.M., Keirse M.J. Prostanoid levels in in vitro fertilization culture medium are not related to the likelihood of implantation. *Fertil Steril.* 1994; 62(6):1217–20.
 173. Geissler F.T., Kuzan F.B., Faustman E.M., Henderson W.R. Lipid mediator production by post-implantation rat embryos in vitro. *Prostaglandins.* 1989; 38(2):145–55.
 174. Boruszewska D., Kowalczyk-Zieba I., Suwik K., Staszkiwicz-Chodor J., Jaworska J., Lukaszuk K., et al. Prostaglandin E2 affects in vitro maturation of bovine oocytes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020; 18(1):40.
 175. Talukder A.K., Yousef M.S., Rashid M.B., Awai K., Acosta T.J., Shimizu T., et al. Bovine embryo induces an anti-inflammatory response in uterine epithelial cells and immune cells in vitro: possible involvement of interferon tau as an intermedator. *J Reprod Dev.* 2017; 63(4):425–34.
 176. Rodrigues S.A.D., Pontelo T.P., Kussano N.R., Kawamoto T.S., Leme L.O., Caixeta F.M.C., et al. Effects of Prostaglandins E2 and F2 α on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Domest Anim Endocrinol.* 2020; 72:106447.
 177. Бейк Е.П., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. Эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста. *Гинекология.* 2018; 20(1):109–12.
 178. Королькова А.И. Оптимизация программ вспомогательных

- репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста на основании оценки: дисс. канд. мед. наук: 14.01.01. митохондриального потенциала и преимплантационного генетического скрининга эмбрионов дисс. 2019. 115 р.
179. Бейк Е.П. Повышение эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста на основании проведения преимплантационного генетического скрининга: дисс. канд. мед. наук: 14.01.01. 2018. 112 р.
 180. Sermondade N., Huberlant S., Bourhis-Lefebvre V., Arbo E., Gallot V., Colombani M., et al. Female obesity is negatively associated with live birth rate following IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2019; 25(4):439–51.
 181. Fortin C.N., Hur C., Radeva M., Falcone T. Effects of myomas and myomectomy on assisted reproductive technology outcomes. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2019; 48(9):751–5.
 182. Somigliana E., De Benedictis S., Vercellini P., Nicolosi A.E., Benaglia L., Scarduelli C., et al. Fibroids not encroaching the endometrial cavity and IVF success rate: a prospective study. *Hum Reprod*. 2011; 26(4):834–9.
 183. Klatsky P.C., Lane D.E., Ryan I.P., Fujimoto V.Y. The effect of fibroids without cavity involvement on ART outcomes independent of ovarian age. *Hum Reprod*. 2007; 22(2):521–6.
 184. Gianaroli L., Gordts S., D'Angelo A., Magli M.C., Brosens I., Cetera C., et al. Effect of inner myometrium fibroid on reproductive outcome after IVF. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10(4):473–7.
 185. Kroon B., Johnson N., Chapman M., Yazdani A., Hart R., Australasian CREI Consensus Expert Panel on Trial evidence (ACCEPT) group. Fibroids in infertility--consensus statement from ACCEPT (Australasian CREI Consensus Expert Panel on Trial evidence). *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2011; 51(4):289–95.
 186. Pérez-López F.R., Ornat L., Ceausu I., Depypere H., Erel C.T., Lambrinoudaki I., et al. EMAS position statement: management of uterine fibroids. *Maturitas*. 2014; 79(1):106–16.
 187. Серов В. Н., Сухих Г. Т. Клинические рекомендации. Акушерство и гинекология //М: ГЭОТАР-Медиа.-4-е изд.-2014.-1024С. – 2014. Москва: Проблемы репродукции;
 188. Vilos G.A., Allaire C., Laberge P.-Y., Leyland N., SPECIAL CONTRIBUTORS. The management of uterine leiomyomas. *J Obstet Gynaecol Can*. 2015; 37(2):157–78.
 189. Mas A., Tarazona M., Dasí Carrasco J., Estaca G., Cristóbal I., Monleón J. Updated approaches for management of uterine fibroids. *Int J Womens Health*. 2017; 9:607–17.
 190. Российское общество акушеров-гинекологов (РОАГ). Российская ассоциация репродукции человека (РАРЧ). Женское бесплодие. Клинические рекомендации. [Проект]. 79 р.

191. Safarian G.K., Gzgyan A.M., Dzhemlikhanova Lyailya K., Niauri Dariko A. Does subclinical hypothyroidism and/or thyroid autoimmunity influence the IVF/ICSI outcome? Review of the literature. *Gynecol Endocrinol.* 2019; 35(sup1):56–9.
192. Busnelli A., Paffoni A., Fedele L., Somigliana E. The impact of thyroid autoimmunity on IVF/ICSI outcome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2016; 22(6):775–90.
193. Mintziori G., Goulis D.G. In vitro fertilization/intracytoplasmic insemination and thyroid function: reviewing the evidence. *Metabolism.* 2018; 86:44–8.
194. Краевая Е.Е. Дифференцированный подход к ведению пациенток с тромбофилией в программах вспомогательных репродуктивных технологий: дисс. канд. мед. наук: 14.01.01. 2020. 102 p.
195. Сыркашева А.Г., Ильина Е.О., Долгушина Н.В. Бесплодие у женщин старшего репродуктивного возраста: причины, тактика ведения, перспективы использования преимплантационного генетического скрининга (обзор литературы). *Гинекология.* 2016; 18(3):40–3.
196. Бейк Е.П., Коротченко О.Е., Гвоздева А.Д., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. Роль преимплантационного генетического скрининга в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста. *Акушерство и гинекология*2. 2018; (4):78–84.
197. ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs, De los Santos M.J., Apter S., Coticchio G., Debrock S., Lundin K., et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Hum Reprod.* 2016; 31(4):685–6.
198. Наими З.М.С., Калинина Е.А., Донников А.Е., Алиева К.У., Дударова А.Х., Тухватуллина Я.А. Эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий при переносе эмбрионов в стимулированном цикле по сравнению с переносом криоконсервированных/размороженных эмбрионов. *Акушерство и гинекология.* 2016; (6):11–7.
199. Кравчук Я.Н., Калугина А.С., Зубова Ю.Г. Применение методов криоконсервации эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология.* 2012; (8–2):80–4.
200. Rienzi L.F., Iussig B., Dovere L., Fabozzi G., Cimadomo D., Ubaldi F.M. Perspectives in Gamete and Embryo Cryopreservation. *Semin Reprod Med.* 2018; 36(5):253–64.
201. Levi-Setti P.E., Patrizio P., Scaravelli G. Evolution of human oocyte cryopreservation: slow freezing versus vitrification. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2016; 23(6):445–50.
202. Edgar D.H., Gook D.A. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2012; 18(5):536–54.
203. Pandian Z., Templeton A., Serour G., Bhattacharya S. Number of embryos

- for transfer after IVF and ICSI: a Cochrane review. *Hum Reprod.* 2005; 20(10):2681–7.
204. Goetz L.H., Schork N.J. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. *Fertil Steril.* 2018; 109(6):952–63.
205. Beim P.Y., Elashoff M., Hu-Seliger T.T. Personalized reproductive medicine on the brink: progress, opportunities and challenges ahead. *Reprod Biomed Online.* 2013; 27(6):611–23.
206. Коротченко О.Е., Сыркашева А.Г., Кулакова Е.В., Долгушина Н. Роль преимплантационного генетического скрининга в эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с привычным невынашиванием беременности (обзор литературы). *Проблемы репродукции.* 2017; 23(2):50–5.
207. Долгушина Н.В., Ибрагимова Э.О., Романов А.Ю., Бурменская О.В., Макарова Н.П., Шафеи Р.А., et al. Предикторы эффективности спонтанного хетчинга бластоцист человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология.* 2018; (2):88–95.
208. Hodgson R.M., Lee H.L., Wang R., Mol B.W., Johnson N. Interventions for endometriosis-related infertility: a systematic review and network meta-analysis. *Fertil Steril.* 2020; 113(2):374-382.e2.
209. Georgiou E.X., Melo P., Baker P.E., Sallam H.N., Arici A., Garcia-Velasco J.A., et al. Long-term GnRH agonist therapy before in vitro fertilisation (IVF) for improving fertility outcomes in women with endometriosis. *Cochrane database Syst Rev.* 2019; 2019(11).
210. Wu C.Q., Albert A., Alfaraj S., Taskin O., Alkusayer G.M., Havelock J., et al. Live Birth Rate after Surgical and Expectant Management of Endometriomas after In Vitro Fertilization: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Critical Appraisal of Current Guidelines and Previous Meta-Analyses. *J Minim Invasive Gynecol.* 2019; 26(2):299-311.e3.
211. Rossi A.C., Prefumo F. The effects of surgery for endometriosis on pregnancy outcomes following in vitro fertilization and embryo transfer: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2016; 294(3):647–55.
212. Aydogan Mathyk B., Quaas A.M. Obesity and IVF: weighing in on the evidence. *J Assist Reprod Genet.* 2021; .
213. Bellver J., Pellicer A., García-Velasco J.A., Ballesteros A., Remohí J., Meseguer M. Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors. *Fertil Steril.* 2013; 100(4):1050–8.
214. Provost M.P., Acharya K.S., Acharya C.R., Yeh J.S., Steward R.G., Eaton J.L., et al. Pregnancy outcomes decline with increasing recipient body mass index: an analysis of 22,317 fresh donor/recipient cycles from the 2008-2010 Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcome Reporting System registry. *Fertil Steril.* 2016; 105(2):364–8.

215. Motiei M., Vaculikova K., Cela A., Tvrdonova K., Khalili R., Rumpik D., et al. Non-Invasive Human Embryo Metabolic Assessment as a Developmental Criterion. *J Clin Med.* 2020; 9(12).
216. Banliat C., Le Bourhis D., Bernardi O., Tomas D., Labas V., Salvetti P., et al. Oviduct Fluid Extracellular Vesicles Change the Phospholipid Composition of Bovine Embryos Developed In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(15).
217. Skotland T., Sagini K., Sandvig K., Llorente A. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020; 159:308–21.
218. Eyster K.M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ.* 2007; 31(1):5–16.