

*На правах рукописи*

**Ярыгина**

**Светлана Анатольевна**

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ  
РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПУТЕМ МОДИФИКАЦИИ  
ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОГО ЭТАПА**

**3.1.4. Акушерство и гинекология**

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата медицинских наук**

**Москва – 2022**

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент

Смольникова Вероника Юрьевна

кандидат химических наук

Бобров Михаил Юрьевич

Официальные оппоненты:

Краснопольская Ксения Владиславовна - член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения репродуктологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Тапильская Наталья Игоревна - доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных репродуктивных технологий ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта"

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Минздрава России

Защита диссертации состоится «01» марта 2022 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

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

<https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Yarygina%20CA-disser.pdf?1253983920>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Бесплодие затрагивает каждую шестую семейную пару и признано ВОЗ глобальной проблемой здравоохранения (Malchau, S.S., et al., 2017). С момента появления и дальнейшего развития методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) остается актуальным вопрос повышения эффективности лечения. Имплантация является важнейшим этапом в репродукции человека. Успех данного этапа зависит от таких факторов, как наличие компетентной бластоцисты, рецептивного эндометрия и успешного перекрестного взаимодействия между материнскими и эмбриональными тканями. Частота имплантации из расчета на перенос эмбриона в полость матки составляет около 30% (Cimadomo D., et al., 2021).

Повторные неудачи имплантации (ПНИ) являются наиболее сложной клинической дилеммой, поскольку общий показатель наступления клинической беременности в программах ВРТ у пациенток с ПНИ чрезвычайно низок. Для определения ПНИ использовались многие переменные, такие как количество перенесенных эмбрионов, количество попыток экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), качество эмбриона или возраст матери (Laufer N., et al, 2012), но, несмотря на многочисленные публикации на эту тему, общепринятого определения ПНИ не существует. Как диагноз и обоснование к изменению программы ВРТ ПНИ устанавливается в случае 3 безуспешных переносов у женщин моложе 35 лет и 2 - у женщин 35 лет и старше (Coughlan C, et al., 2014; Аншина М.Б. и др., 2019).

Условия культивирования для эмбрионального развития обычно считаются субоптимальными. Это связано с тем, что культивирование эмбрионов в стандартных средах происходит при полном отсутствии ростовых факторов и цитокинов, которые присутствуют в репродуктивном тракте, что может привести к снижению их жизнеспособности и, соответственно, их имплантационного потенциала (Sipahi M., et al., 2021).

Гранулоцитарно – макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) — это цитокин, который синтезируется не только клетками иммунной системы, такими, как Т-лимфоциты, макрофаги, гранулоциты, моноциты, но и эпителиальными, эндотелиальными клетками органов репродуктивной системы: гранулезными клетками фолликулов, эпителиальными клетками, выстилающими фаллопиевы трубы и эндометрия, NK-клетками эндометрия, клетками стромальной и децидуальной ткани, а также эпителиальными клетками трофобласта. Он максимально продуцируется в люминальных и железистых эпителиальных клетках эндометрия в секреторной фазе, а также в эпителиальных клетках, выстилающих фаллопиевы трубы в поздней пролиферативной, ранней и средней секреторной фазах менструального цикла (Giacomini G., et al., 1995; Zhao Y., et al., 1994). Далее его синтез продолжается в течение всего периода беременности в материнской части плаценты (Hamilton JA., et al., 2004).

Добавление в среду GM-CSF может привести к ускоренному дроблению эмбриона, снижению апоптоза, улучшению показателей бластуляции и развитию эмбриона с более высоким потенциалом к имплантации, увеличению частоты наступления беременности и предотвращению ее прерывания.

В настоящее время большое внимание уделяют оценке качества получаемых эмбрионов, используя морфологические критерии. Данный метод является самым простым способом оценки качества эмбриона, однако последние исследования показывают, что данный метод недостаточен для прогнозирования последующей успешной имплантации (Gardner DK., et al., 2015). В последнее десятилетие одним из современных и мощных инструментов улучшения эффективности циклов ЭКО является предимплантационное генетическое тестирование (ПГТ). Однако данный метод имеет ряд ограничений, основным из которых является возможное негативное воздействие на эмбрион в момент проведения процедуры биопсии трофэктодермы (Cimadomo D., et al., 2016).

Данные ограничения стимулировали исследователей на поиск различных вспомогательных неинвазивных методов оценки качества и жизнеспособности

эмбрионов. Метаболический анализ культуральной среды может предоставить ценную информацию о развитии эмбрионов и их потенциале к имплантации. До сих пор немногочисленные данные, полученные в литературе, демонстрируют значительные различия и в результате научные взгляды противоречат друг другу. В настоящее время применение метаболомики в клинической лаборатории ВРТ требует, по возможности, устранения факторов, лежащих в основе противоречивых результатов, и разработки надежных прогностических моделей, учитывающих возможные источники систематической ошибки в процессе отбора эмбрионов.

В связи с вышеизложенным, представляется актуальным и перспективным исследование по изучению эффективности использования сред, содержащих в своем составе гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор на основании изучения изменения профиля метаболитов и потребления глюкозы в культуральной среде у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

Цель исследования: Оптимизация ведения пациенток с повторными неудачами имплантации в циклах ВРТ при селективном переносе эмбриона в полость матки с использованием сред, содержащих в своем составе гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор.

#### Задачи исследования

1. Оценить данные анамнеза, параметры клинического и гормонального статуса у обследуемых пациенток в программах ВРТ;
2. Сравнить параметры раннего эмбрионального развития у одних и тех же пациенток при культивировании в двух средах: классической и с применением гранулоцитарно–макрофагального колониестимулирующего фактора;
3. Провести анализ эффективности программ (частоту наступления клинической беременности, ранних репродуктивных потерь, живорождения);

4. Оценить профиль метаболитов в классических средах и с применением гранулоцитарно–макрофагального колониестимулирующего фактора на 3-и и 5-е сутки развития у эмбрионов с различным имплантационным потенциалом;

5. Исследовать изменение содержания глюкозы в культуральных средах (классической и с применением гранулоцитарно–макрофагального колониестимулирующего фактора) эмбрионами 3-х и 5-х суток развития и определить ассоциацию исследуемого показателя с качеством эмбрионов;

6. На основании полученных данных разработать алгоритм ведения пациенток с повторными неудачами имплантации в программах ВРТ.

#### Научная новизна

В результате проведенного исследования представлены и научно обоснованы данные об особенностях развития преимплантационных эмбрионов при культивировании в двух средах: классической и с применением гранулоцитарно–макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) у пациенток с повторными неудачами имплантации.

Изучение взаимосвязи между изменением профиля метаболитов, а также потребления глюкозы в культуральных средах эмбрионами 3 и 5 суток культивирования является новым неинвазивным методом для прогнозирования имплантационного потенциала эмбриона, в дополнение к морфологическим критериям качества, принятым Стамбульским консенсусом, что позволяет индивидуализировать и оптимизировать выбор эмбриона для селективного переноса в полость матки.

#### Практическая значимость

На основании полученных данных разработан алгоритм проведения программ вспомогательных репродуктивных технологий с учетом оценки качества эмбрионов и их способности к успешной имплантации при использовании среды с добавлением гранулоцитарно-макрофагального

колониестимулирующего фактора (GM-CSF) у пациенток с повторными неудачами имплантации.

Оценка потребления глюкозы и выявленные особенности метаболизма в средах культивирования позволяют использовать дополнительный неинвазивный метод для прогнозирования имплантационного потенциала эмбриона с целью повышения эффективности программ ЭКО.

#### Положения, выносимые на защиту

**1.** У пациенток репродуктивного возраста с бесплодием различного генеза и нормальным овариальным резервом, имеющих в анамнезе повторные неудачи имплантации, использование культуральной среды с добавлением гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) повышает эффективность методов вспомогательных репродуктивных технологий. Шансы наступления клинической беременности при переносе нативного эмбриона увеличиваются в 1,4 раза, при переносе размороженного эмбриона - в 5,6 раз.

**2.** У пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе при отсутствии значимых различий в морфологическом качестве перенесенных эмбрионов использование среды с добавлением гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) приводит к снижению частоты репродуктивных потерь до 12 недель беременности более чем в 4 раза (с 31,6% до 7,4%) и повышению частоты живорождения из расчета на количество наступивших беременностей до 88,9% против 63,2% при использовании классической среды.

**3.** Изменение профилей метаболитов в зависимости от исходов имплантации в группах с различными средами культивирования свидетельствует о необходимости переключения метаболических путей для успешного развития эмбриона. Существенными для имплантации на 3-е сутки в обеих группах являются сходные пути, связанные с метаболизмом фенилаланина и других аминокислот, витамина B6, ретинола и линоленовой кислоты, тогда как на 5-е

сутки в группе с добавлением GM-CSF преобладают метаболические пути превращения жирных кислот и сфинголипидов, в группе без данного фактора роста наиболее значимыми являются пути превращения аминокислот.

4. О высоком потенциале эмбриона к имплантации свидетельствует повышенный уровень потребления глюкозы в питательных средах на 3-е и 5-е сутки вне зависимости от используемой культуральной среды, что определяет предпочтительный выбор эмбриона для переноса в криоцикле.

#### Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовал в выборе темы научного исследования, разработке цели, задач и дизайна, систематизации данных литературы по теме работы. Автор лично принимал участие в ведении пациенток на всех этапах лечения бесплодия в программе ВРТ, сборе материала, участвовал в выполнении лабораторной части исследования, анализе, обобщении и статистической обработке полученных данных.

#### Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

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

#### Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Леонова Б.В. ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (руководитель отделения – д.м.н., профессор Калинина Е.А.).

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, все входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК.

#### Апробация материалов диссертации

Работа обсуждена на межклинической конференции отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия (02.09.2021г) и заседании

апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (18.10.2021г., протокол №6).

### Структура и объем диссертации

Диссертация изложена в традиционной форме на 133 страницах печатного текста. Состоит из оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 23 таблицами и 21 рисунком. Библиографический указатель включает 181 литературных источников, из них 12 русскоязычных и 169 иностранных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН Г.Т. Сухих). Набор пациентов осуществлялся в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Леонова Б.В. (руководитель отделения – д.м.н., профессор Калинина Е.А.). Лабораторные исследования проводились в лаборатории молекулярной патофизиологии (руководитель лаборатории – к.х.н. Бобров М.Ю.). Для решения поставленных задач было проведено проспективное исследование. С 2017 по 2019 г.г. в исследование была включена 91 пара, обратившаяся для лечения бесплодия методами ВРТ. На проведение исследования было получено разрешение комиссии по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

В соответствии с целью исследования были выделены следующие группы сравнения:

**1a** «+» группу составили 14 пациенток, эмбрионы которых культивировались в среде без добавления GM-CSF, у которых в результате селективного переноса эмбриона в цикле стимуляции наступила клиническая

беременность, **1а** «-» группу - 37 женщин, культивирование эмбрионов которых проводился без GM-CSF с отрицательным результатом лечения.

**2а** «+» группу составили 13 пациенток, эмбрионы которых культивировались в среде с добавлением GM-CSF и в цикле стимуляции наступила клиническая беременность, **2а** «-» группу - 25 женщин, культивирование эмбрионов с GM-CSF с отрицательным результатом лечения.

**1б** «+» группу составили 5 пациенток, эмбрионы которых культивировались в среде без добавления GM-CSF, у которых в результате селективного переноса эмбриона в цикле переноса размороженного эмбриона наступила клиническая беременность, **1б** «-» группу - 12 женщин, культивирование эмбрионов без GM-CSF с отрицательным результатом лечения.

**2б** «+» группу составили 14 пациенток, эмбрионы которых культивировались в среде с добавлением GM-CSF, в цикле переноса размороженного эмбриона наступила клиническая беременность, **2б** «-» группу - 6 женщин, культивирование эмбрионов с GM-CSF с отрицательным результатом лечения.

Критериями включения пациенток в исследование были: возраст от 18 до 37 лет включительно, нормальный овариальный резерв (уровень ФСГ на 2-3 день цикла  $\leq 12$  МЕ/л; АМГ не менее 1 нг/мл; по данным УЗИ органов малого таза – не менее 5 антральных фолликулов в каждом яичнике); наличие в анамнезе не менее 3 неудачных попыток ЭКО при переносе blastocyst хорошего качества (в том числе при переносе размороженных blastocyst).

Критерии невключения: наличие злокачественных новообразований любой локализации, в том числе в анамнезе; отягощенный акушерско-гинекологический анамнез (эндометриоз III-IV ст., миома матки больших размеров и др.); соматические и психические заболевания, являющиеся противопоказаниями для вынашивания беременности и родов; врожденные пороки развития или приобретенные деформации полости матки, при которых невозможна имплантация эмбрионов или вынашивание беременности; острые воспалительные

заболевания любой локализации; хронические заболевания в стадии обострения; сниженный овариальный резерв; тяжелая форма патозооспермии.

Пациентки были ознакомлены с целью и поставленными задачами исследования, подписали информированное согласие.

Перед началом программы ВРТ исследуемым пациенткам было проведено полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации №107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению".

Стимуляция функции яичников проводилась по стандартному протоколу с препаратами рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ) и антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) со 2-3 дня менструального цикла. Триггер овуляции вводили при достижении лидирующими фолликулами диаметра 17-19 мм. В качестве триггера овуляции использовали препарат хорионического гонадотропина человека (чХГ). Трансвагинальную пункцию фолликулов под ультразвуковым контролем проводили через 35 часов после введения триггера овуляции. Просмотр аспирированной фолликулярной жидкости осуществлял эмбриолог под контролем стереомикроскопа. После денудирования ооцитов оценивали степень их зрелости. Все зрелые ооциты оплодотворяли методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ). Оценку оплодотворения проводили через 14-16 часов после оплодотворения. Оплодотворение расценивали как нормальное при наличии двух пронуклеусов в цитоплазме, при их отсутствии или наличии одного или более двух пронуклеусов оплодотворение расценивали как аномальное.

Затем случайным образом производили разделение и последующий перенос полученных зигот в культуральные среды без добавления GM-CSF и с его добавлением, при этом концентрация рекомбинантного GM-CSF составляла 2 нг/мл, которая была рекомендована производителем. На 3 сутки культивирования проводили морфологическую оценку качества эмбрионов, принятую

Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов (Таблица 1), с последующим переносом их в новые среды культивирования без добавления р-GM-CSF и дальнейшее культивирование до 5 суток.

**Таблица 1. Классификация эмбрионов по морфологическим характеристикам на 3 сутки.**

| Классификация эмбрионов | Описание      |
|-------------------------|---------------|
| Отличные                | 7-12А, морула |
| Хорошие                 | 6А, 6-12 В    |
| Удовлетворительные      | 5А, 5В        |
| Неудовлетворительные    | Менее 5       |

Далее морфологическую оценку качества эмбрионов осуществляли на 5-е сутки согласно «модифицированной» классификации Gardner D. (ESHRE, 2011) (Таблица 2).

**Таблица 2. Классификация эмбрионов по морфологическим характеристикам на 5 сутки.**

| Классификация эмбрионов | Описание                             |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Отличные                | 3АА, 4АА, 5АА, 6АА                   |
| Хорошие                 | 3-6 АВ, 3-6 ВА, 1-2 АА               |
| Удовлетворительные      | 3-6ВВ, 3-6АС, 3-6СА,<br>1-2АВ, 1-2ВА |
| Неудовлетворительные    | 1-6ВС, 1-6СВ, 1-6СС,<br>1-2          |

Перенос одного эмбриона проводился на 5 сутки, ведение посттрансферного периода и диагностика беременности - по стандартизированной методике.

В случае отрицательного результата  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека ( $\beta$ -ХГЧ) у пациенток с витрифицированными эмбрионами проводили криоперенос в естественном цикле. Осуществляли УЗИ мониторинг для оценки величины М-ЭХО, трансформации эндометрия и

установления овуляции. Со следующего дня после овуляции назначали микронизированный прогестерон в дозе 200 мг x 3 раза в день вагинально для поддержки лютеиновой фазы. Перенос эмбриона в полость матки осуществляли на 19-21 день менструального цикла. Прием микронизированного прогестерона продолжали в течение 14 дней с последующим тестом на наличие беременности.

Из специальных методов исследования производился анализ параметров потребления компонентов культуральных сред эмбрионами 3-х и 5-х суток культивирования методом флуоресцентной фотометрии и проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) с последующей оценкой профиля метаболитов в культуральной среде.

Культивирование эмбрионов производили в индивидуальных каплях сред культивирования (CSC Irvine и EmbryoGen) одинакового объема (30 мкл). Образцы индивидуальных отработанных сред культивирования были отобраны в равных объемах для исследуемых групп, промаркированы и заморожены, забор осуществляли на 3 и 5 сутки (-80 °С).

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

Оценивали следующие исходы программ ВРТ: частота биохимической (сывороточная концентрация  $\beta$ -ХГЧ - более 20 МЕ/л) и клинической беременности (на основании визуализации плодного яйца при УЗИ через 21 день после ПЭ) из расчета на перенос эмбриона в полость матки; частота потери беременности до 12 недель гестации и живорождения из расчета на число наступивших.

Для статистической обработки данных использовали электронные таблицы «Microsoft Excel» и пакет прикладных программ «SPSS Statistics 17.0», «Statistica for Windows» v. 7.0. Статистически значимыми считали отличия при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты собственных исследований и их обсуждение

На первом этапе работы были проанализированы клинико-анамнестические данные включенных в исследование пациенток.

Средний возраст включенных в исследование пациенток составил  $31,9 \pm 3,3$  лет. При анализе антропометрических данных было выявлено, что средний рост пациенток был  $164,7 \pm 6,0$  см, вес -  $60,9 \pm 7,9$  кг, ИМТ -  $22,4 \pm 2,9$  кг/м<sup>2</sup>, что является нормой.

При изучении основных характеристик менструального цикла исследуемых женщин выявлено, что у большинства пациенток средний возраст менархе составил 13 лет. Средняя продолжительность менструального цикла находилась в пределах нормы, составляя 28 дней, менструального кровотечения - 5 дней.

Всем пациенткам, включенным в исследование, проводилась оценка гормонального профиля для изучения функционального состояния репродуктивной и эндокринной системы. Значимых отклонений не выявлено.

Проанализированные данные о типе бесплодия показали преобладание вторичного бесплодия 59,3% (n=54) над первичным 40,7% (n=37). В структуре причин вторичного бесплодия преобладали неразвивающиеся и эктопические беременности. Средняя продолжительность бесплодия составила 5 лет (от 1 года до 16 лет). Среди этиопатогенетических причин преобладающую часть составили сочетанный фактор 56,0% (n=51) и мужское бесплодие 39,6% (n=36).

В структуре гинекологических заболеваний чаще всего встречались пациентки с наружным генитальным эндометриозом I - II ст., частота встречаемости которого составила 24,2% (n=22).

На втором этапе нами было проведено сравнение параметров раннего эмбрионального развития при культивировании в двух средах: классической и с применением гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора.

Оценено морфологическое качество 330 эмбрионов 1 группы (культивирование до и после 3-х суток в среде без GM-CSF) и 332 эмбрионов 2 группы (культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, после чего культивирование до 5-х суток проводилось в среде без GM-CSF).

Нами получены данные о том, что частота формирования морулы и бластоцисты практически не различалась в группах сравнения (Таблицы 3, 4). Тем не менее, при более детальном анализе было выявлено, что в группе 2 (культивирование в среде с добавлением GM-CSF) на 3-е сутки после оплодотворения отмечалось меньшее количество эмбрионов неудовлетворительного качества и остановившихся в развитии по сравнению с группой 1 (без добавления GM-CSF).

**Таблица 3. Морфологическая характеристика качества эмбрионов на 3 сутки развития в группах сравнения**

| Показатель                              | Группа 1<br>(культивирование до и после 3-х суток в среде без GM-CSF)<br>(n =330) | Группа 2<br>(культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, после чего культивирование до 5-х суток в среде без GM-CSF)<br>(n =332) | P, $\chi^2$ -тест |
|---|---|---|-------------------|
| Эмбрионы отличного качества             | 49,4%<br>(n =163)   | 51.6%<br>(n =171)   | 0.587             |
| Эмбрионы хорошего качества              | 28,5%<br>(n =94)  | 31.9%<br>(n =106)   | 0.335             |
| Эмбрионы удовлетворительного качества   | 4,2%<br>(n =14)   | 7.2%<br>(n =24)   | 0.099             |
| Эмбрионы неудовлетворительного качества | 9,4%<br>(n =31)   | 6.0%<br>(n =20)   | 0.104             |
| Эмбрионы, остановившиеся в развитии     | 8,5%<br>(n =28)   | 3.3%<br>(n =11)   | <b>0.005</b>      |

данные представлены как абсолютное число и %

**Таблица 4. Морфологическая характеристика качества эмбрионов на 5 сутки развития в группах сравнения.**

| <b>Показатель</b>                       | <b>Группа 1</b><br>(культивирование до и после 3-х суток в среде без GM-CSF)<br>(n =330) | <b>Группа 2</b><br>(культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, после чего культивирование до 5-х суток в среде без GM-CSF)<br>(n =332) | <b>P,<br/>χ<sup>2</sup>-тест</b> |
|---|--|--|----------------------------------|
| Эмбрионы отличного качества             | 23,9%<br>(n =79)   | 19,6%<br>(n = 65)  | 0.174                            |
| Эмбрионы хорошего качества              | 11,5%<br>(n = 38)  | 15,7 %<br>(n = 52)   | 0.120                            |
| Эмбрионы удовлетворительного качества   | 6,1%<br>(n =20)  | 3,6%<br>(n = 12)   | 0.143                            |
| Эмбрионы неудовлетворительного качества | 5,8 %<br>(n = 19)  | 7,8%<br>(n=26)   | 0.290                            |
| Эмбрионы, остановившиеся в развитии     | 39,1%<br>(n = 129)   | 33,4%<br>(n = 111)   | 0.130                            |
| Морула                                  | 13,6%<br>(n = 45)  | 19,9%<br>(n = 66)  | <b>0.032</b>                     |

данные представлены как абсолютное число и %

На третьем этапе была оценена частота наступления беременности (ЧНБ) и исходы программ ВРТ в сравниваемых группах с учетом клинко-лабораторных данных. У пациенток группы 2 результатом культивирования эмбрионов в среде с GM-CSF в цикле стимуляции стало незначительное увеличение ЧНБ из расчета на перенос эмбриона (34,2% против 27,5%) и значимое увеличение ЧНБ в криоцикле (70,0% против 29,4% при классическом культивировании). Отношение шансов наступления беременности составило 5,60 (1,13; 29,42)  $p=0,015$ . Особо следует отметить увеличение частоты живорождения из расчета на количество наступивших беременностей – 92,3% (n=12) против 64,3% (n=9) и отсутствие неразвивающихся беременностей при переносе нативных эмбрионов в группе 2 с добавлением GM-CSF по сравнению с группой 1, в которой этот показатель составил – 28,6 % (n=4). В цикле переноса размороженного эмбриона отмечено увеличение живорождения в группе 2 - 85,7% (n=12) против 60,0% (n=3) и снижение количества неразвивающихся беременностей до 14,3% (n=2) против 40,0% (n=2) в группе 1 (Таблица 5).

**Таблица 5. Исходы программ ВРТ у пациенток групп 1 (культивирование в среде без GM-CSF) и 2 (культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, после чего культивирование до 5-х суток в среде без GM-CSF).**

| Показатели<br>(частота)  | Цикл стимуляции<br>(ПЭ) |                     | Цикл переноса размороженного<br>эмбриона (РЭ) |                     | p, $\chi^2$                                      |
|--|-------------------------|---------------------|---|---------------------|--|
|  | Группа 1а<br>(n=51)     | Группа 2а<br>(n=38) | Группа 1б<br>(n=17)                           | Группа 2б<br>(n=20) |  |
| Биохимическая беременность<br>из расчета на перенос<br>эмбриона                          | 2,0%<br>(n=1)           | 2,6%<br>(n=1)       | 0%<br>(n=0)                                   | 0%<br>(n=0)         | p 1а-2а =<br>0,845                               |
| Клиническая беременность<br>из расчета на перенос<br>эмбриона                            | 27,5%<br>(n=14)         | 34,2%<br>(n=13)     | 29,4%<br>(n=5)                                | 70,0%<br>(n=14)     | p 1а-2а =<br>0,495<br><b>p 1б-2б =<br/>0,015</b> |
| Неразвивающаяся<br>беременность<br>из расчета на количество<br>наступивших беременностей | 28,6%<br>(n=4)          | 0%<br>(n=0)         | 40,0%<br>(n=2)                                | 14,3%<br>(n=2)      | p 1а-2а =<br>0,040<br>p 1б-2б =<br>0,239         |
| Эктопическая беременность<br>из расчета на количество<br>наступивших                     | 7,1%<br>(n=1)           | 7,7%<br>(n=1)       | 0%<br>(n=0)                                   | 0%<br>(n=0)         | p 1а-2а =<br>0,957                               |
| Живорождение<br>из расчета на количество<br>наступивших                                  | 64,3%<br>(n=9)          | 92,3%<br>(n=12)     | 60,0%<br>(n=3)                                | 85,7%<br>(n=12)     | p 1а-2а =<br>0,086<br>p 1б-2б =<br>0,239         |

При анализе клинико-anamнестических и лабораторных данных пациенток, разделенных на группы в зависимости от среды культивирования (отсутствие или наступление беременности) не было обнаружено статистически значимых различий по возрасту женщин, их антропометрическим данным и данным гормонального статуса. Однако было выявлено значимое увеличение ЧНБ у пациенток с наличием НГЭ в группе 2а («+») (с добавлением GM-CSF) в цикле переноса нативного эмбриона (Таблица 6), а также значимое уменьшение ЧНБ в группе 1 б («-») (без добавления GM-CSF) в цикле переноса размороженного эмбриона (Таблица 7).

**Таблица 6. Клиническая характеристика пациенток с селективным переносом эмбриона в цикле стимуляции 1 гр. (культивирование в среде без GM-CSF) и 2 гр. (культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, затем культивирование до 5-х суток в среде без GM-CSF).**

| Показатели            | Группа 1а***<br>(«-») n=37 | Группа 1а***<br>(«+») n=14 | Группа 2а***<br>(«-») n=25 | Группа 2а***<br>(«+») n=13 | p1-<br>p2-                  |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Возраст, лет*         | 33<br>(29-35)              | 31,5<br>(29-33,75)         | 33<br>(31-34)              | 33<br>(31-35)              | p1-0,263<br>p2-0,635        |
| Возраст супруга, лет* | 35 (31-38)                 | 34 (30-36,8)               | 34 (32-36)                 | 35 (34-39)                 | p1 < 0,05<br>p2 < 0,05      |
| ИМТ*                  | 22,2<br>(21,0-24,2)        | 21,9<br>(20,8-23,8)        | 22,2<br>(20,4-24,6)        | 21,9<br>(21,2-23,9)        | p1 < 0,05<br>p2 < 0,05      |
| НГЭ I-II ст.**        | 18,9%<br>(n=7)             | 21,4%<br>(n=3)             | 20,0%<br>(n=5)             | 53,8%<br>(n=7)             | p1-0,842<br><b>p2-0,036</b> |
| Мнома матки**         | 18,9%<br>(n=7)             | 7,1%<br>(n=1)              | 4,0%<br>(n=1)              | 23,1%<br>(n=3)             | p1-0,307<br>p2-0,073        |

\* данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля; тест Манна-Уитни

\*\*данные представлены как абсолютное число и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\*\* а – в цикле стимуляции

**Таблица 7. Клиническая характеристика пациенток с селективным переносом эмбриона в цикле переноса размороженного эмбриона 1 (культивирование в среде без GM-CSF) и 2 групп (культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, затем культивирование до 5-х суток в среде без GM-CSF) групп**

| Показатели               | Группа 1б***<br>(«-») n=12 | Группа 1б***<br>(«+») n=5 | Группа 2 б***<br>(«-») n=6 | Группа 2 б***<br>(«+») n=14 | p1-<br>p2-                    |
|--------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Возраст, лет*            | 32 (30-34)                 | 33(32-34)                 | 34 (33-35)                 | 29 (28-34)                  | p1-0,768<br>p2-0,098          |
| Возраст супруга,<br>лет* | 36 (32-40)                 | 34 (33-35)                | 35,5 (32,8-36)             | 32,5 (32-38)                | p1 < 0,05<br>p2 < 0,05        |
| ИМТ*                     | 22,2<br>(22,1-22,9)        | 22,2<br>(20,8-22,8)       | 21,8<br>(21,2-27,8)        | 21,8<br>(21,0-24,0)         | p1 < 0,05<br>p2 < 0,05        |
| НГЭ I-II ст.**           | 66,7%<br>(n=8)             | 0%<br>(n=0)               | 0%<br>(n=0)                | 14,3%<br>(n=2)              | <b>p1- 0,015</b><br>p2- 0,342 |
| Мнома матки**            | 16,7%<br>(n=2)             | 0%<br>(n=0)               | 16,7%<br>(n=1)             | 21,4%<br>(n=3)              | p1- 1,000<br>p2- 0,812        |

\* данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля; тест Манна-Уитни

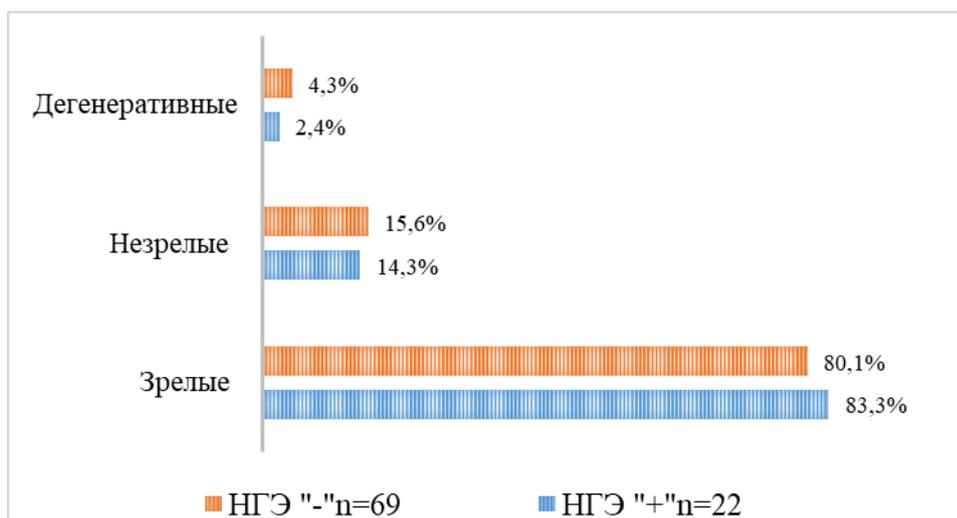
\*\*данные представлены как абсолютное число и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\*\* б – в криоцикле

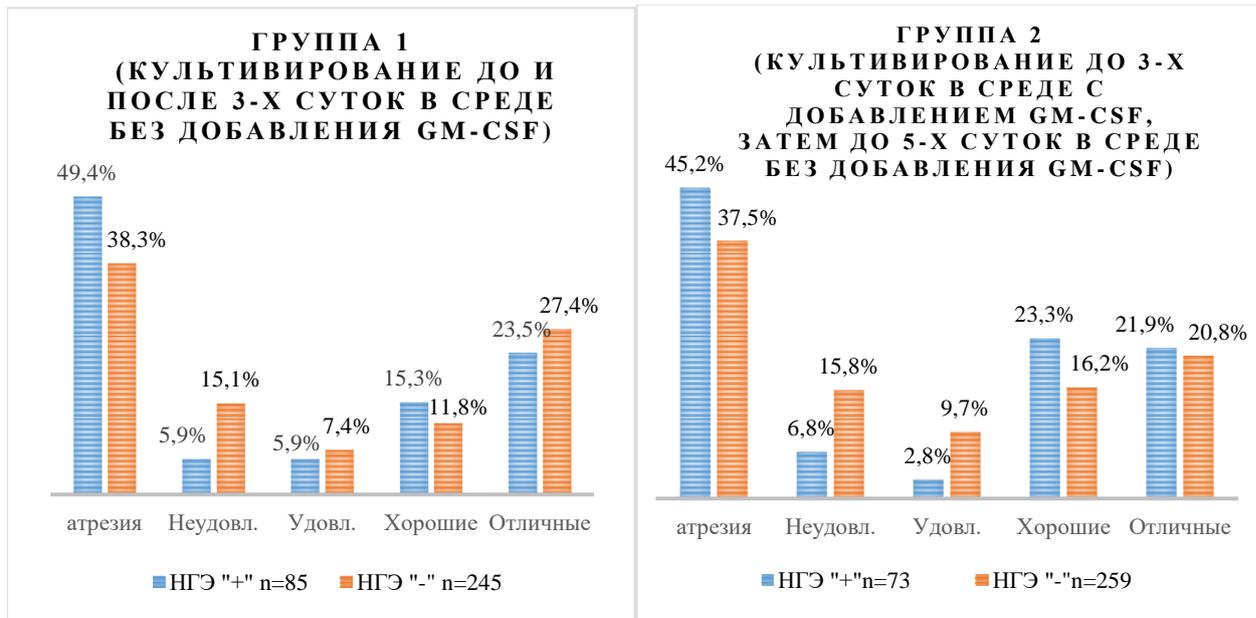
Параметры стимулированного цикла достоверно не отличались между сравниваемыми группами. Для стимуляции функции яичников всем пациенткам

была назначена практически одинаковая доза гонадотропинов, средняя продолжительность стимуляции составляла около 9 дней. Помимо этого, возраст мужчин, включенных в исследование, а также показатели их спермограммы статистически достоверно не отличались между группами.

В нашем исследовании в процессе детального анализа клинико-анамнестических данных пациенток с наличием или отсутствием НГЭ и исходов стимуляции было обнаружено, что наличие НГЭ у пациенток не оказывало негативного влияния на качество ооцитов (Рисунок 1), однако выявлено негативное влияние на морфологическое качество полученных эмбрионов, что согласуется с другими ранее проведенными исследованиями (Адамян Л.В., 2013, Freis A., et al., 2018, Murta M., et al., 2018). Вместе с тем, обращает на себя внимание факт положительного влияния культивирования в среде с GM-CSF на морфологическое качество полученных эмбрионов. Процентное соотношение развившихся эмбрионов отличного и хорошего качества было выше у пациенток с наличием НГЭ по сравнению с его отсутствием (Рисунок 2).



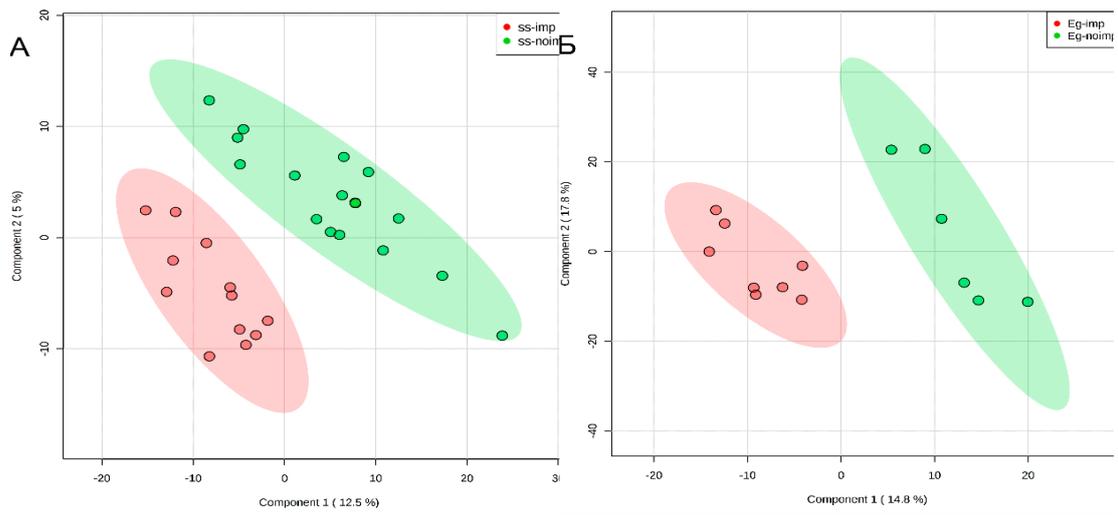
**Рис. 1.** Качественное распределение ооцитов в зависимости от наличия или отсутствия НГЭ у исследуемых пациенток.



**Рис. 2.** Морфологическая характеристика качества эмбрионов разных групп в зависимости от наличия или отсутствия НГЭ у исследуемых пациенток.

На четвертом этапе работы производили метаболомный анализ сред культивирования 3-х и 5-х суток развития эмбрионов «отличного» морфологического класса, согласно «модифицированной» классификации Gardner D. (ESHRE, 2011), в среде, содержащей и не содержащей GM-CSF. Было исследовано 45 образцов 3-х суток культивирования и 42 образца 5-х суток культивирования.

При проведении дискриминантного анализа методом частичных наименьших квадратов (PLS-DA) были получены данные, которые позволили выявить достоверные различия между исследуемыми группами в зависимости от вида среды культивирования и исходов после переноса эмбриона в полость матки пациенток. При этом во всех случаях происходило четкое кластерирование образцов сред имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов, как при использовании среды, не содержащей GM-CSF на протяжении 5 суток, так и при последовательном культивировании в средах, содержащих и не содержащих GM-CSF. В то же время были выявлены более выраженные различия между группами на 3 сутки, что отражается в большем количестве молекулярных ионов, обуславливающих кластерирование образцов при PLS-DA анализе (Рисунки 3, 4).

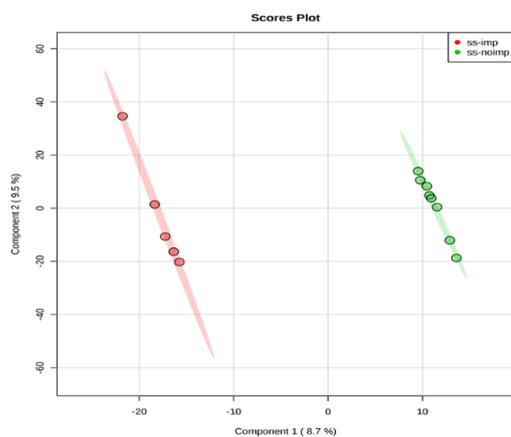


Гр. 1-3 (культивирование в среде без добавления GM-CSF)

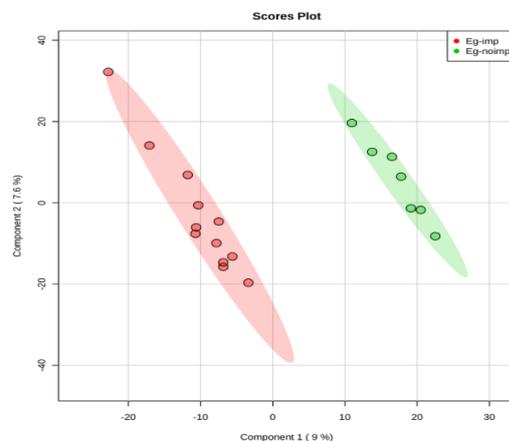
Гр. 2-3 (культивирование в среде с добавлением GM-CSF)

**Рис. 3.** Различия профилей метаболитов в питательных средах имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов, выявленные при помощи дискриминантного анализа (PLS-DA) на 3 сутки культивирования.

● - имплантация, ● - отсутствие имплантации.



Гр. 1-5 (культивирование до и после 3-х суток в среде без добавления GM-CSF)



Гр. 2-5 (культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, затем культивирование до 5-х суток в среде без GM-CSF)

**Рис.4.** PLS-DA. Различия профилей метаболитов в питательных средах на 5 сутки культивирования.

● - имплантация, ● - отсутствие имплантации.

Затем с помощью использования баз данных HMDB, KEGG была произведена первичная идентификация молекулярных ионов, в результате

которой были получены списки потенциальных метаболитов с различными уровнями представленности в группах пациенток с имплантацией и ее отсутствием (Таблицы 8, 9).

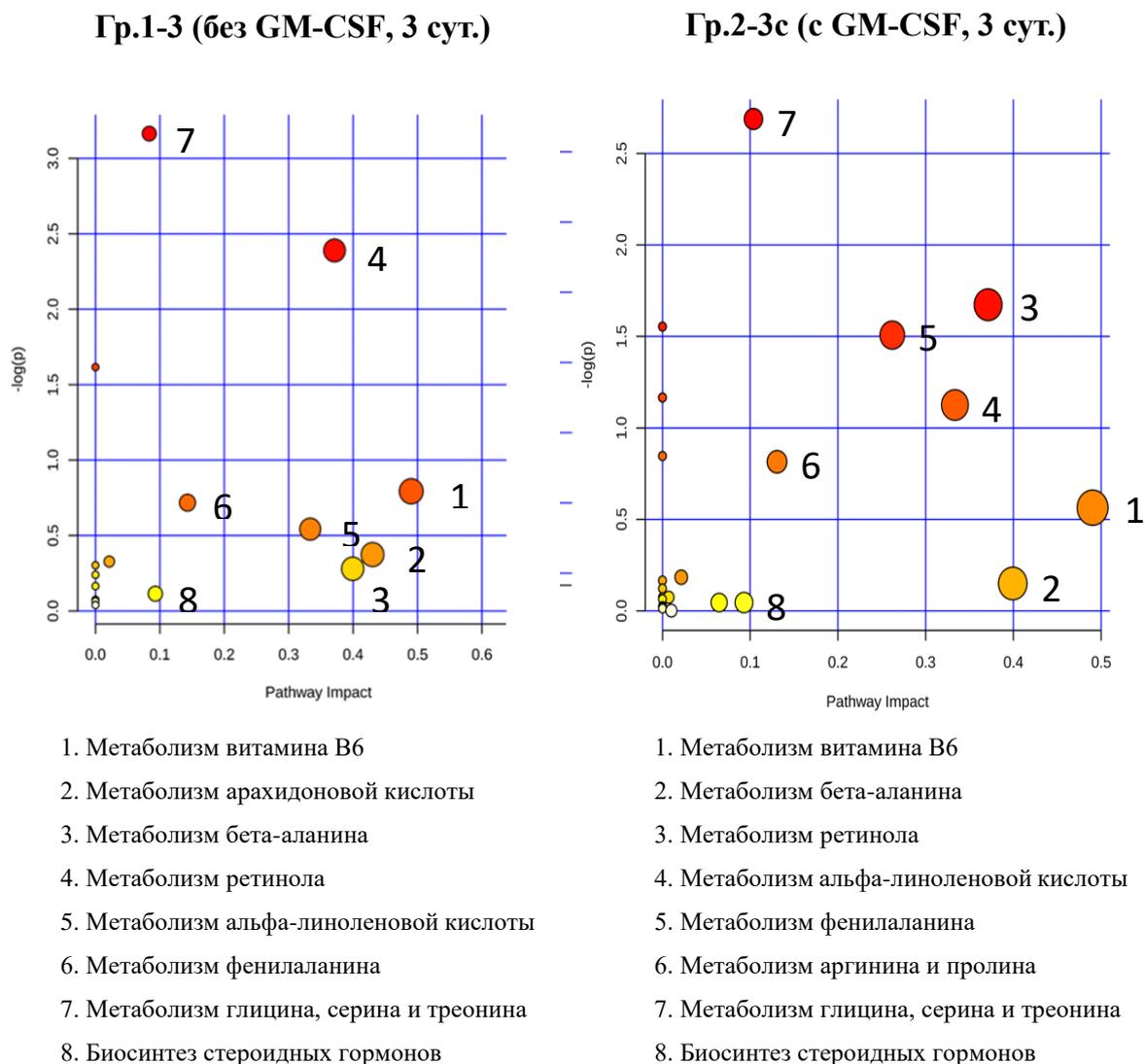
**Таблица 8. Списки метаболитов на 3 сутки культивирования, идентифицированных по базам данных HMDB, KEGG.**

| Гр.1-3<br>(без добавления GM-CSF, 3 сут.) |             |           | Гр.2-3<br>(с добавлением GM-CSF, 3 сут.) |             |           |
|---|-------------|-----------|--|-------------|-----------|
| Название                                  | KEGG индекс | Кратность | Название                                 | KEGG индекс | Кратность |
| Ретиновая кислота                         | c00777      | + 1,28    | Фенилпируват                             | c00166      | + 2,57    |
| Гамма- линоленовая кислота                | c06426      | + 1,28    | Фенилуксусная кислота                    | c07086      | + 1,63    |
| Арахидоновая кислота                      | c00219      | + 1,24    | Андростерон                              | c00523      | + 2,05    |
| Пиридоксаль                               | c00250      | + 1,28    | Дигидротестотерон                        | c03917      | + 2,05    |
| Фенилацетальдегид                         | c00601      | + 1,25    | S-аденозил-метионинамин                  | c01137      | + 1,5     |
| Простагландин G2                          | c05956      | - 5,56    | 2-оксо-4-метилтибутановая кислота        | c01180      | - 5,91    |
| L-аланин                                  | c00041      | + 1,21    | Простагландин G2                         | c05956      | + 1,75    |
| Андростерон                               | c00523      | + 1,41    | 4-гидроксифенилацетальдегид              | c03765      | + 1,63    |

Анализ метаболических путей, участниками которых могут быть выявленные метаболиты, показал, что на 3-и сутки как при культивировании в среде без добавления GM-CSF, так и в среде с добавлением GM-CSF наблюдаются схожие пути метаболизма (метаболизм витамина B6, метаболизм бета-аланина, метаболизм ретинола, метаболизм альфа-линоленовой кислоты, метаболизм фенилаланина, метаболизм глицина, серина и треонина, биосинтез стероидных гормонов) (Рисунок 5). При этом наблюдалось изменение представленности разных метаболитов для каждого пути в соответствующей группе.

Таблица 9. Списки метаболитов на 5 сутки культивирования, идентифицированных по базам данных HMDB, KEGG.

| Гр.1-5<br>(без добавления GM-CSF, 5 сут.) |             |           | Гр.2-5<br>(без добавления GM-CSF, 5 сут.) |             |           |
|---|-------------|-----------|---|-------------|-----------|
| Название                                  | KEGG индекс | Кратность | Название                                  | KEGG индекс | Кратность |
| L-фенилаланин                             | c00079      | - 1,2     | Фенилпируват                              | c00166      | + 1,75    |
| Фенэтиламин                               | c05332      | - 3,88    | 2-гидроксифенилацетат                     | c05852      | + 4,97    |
| L-триптофан                               | c00078      | + 1,18    | L-аргинин                                 | c00062      | + 1,35    |
| Полуальдегид 2-аминомуконовой кислоты     | c03824      | + 2,8     | Фосфокреатин                              | c02305      | +5,6      |
| Индолацетальдегид                         | c00637      | + 1,8     | 2-оксоаргинин                             | c03771      | +1,4      |
| L-глутамат                                | c00217      | - 2,25    | L-серин                                   | c00065      | - 5,57    |
| Пироглутамовая кислота                    | c02237      | - 2,25    | Пальмитиновая кислота                     | c00249      | + 1,36    |
| Аминоадипиновая кислота                   | c00956      | + 1,6     | Стеариновая кислота                       | c01630      | + 2,87    |
| Тиоцистеин                                | c01962      | +1,3      | Линолевая кислота                         | c01595      | - 21,4    |
| Молочная кислота                          | c00186      | - 15,84   | Гамма-линолевая кислота                   | c06426      | + 1,36    |
| Гидрокипропионовая кислота                | c01013      | - 15,84   | Дигомо-гамма-линолевая кислота            | c03242      | - 4       |
| 4-Пиридоксиновая кислота                  | c00847      | + 1,26    | Миристиновая кислота                      | c06424      | - 3,86    |
| Простагландин G2                          | c05956      | -1,85     | Альфа-линолевая кислота                   | c06427      | + 1,36    |
|   |             |           | Стеаридоновая кислота                     | c16300      | + 1,5     |
|   |             |           | Простагландин G2                          | c05956      | - 2,27    |
|   |             |           | Сфинганин                                 | c00836      | + 1,66    |
|   |             |           | Фитосфингозин                             | c12144      | + 3,63    |
|   |             |           | L-гулонат                                 | c00800      | 1,17      |
|   |             |           | Ретиновая кислота                         | c00777      | 7,04      |

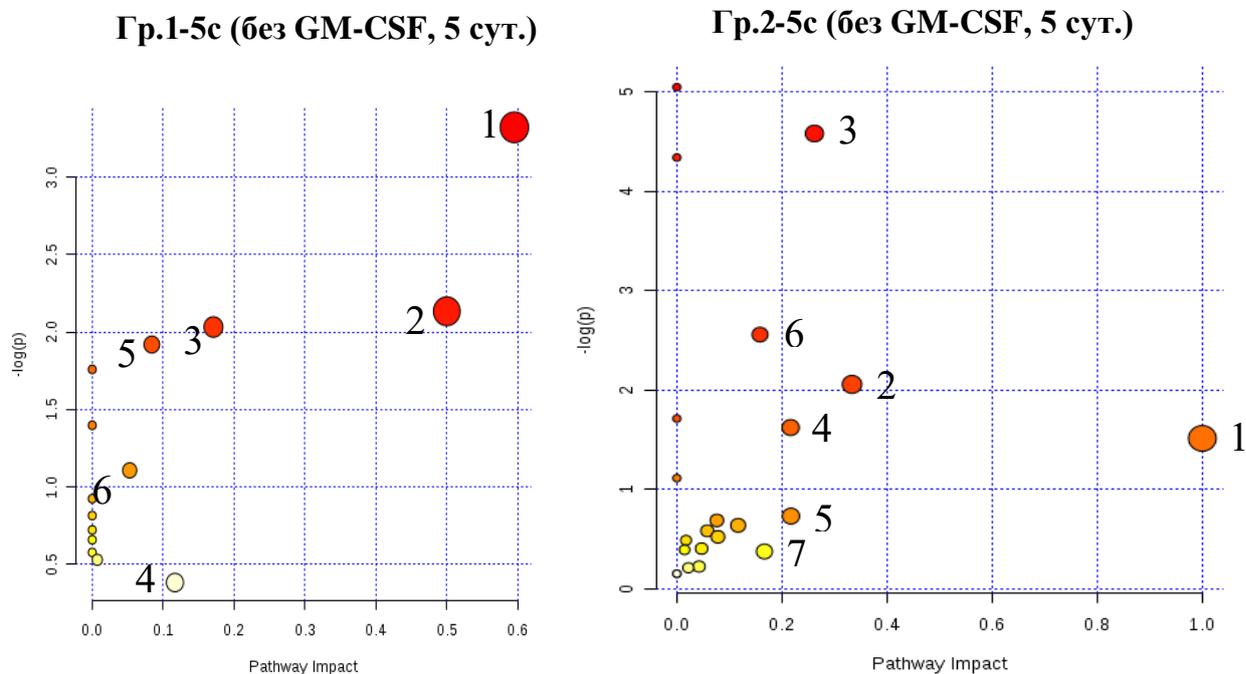


**Рис. 5.** Анализ потенциальных путей биосинтеза и метаболизма, включающих выявленные в питательных средах метаболиты на третьи сутки культивирования

На 5 сутки в группе 1 сохраняется присутствие путей, ассоциированных с биосинтезом аминокислот, а во 2-й группе обращает на себя внимание появление путей биосинтеза жирных кислот и сфинголипидов. С учетом инкубации эмбрионов обеих групп в среде без добавления GM-CSF после третьих суток, можно предположить, что появление в средах второй группы данных метаболитов связано с влиянием среды, содержащей GM-CSF (Рисунок 6).

Необходимо отметить, что на 3-и сутки обогащение списков идентифицированных молекулярных ионов приводит к обнаружению меньшего количества метаболических путей. Это может быть связано с невысокой

метаболической активностью эмбрионов на данной стадии, либо невысокой концентрацией образуемых метаболитов и, соответственно, недостаточной чувствительностью детектирующего оборудования.



1. Метаболизм фенилаланина
2. Биосинтез фенилаланина, тирозина и триптофана
3. Метаболизм триптофана
4. Метаболизм арахидоновой кислоты
5. Метаболизм пирувата
6. Метаболизм аргинина и пролина

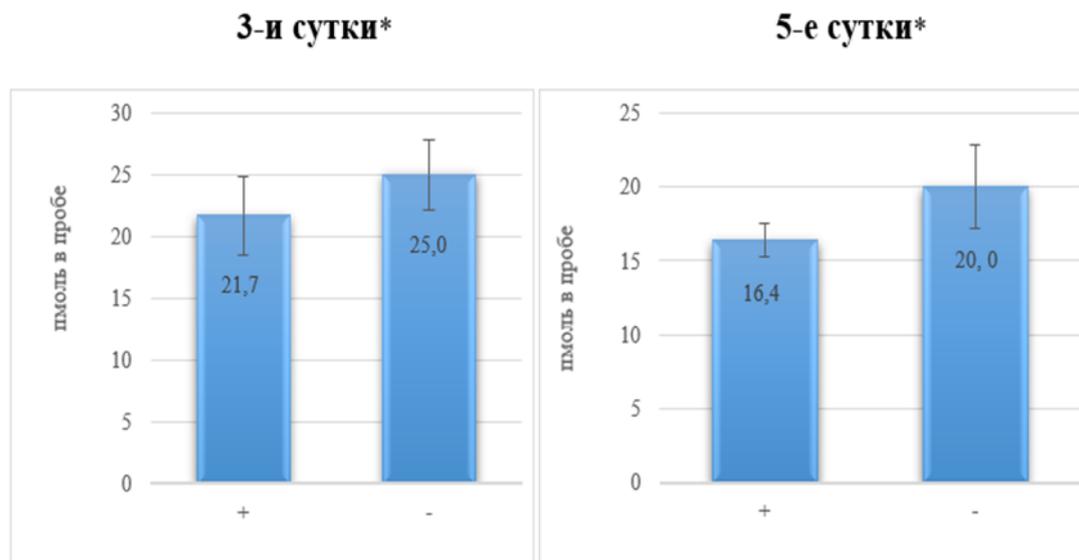
1. Метаболизм линолевой кислоты
2. Метаболизм альфа-линоленовой кислоты
3. Метаболизм фенилаланина
4. Метаболизм глицина, серина и треонина
5. Метаболизм ретинола
6. Метаболизм сфинголипидов
7. Метаболизм арахидоновой кислоты

**Рис. 6.** Анализ потенциальных путей биосинтеза и метаболизма, включающих выявленные метаболиты в питательных средах на пятые сутки культивирования

Полученные данные об изменении молекулярных профилей питательных сред в группах с различными исходами имплантации свидетельствуют о значимой роли переключения метаболических путей на стадии культивирования в формировании имплантационного потенциала.

Так же в данной работе мы провели исследование, где оценивали вероятность имплантации эмбрионов отличного морфологического качества на 3-е и 5-е сутки

развития в разных средах культивирования (содержащей GM-CSF или не содержащей) в зависимости от уровня потребления глюкозы в культуральных средах.

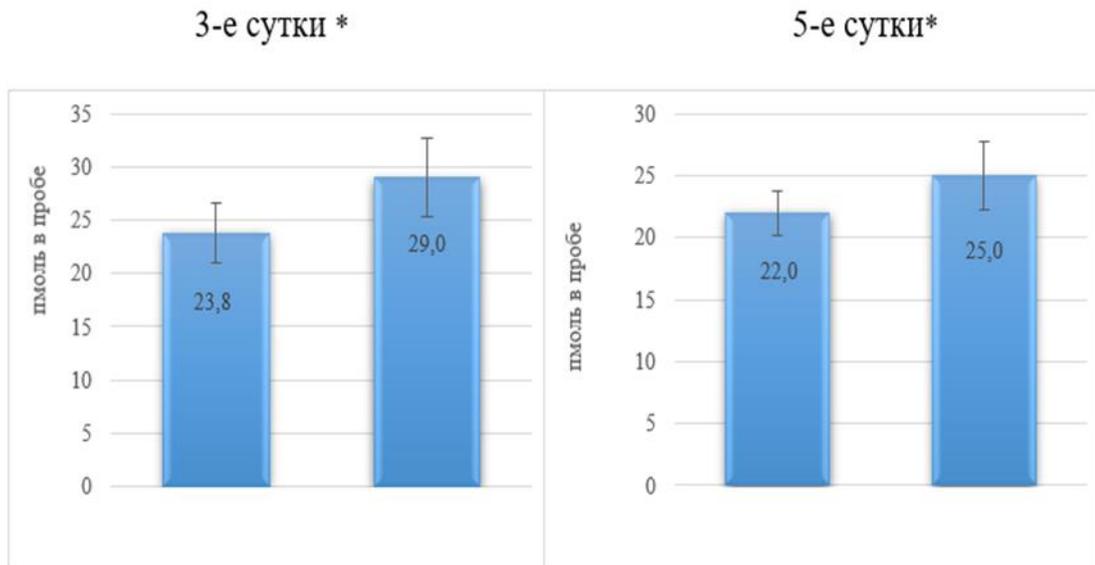


\* данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение; содержание глюкозы пмоль в пробе

**Рис. 7.** Изменение содержания глюкозы в питательных средах имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов группы 1 на 3-и и 5-е сутки культивирования (до и после 3-х суток в среде без добавления GM-CSF).

Средний показатель уровня глюкозы в культуральных средах для имплантировавшихся эмбрионов группы 1 (культивирование до и после 3-х суток в среде без добавления GM-CSF) на 3 сутки составил  $21,7 \pm 3,17$  пмоль в пробе, для неимплантировавшихся эмбрионов -  $25,03 \pm 1,75$  (критерий Манна-Уитни,  $p = 0,048$ ), на 5 сутки для имплантировавшихся эмбрионов -  $16,4 \pm 1,11$ , для неимплантировавшихся эмбрионов -  $20,0 \pm 2,78$  ( $p = 0,032$ ) (Рисунок 7).

Так показатели уровня глюкозы в культуральных средах для имплантировавшихся эмбрионов группы 2 (культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, затем культивирование до 5-х суток в среде без GM-CSF) на 3 сутки составили  $23,8 \pm 2,79$  пмоль в пробе, для неимплантировавшихся эмбрионов -  $29,0 \pm 3,69$  ( $p = 0,04$ ), на 5 сутки имплантировавшихся эмбрионов -  $22,0 \pm 1,83$ , для неимплантировавшихся -  $25,0 \pm 2,72$  ( $p = 0,05$ ) (Рисунок 8).



\* данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение; содержание глюкозы пмоль в пробе

**Рис. 8.** Изменение содержания глюкозы в питательных средах имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов группы 2 на 3-и и 5-е сутки культивирования (до 3-х суток среда с GM-CSF, затем до 5-х суток без GM-CSF).

При анализе содержания уровня глюкозы в культуральных средах установлено, что критерием удачной имплантации может служить более высокий уровень потребления глюкозы эмбрионами вне зависимости от используемых культуральных сред (с добавлением GM-CSF и без его добавления).

Таким образом, потребление глюкозы не является единственным определяющим фактором успешной имплантации, но может служить одним из прогностических критериев.

На основании полученных данных разработан алгоритм ведения пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе (Рисунок 9).



**Рис. 9.** Алгоритм ведения пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

## ВЫВОДЫ

**1.** Повторные неудачи имплантации у пациенток молодого возраста, имеющих нормальный овариальный резерв, ассоциированы с преобладанием вторичного бесплодия (59,3%) и низким паритетом (роды в анамнезе лишь у 14,3% пациенток).

2. У женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе при всех типах и формах бесплодия культивирование эмбрионов в среде, содержащей в своем составе GM-CSF, не оказывает существенного положительного влияния на морфологическое качество эмбрионов, однако отмечена тенденция к увеличению частоты наступления клинической беременности в циклах переноса нативного эмбриона до 34,2% против 27,5% (в среде без добавления GM-CSF) и снижение частоты неразвивающихся беременностей до 0% против 28,6% от числа наступивших.

3. В циклах переноса размороженных эмбрионов 5 или 6-х суток развития частота наступления беременности из расчета на перенос в группе 2 (среда GM-CSF) составила 70% против 29,4% (без добавления GM-CSF), а частота неразвивающихся беременностей – 14,3% против 40% от числа наступивших.

4. У пациенток с наружным генитальным эндометриозом культивирование эмбрионов в среде, содержащей в своем составе GM-CSF, приводит не только к улучшению морфологического качества эмбрионов, но и к значимому увеличению частоты наступления беременности в циклах переноса нативного эмбриона 5-х суток развития до 53,8% против 20%.

5. Профилирование метаболитов на 3-и и 5-е сутки культивирования позволяет дифференцировать эмбрионы с различными исходами имплантации вне зависимости от используемых сред культивирования. Выявленные в результате профилирования изменения регуляции путей превращения ряда аминокислот и жирных кислот могут лежать в основе снижения способности эмбрионов к имплантации.

6. Возможным механизмом повышения имплантационного потенциала эмбрионов, культивируемых в среде с GM-CSF, является стимуляция биосинтеза и метаболизма липидов и жирных кислот.

7. Критерием удачной имплантации служит более высокий уровень потребления глюкозы эмбрионами вне зависимости от используемой культуральной среды, по сравнению с неимплантировавшимися эмбрионами.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам с повторными неудачами имплантации в анамнезе показано культивирование эмбрионов в среде, содержащей в своем составе GM-CSF, в связи с повышением эффективности циклов ВРТ.

2. Для пациенток с ПНИ в анамнезе в программах ВРТ предпочтительным является отказ от переноса нативного эмбриона и криоконсервация всех полученных эмбрионов с последующим переносом в криоцикле.

3. Пациенткам с наличием НГЭ рекомендовано культивирование эмбрионов в среде, содержащей в своем составе GM-CSF, так как данная среда оказывает положительное влияние на морфологическое качество эмбрионов, приводя к увеличению частоты наступления беременности.

4. Профилирование метаболитов в питательных средах на разных сроках культивирования может быть использовано для дальнейшей валидации в качестве более точного метода отбора эмбриона для последующего переноса.

5. При наличии двух и более криоконсервированных эмбрионов отбор эмбриона для селективного переноса в полость матки может быть осуществлен как на основании морфологии эмбриона, так и на основании потребления глюкозы (при наличии эмбрионов одинакового морфологического качества).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) Профилирование метаболитов в питательных средах пятидневных эмбрионов человека / Зорина И.М., Эльдаров Ч.М., **Ярыгина С.А.**, Макарова Н.П., Трофимов Д.Ю., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Бобров М.Ю. // **Биомедицинская химия** – 2017. – №5. С. 385-391.

2) Анализ потребления глюкозы и глутамата в питательных средах как метод оценки качества эмбрионов человека пятых суток развития / Зорина И.М., Смольникова В.Ю., Эльдаров Ч.М., **Ярыгина С.А.**, Горшинова В.К., Макарова Н.П., Калинина Е.А., Бобров М.Ю. // **Акушерство и гинекология** – 2018. – №5. С. 64-69.

- 3) Культивирование эмбрионов в среде, содержащей в своем составе гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор в программах ВРТ / **Ярыгина С.А.**, Смольникова В.Ю., Бобров М.Ю., Эльдаров Ч.М., Макарова Н.П. // **Акушерство и гинекология** – 2019. – №1. С. 50-54.
- 4) Анализ метаболитов в различных средах культивирования эмбрионов человека / **Ярыгина С.А.**, Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Эльдаров Ч.М., Гамисония А.М., Макарова Н.П., Бобров М.Ю. // **Акушерство и гинекология** – 2020. – №11. С. 114-123.