

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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

На правах рукописи

**Ярыгина
Светлана Анатольевна**

**Повышение эффективности программ вспомогательных репродуктивных
технологий путем модификации эмбриологического этапа**

3.1.4. Акушерство и гинекология

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

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:
доктор медицинских наук, доцент
Смольникова В.Ю.
кандидат химических наук
Бобров М.Ю.

МОСКВА – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I	
1.1. Бесплодие — актуальная проблема современных женщин	12
1.2. Повторные неудачи имплантации	15
1.3 История развития культуральных сред.....	20
1.4 Гранулоцитарно – макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).....	23
1.5 Оценка качества эмбрионов по морфологическим критериям.....	31
1.6 Молекулярный состав культуральных сред эмбрионов человека.....	35
1.6.1 Утилизация глюкозы.....	37
1.6.2. Аминокислоты.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1. Материал исследования.....	44
2.2. Дизайн исследования.....	46
2.3. Методы исследования.....	51
2.3.1. Общеклинические методы исследования.....	53
2.3.2. Гормональное исследование.....	55
2.3.3. Ультразвуковое исследование органов малого таза.....	56
2.3.4. Спермиологическое исследование эякулята.....	57
2.3.5. Протокол стимуляции функции яичников.....	58
2.3.6. Трансвагинальная пункция яичников.....	59
2.3.7. Метод оплодотворения ооцитов и культивирования дробящихся эмбрионов in vitro.....	60
2.3.8. Перенос эмбрионов в полость матки.....	61
2.3.9. Поддержка лютеиновой фазы.....	62

2.3.10. Диагностика наступления беременности.....	62
2.3.11. Подготовка эндометрия в криопротоколе	62
2.3.12. Специальные методы исследования.....	62
2.3.13. Статистический анализ полученных данных.....	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	67
3.1. Клинико-anamнестическая характеристика включенных в исследование пациенток.....	67
3.2. Лабораторные данные включенных в исследование пациенток.....	73
3.3. Особенности протоколов стимуляции суперовуляции, фолликуло- и оогенеза.....	74
3.4. Характеристика сперматогенеза в супружеской паре.....	76
3.5. Параметры раннего эмбриогенеза.....	77
3.6 Эффективность программ ВРТ.....	82
3.7 Ассоциация профиля метаболитов сред культивирования на 3-и и 5-е сутки культивирования с вероятностью наступления беременности.....	87
3.8 Ассоциация уровня потребления глюкозы эмбрионов в разных средах культивирования с вероятностью наступления беременности.....	95
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	98
Выводы.....	110
Практические рекомендации	112
Список сокращений и условных обозначений	113
Список литературы	115
Приложение	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

С момента появления и дальнейшего развития методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) остается актуальным вопрос повышения эффективности лечения. Однако, несмотря на достижения в этой области, существенно повысить результативность циклов стимуляции суперовуляции в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и переноса эмбриона в полость матки (ПЭ) до сих пор не удается [1].

Успешность цикла ЭКО заключается не только в получении зрелых ооцитов, но и развившихся в результате их оплодотворения эмбрионов отличного качества. Но даже перенос морфологически качественного эмбриона в полость матки, где эндометрий структурно соответствует фазе менструального цикла, не всегда приводит к наступлению долгожданной беременности, а в ряде случаев она может прерваться на ранних сроках её развития.

Процесс имплантации эмбриона зависит от синхронизации различных факторов, таких как качество эмбриона, оптимальные условия культивирования, восприимчивость эндометрия, состояние материнской иммунной системы и т.д.

В клинической практике имплантация считается успешной при наличии ультразвуковых признаков плодного яйца. И наоборот, имплантация считается неудачной, если отсутствуют ультразвуковые признаки плодного яйца. Нарушение имплантации может произойти на очень ранних стадиях прикрепления или миграции, в результате чего нет объективных доказательств беременности и анализ мочи или крови на беременность, определяемый по содержанию хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) отрицателен. Это может произойти и позже, после успешной миграции эмбриона через люминальную поверхность эндометрия, когда ХГЧ, вырабатываемый эмбрионом, может быть обнаружен в крови или моче, но процесс прерывается до формирования плодного яйца. Эта клиническая ситуация определяется как биохимическая беременность и в последние годы расценивается как

преимплантационные потери. Неудача имплантации относится к неспособности эмбриона достичь стадии, когда плодное яйцо визуализируется при ультразвуковом исследовании.

Повторные неудачи имплантации (ПНИ) остаются актуальной и нерешенной проблемой репродуктивной медицины, с широким разнообразием этиологии и механизмов, а также вариантами лечения. Отсутствует единое определение ПНИ, несмотря на множество мнений по данной теме, с использованием таких переменных как количество перенесенных эмбрионов и попыток ЭКО, качество эмбриона или возраст матери в различных комбинациях. Было предложено несколько определений ПНИ одно из которых характеризуется отсутствием наступления беременности после 3-х последовательных циклов ЭКО или ИКСИ или переноса криоконсервированных эмбрионов отличного или хорошего качества у женщин моложе 35 лет или 2-х у женщин 35 лет и старше [2,3,4].

Множественные неудачные попытки ЭКО, неразвивающиеся беременности, самопроизвольные аборты в анамнезе - всё это является сложным психоэмоциональным, финансовым и физическим испытанием для пациентов [5].

Оптимальные условия культивирования являются предпосылкой для улучшения этапов эмбрионального развития и отсутствие данных условий может способствовать ПНИ. Несмотря на все достижения в культивировании эмбрионов, в частности, в разработке различных сред, нельзя игнорировать разницу между естественной средой для развития эмбрионов и условиями *in vitro* [6]. 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, имплантационного потенциала.

Добавление в среду гранулоцитарно – макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), который экспрессируется в

различных отделах репродуктивной системы женщины, 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.

Оценка качества эмбрионов имеет решающее значение при селективном выборе эмбриона с максимальным потенциалом развития для переноса и криоконсервации оставшихся [7, 8]. Поскольку визуальная оценка качества эмбрионов с использованием морфологических критериев является субъективной и требует значительного опыта эмбриолога, разрабатываются новые методы оценки качества и жизнеспособности эмбрионов. В последнее десятилетие одним из мощных инструментов повышения эффективности методов ВРТ является преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ). Но данный метод имеет ряд ограничений, основным из которых является возможное негативное воздействие на эмбрион при проведении процедуры биопсии трофэктодермы [9, 10, 11].

Разрабатываются различные методы тестирования культуральных сред развивающихся эмбрионов с целью получения необходимой информации относительно их жизнеспособности. Метаболический анализ культуральной среды может предоставить ценную информацию о развитии эмбрионов и их потенциале к имплантации. Существуют различные методы, которые включают измерение потребления кислорода, тестирование растворимого лейкоцитарного антигена человека (HLA-G) в отработанных средах культивирования (предполагают, что повышение секреции HLA-G ассоциируется с более высокими темпами дробления) [12,13], пирувата и глюкозы эмбрионом в культуральной среде [14]. Анализ биосинтеза аминокислот, который коррелирует с развитием бластоцисты, так же может быть измерен как показатель жизнеспособности эмбрионов [15].

В свою очередь, изучение содержания компонентов культуральных сред, как стандартной, так и обогащенной GM-CSF, может позволить выявить связь данных параметров с качеством эмбрионов, а изучение уровня метаболитов в средах культивирования на 3 и 5 сутки развития может стать обоснованием для внедрения современной неинвазивной методики селекции эмбрионов с наивысшими имплантационными характеристиками.

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.

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).

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. академика 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.

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.

ГЛАВА I. Обзор литературы

1.1. Бесплодие — актуальная проблема современности.

Согласно определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), бесплодие – это неспособность к зачатию более 12 месяцев регулярной половой жизни без контрацепции. Первичное бесплодие - состояние, при котором у женщины не было ни одной беременности, несмотря на регулярную половую жизнь в течение года без применения контрацептивных средств. Вторичное бесплодие - состояние, при котором у женщины в прошлом были беременности, однако в течение года регулярной половой жизни без контрацепции зачатие не происходит [16].

Частота бесплодия у супружеских пар детородного возраста колеблется от 10 до 20% и имеет тенденцию к росту. Только в нашей стране зарегистрировано более 5 миллионов бесплодных супружеских пар, нуждающихся в применении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [17].

Использование ВРТ позволило добиться значительных успехов за последние 30 лет, однако, несмотря на достижения в этой области, частота наступления беременности с последующими родами остается недостаточно высокой. Одним из методов повышения показателей ВРТ является перенос одновременно нескольких эмбрионов в полость матки, однако это сопряжено с высокой вероятностью развития многоплодной беременности и связанными с этим рисками для матери и ребенка [18, 19]. Преждевременные роды при многоплодной беременности - одна из причин высокой перинатальной заболеваемости и смертности, показатели которых в 3-4 раза выше, чем при одноплодной беременности и увеличиваются прямо пропорционально количеству плодов [20, 21].

В связи с этим в последнее время в большинстве стран мира отмечается четкая тенденция к снижению количества переносимых эмбрионов в полость матки пациенток в программах ВРТ. При этом селективный перенос эмбриона

является эффективным и коротким путем, приводящим к снижению частоты многоплодной беременности и, как следствие, снижению рисков, связанных с вынашиванием многоплодной беременности и последующими родами.

Повышение эффективности лечения в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) происходит благодаря индивидуальному подходу к каждой пациентке, который заключается в выборе протокола стимуляции функции яичников с целью получения при трансвагинальной пункции оптимального количества зрелых ооцитов, метода оплодотворения ооцитов и режима культивирования эмбрионов. На эффективность ВРТ оказывают свое влияние такие факторы, как возраст пациентки, состояние ее овариального резерва, причина бесплодия, сопутствующие гинекологические и соматические заболевания [22, 23].

Для успешной имплантации эмбриона требуется рецептивный эндометрий, эмбрион на стадии развития бластоцисты, а также синхронизированный диалог между материнскими и эмбриональными тканями, который регулируется эндокринными, паракринными и аутокринными взаимодействиями [24]. Эндометрий претерпевает ряд сложных пролиферативных и секреторных изменений в каждом менструальном цикле и демонстрирует лишь короткий период восприимчивости, известный как «окно имплантации» [25]. Эндометрий становится восприимчивым к имплантации бластоцисты через 6 дней после овуляции и продолжает оставаться восприимчивым в течение последующих 4 дней [26].

Процесс имплантации включает в себя три основных этапа. Первый этап - это аппозиция, основным признаком которой является появление пиноподий (небольшие бугорки на поверхности эпителия матки). Затем следует стадия адгезии (прикрепление), которая является началом соединения между плавающей бластоцистой и рецептивным эндометрием. Адгезия поддерживается местным воздействием факторов роста и гормонов, в результате происходят изменения в люминальном эпителии эндометрия, которые участвуют в

соединении с бластоцистой [27]. Первые признаки реакции прикрепления появляются на 20-21 день менструального цикла и совпадают с локальным увеличением проницаемости стромальных сосудов в месте прикрепления бластоцисты. После адгезии эмбрион проникает через люминальный эпителий в строму, чтобы установить связь с материнской сосудистой сетью – это стадия инвазии. В ответ на инвазию стромальные клетки эндометрия и внеклеточный матрикс эндометрия подвергаются децидуализации, которая необходима для развития беременности. После имплантации эндометрий продолжает расти и претерпевать дальнейшие морфологические и молекулярные изменения, чтобы обеспечить достаточную поддержку для растущего эмбриона [28].

Помимо взаимодействия эмбриональной ткани с эндометрием, на процесс имплантации оказывают значительную роль и другие факторы, такие как стероидные гормоны, факторы роста и материнские цитокины [29]. Стероидные гормоны эстроген, прогестерон и простагландин играют важную роль в регуляции процесса имплантации [30, 31]. Цитокины - это низкомолекулярные регуляторные белки или гликопротеины, которые секретируются иммунными (макрофаги, моноциты, В-лимфоциты, Т-лимфоциты, клетки-киллеры и т.д.) и другими клетками (эпителиальные клетки, эндотелиоциты, фибробласты и т.д.), опосредуют биологическую активность и влияют на взаимодействие между матерью и эмбрионом. Снижение экспрессии цитокинов приводит к неудачам имплантации и формированию аномальной плаценты [32]. Факторы роста стимулируют пролиферацию и дифференцировку клеток.

С клинической точки зрения, неудача имплантации может произойти на очень ранней стадии адгезии, без детектируемого образования ХГЧ и, следовательно, без объективных доказательств беременности. Или на более поздней стадии, после начала выработки ХГЧ имплантировавшимся эмбрионом, однако без образования плодного яйца, видимого на УЗИ, что расценивается как биохимическая беременность.

Более 30% женщин, проходящих лечение с помощью ВРТ, составляют пациентки с повторными неудачами имплантации (ПНИ), которые могут быть связаны с качеством эмбриона, сниженной рецептивностью эндометрия и несостоятельностью сигнальных процессов или молекулярных коммуникаций между эмбрионом и эндометрием [33,34].

Семейные пары, сталкивающиеся с бесплодием, часто подвергаются длительным, трудоемким схемам лечения, живя между надеждой, страхом и разочарованием. Многократные неудачные попытки ЭКО, самопроизвольные аборт, неразвивающиеся беременности в анамнезе - всё это является сложным психоэмоциональным, финансовым и физическим испытанием для пациентов [5].

Принимая во внимание вышесказанное, необходимо отметить комплексность проблемы бесплодия, для успешного решения которой требуется тесное междисциплинарное взаимодействие между пациентом, лечащим врачом, эмбриологом и рядом других специалистов (молекулярных и клинических генетиков, иммунологов, биохимиков, гематологов, акушеров).

1.2 Повторные неудачи имплантации.

Для определения ПНИ использовались многие переменные, такие как количество перенесенных эмбрионов, количество попыток ЭКО, качество эмбриона или возраст матери [35]. Используя эти переменные в различных комбинациях, было предложено несколько определений ПНИ но, к сожалению, общепризнанного определения не существует.

В 2005 г. Европейское общество репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) дало определение ПНИ как невозможность достижения клинической беременности после ≥ 3 неудачных переносов эмбрионов отличного/хорошего качества или после суммарного переноса ≥ 10 эмбрионов при многократных переносах [3].

В 2014 Coughlan C. et al. определили ПНИ как неудачу в достижении беременности после переноса не менее четырех эмбрионов хорошего качества в течение минимум трех циклов у женщин в возрасте до 40 лет [36].

В соответствии с международным глоссарием, принятым в 2019 г. повторные неудачные попытки переноса эмбрионов («свежих» или размороженных): как диагноз и обоснование к изменению программы ВРТ устанавливается в случае 3 безуспешных переносов у женщин моложе 35 лет и 2 — у женщин 35 лет и старше [4].

Несмотря на интенсивные исследовательские усилия научного сообщества и достигнутые большие успехи, точный процесс имплантации до сих пор считается "черным ящиком".

На успех или неудачу имплантации влияют два основных фактора: материнский и эмбриональный. Материнский фактор включает эндометриальные и системные факторы, такие как иммунологические, тромбофилические, метаболические, анатомические и инфекционные, а также мультифакторные, включая эндометриоз и гидросальпингс, которые, в конечном итоге, могут нарушить или полностью предотвратить успешную имплантацию. Эмбриональный фактор включает в себя уплотнение зоны пеллюцида, неадекватные условия культивирования, субоптимальное развитие эмбриона, генетические аномалии, неправильную технику переноса эмбриона, нарушение развития эмбриона в утробе матери, мужской фактор и т.д. [37, 38, 39].

Маточный фактор может быть оценен с помощью различных методов, таких как гистероскопия, 3D-сонография и гистеросальпингография. Гистероскопия является одним из наиболее широко используемых методов исследования у женщин с ПНИ, которая считается золотым стандартом для диагностики и лечения внутриматочной патологии, которая может не визуализироваться при трансвагинальном УЗИ [40]. При гистероскопии у женщин с ПНИ частота выявления патологии колеблется от 14 до 51%, наиболее часто диагностируются: полипы, внутриматочные синехии, подслизистые миомы, аденомиоз [41, 42].

Внутриматочная перегородка и синдром Ашермана представляют собой два состояния, которые являются установленными факторами риска привычного спонтанного выкидыша. Частота имплантации становится выше после удаления спаек, гидросальпингса или перегородки [43]. Однако недавнее исследование показало более низкую частоту выявления внутриматочных синехий и перегородки матки у пациентов с ПНИ по сравнению с пациентами с привычным выкидышем [44].

Последние данные свидетельствуют о том, что при внешне нормальном эндометрии ПНИ могут быть связаны с молекулярными и функциональными изменениями в матке, такими как аномальная эндометриальная микробиота, наличие хронического вялотекущего эндометрита, плохая синхронизация между бластоцистой и эндометрием и/или чрезмерная перистальтика матки, которую сложно диагностировать с помощью трансвагинального УЗИ. Измененная микробиота эндометрия, выявленная с помощью молекулярных методов, может быть связана с худшей имплантацией эмбриона даже при внешне нормальном эндометрии [45].

Одной из причин возникновения ПНИ является нарушение рецептивности эндометрия. Прогестерон и эстроген считаются основными гормональными модуляторами развития эндометрия, поддерживающими имплантацию эмбриона. Так, под действием прогестерона эндометрий претерпевает определенные изменения, которые приводят к формированию пиноподий. Эти структуры были предложены для определения времени, когда эндометрий является восприимчивым, так называемое «окно имплантации». В ранее проведенном ретроспективном, наблюдательном, одноцентровом исследовании авторы проанализировали 6673 последовательных цикла, выполненных с 2007 по 2012 год, было произведено разделение на три группы: I группа включала пациентов, которые никогда ранее не проходили ЭКО, в группу II вошли женщины, у которых была одна предыдущая неудача ЭКО/ПЭ, в III гр. - с ≥ 2 предыдущими неудачными циклами ЭКО/ПЭ. У всех женщин определяли

уровень прогестерона в день введения ХГЧ, на основании полученных результатов авторы пришли к выводу, что существует связь ПНИ с повышенным уровнем прогестерона в сыворотке > 6 нмоль/л в день введения ХГЧ. Это означает, что у некоторых пациенток есть предрасположенность к повышению уровня прогестерона в конце стимуляции функции яичников, что, в свою очередь приводит к множественным неудачам имплантации в связи со смещением «окна имплантации» на 1-2 дня раньше [46].

В период имплантации так же важную роль играет материнский иммунитет и толерантность к имплантирующемуся эмбриону. Децидуализированные стромальные клетки эндометрия, важные для имплантации и поддержания беременности, способны регулировать инвазию трофобласта и подавлять местный материнский иммунный ответ. Как местные, так и системные иммунные эффекторы, цитокины, хемокины и различные иммунные факторы активно способствуют имплантации эмбриона и поддержанию беременности [47].

Liang P. Y. et al. провели исследование случай-контроль и показали, что концентрация таких провоспалительных факторов как IFN-, IL-1 β , IL-6 и IL-4 увеличивается, а противовоспалительных факторов (TGF- β 1) снижается в периферической крови пациенток с ПНИ по сравнению с контрольной, где после проведения программы ЭКО наступила беременность [48].

Клинические исследования, которые предполагают, что применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) может повысить результативность ВРТ, проводились, в основном, при наличии «тонкого» эндометрия в период окна имплантации [49,50].

В 2020 году было проведено проспективное рандомизированное контролируемое исследование с участием 157 пациенток с диагнозом ПНИ без видимой патологии эндометрия. Группа женщин была сформирована на основе критериев ПНИ, определенных Coughlan C. et al. в 2014 году, как “неспособность достичь клинической беременности после переноса не менее четырех эмбрионов

хорошего качества в минимум трех циклах женщине в возрасте до 40 лет [36]. Женщинам проводили внутриматочное введение G-CSF однократно перед инъекцией овуляторной дозы ХГЧ. Полученные данные не выявили статистически значимой разницы между группой G-CSF и контрольной в отношении толщины эндометрия, частоты клинической беременности, самопроизвольного прерывания беременности до 12 нед и живорождения [51].

Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А) позволяет переносить генетически нормальные эмбрионы [52]. У пациенток с ПНИ наблюдается повышенное количество аномалий, включая транслокации, мозаицизм, инверсии и делеции, которые можно устранить с помощью ПГТ-А [53]. Анеуплоидии, вероятно, вносят основной вклад в неудачи имплантации, однако доля эуплоидных эмбрионов, которые не приживаются, составляет приблизительно 30% [8], в связи с чем можно предположить, что восприимчивость эндометрия играет центральную роль в стойком бесплодии этих пар.

В 2020 году опубликовано ретроспективное многоцентровое когортное исследование, где оценивали результаты ВРТ у пар с ПНИ в период с 2013 по 2018 год. В исследование были включены 2598 женщин с бесплодием в возрасте от 18 до 45 лет. Пациенты с аномальным кариотипом, таким как транслокация или носительство инверсии, а также с тромбофилией, врожденной или приобретенной, были исключены. В данном исследовании пациенток с ПНИ разделили на 2 группы в зависимости от количества ранее перенесенных эмбрионов: группа 1 - «умеренная форма» ПНИ, составили женщины у которых ранее был произведен перенос не менее трех эмбрионов, группа 2 «тяжелая форма» ПНИ, которым ранее был произведен перенос не менее пяти эмбрионов, без достижения имплантации. У 2110 пациенток, относящихся к группе 1 «умеренная форма» ПНИ, отмечена более высокая частота имплантации после переноса эуплоидного эмбриона, по сравнению с теми, у кого ПГТ-А не проводился. В группе с «тяжелой формой» ПНИ, в которую вошли 488

пациентки, не было выявлено статистически значимых улучшений. Следовательно проведение ПГТ-А может быть полезным для пациенток с «умеренной формой» ПНИ, но не для «тяжелых форм» ПНИ [54].

ПНИ остается одной из самых загадочных областей ВРТ, хотя было предпринято много усилий для изучения возможных причин, как правило рутинные обследования на бесплодие не позволяют выявить этиологические факторы ПНИ. До сих пор не достигнут четкий международный консенсус по определению ПНИ и не существует (международных) национальных рекомендаций ни по диагностике, ни по терапевтическому подходу.

1.3 История развития культуральных сред.

В 1951 г. доктор Chang M.C. (США) начал разработку питательных сред и условий культивирования гамет и эмбрионов *in vitro*. В 1954 году Петров Г.Н. (СССР) опубликовал работу, где подробно описывал все стадии дробления эмбриона. Однако, лишь в 1959 году Chang M.C. удалось добиться оплодотворения и развития эмбриона млекопитающего. Данное открытие показало, что ооциты и сперматозоиды, объединенные *in vitro*, способны образовать жизнеспособный эмбрион, который в дальнейшем развивается после переноса его в полость матки.

С тех пор возник активный научный интерес к проблеме экстракорпорального оплодотворения человеческого ооцита и дальнейшего развития эмбриона с целью рождения здорового ребенка.

Первая беременность после оплодотворения ооцита женщины наступила в 1973 г. в результате работы группы Университета Монаш, однако, она длилась всего несколько дней и являлась биохимической. В 1977 году, после многочисленных неудачных попыток существенного успеха добилась группа из Великобритании, в результате их работы 25 июля 1978 года родился первый ребенок «из пробирки» - девочка Луиза Браун [55].

В 1985 году в СССР сотрудниками Центра охраны здоровья матери и ребенка (г. Москва) под руководством профессора Леонова Б.В. (в настоящее время ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России) удалось получить первую беременность после переноса эмбриона, в результате чего в феврале 1986 года родилась девочка.

Создание сред для культивирования эмбрионов исторически началось с попыток имитировать состав жидкости маточной трубы [56]. Новые технологии разрабатывались и апробировались на мелких млекопитающих, таких как мышь или крыса, а затем переходили на более крупных животных (корова или свинья) и только потом применялись на эмбрионах человека. Так, в работе Brinster R. опубликованной еще в 1960 году, для оптимизации основных показателей культуральной среды, таких как концентрация солей, осмолярность, pH, содержание энергетических субстратов и т.д., было необходимо около 1000 эмбрионов мышей [57].

Следует отметить, что при культивировании человеческих гамет и эмбрионов было мало стандартизации и много экспериментирования. Изначально состав культуральной среды варьировал от соляных растворов очень простого состава, таких как растворы Эрла или Тиродэ, до сложных сред, используемых при культивировании тканей. Все среды обогащались за счет различных белковых добавок, чаще всего в виде фетальной или материнской сывороток. Даже сегодня состав коммерчески доступных сред варьирует от сравнительно простых, включающих 8-10 солей и сахаров, до содержащих около 80 компонентов, таких как аминокислоты, липиды, витамины, необходимые в следовых количествах ионы, а также различные биоактивные молекулы [58-60].

Состав культуральной среды требует одновременного учета концентраций всех ее компонентов, так как активность каждого отдельного компонента может зависеть от концентрации других. До тех пор, пока концентрации компонентов находятся в пределах "диапазона переносимости", эмбрион сам способен адаптироваться и выбрать то, что ему необходимо для развития [61]. Эта философия привела к разработке сред, содержащих все необходимые

компоненты и не требующих смены по мере развития эмбриона. Один состав среды используется на всех стадиях культивирования эмбрионов *in vitro* от оплодотворения до стадии бластоцисты. При культивировании до стадии бластоцисты могут быть применены четыре протокола:

- протокол со сменой состава среды, в котором используются 2 среды разного состава со сменой её через 3 дня;
- протокол со сменой состава среды, при котором среда меняется на свежую каждый день;
- монокультура, без смены среды на протяжении всех 5 дней;
- прерывистая, когда эмбрион культивируется в среде одного состава, но через три дня она меняется на свежую.

Рост эмбрионов, полученных *in vitro*, замедлен по сравнению с эмбрионами, развивающимися *in vivo*, что указывает на то, что проводимые процедуры порождают ситуации клеточного и метаболического стресса, а полученный путем ЭКО эмбрион «вынужден» тратить энергию на приспособление к чуждому для него окружению [62]. Качество культуральной среды играет особенно важную роль в успешном взаимодействии гамет *in vitro* и последующем развитии эмбриона. Соответственно, рецептура культуральной среды сложна, так как ее компоненты и их концентрации подбираются так, чтобы минимизировать стрессовое воздействие на культивируемый эмбрион. В последние годы достигнут значительный прогресс в развитии культуральных сред, результатом которого является более длительное культивирование эмбрионов, а именно до стадии бластоцисты, благодаря чему появляется больше возможностей для селективного выбора эмбриона лучшего качества с максимальным потенциалом к имплантации и, следовательно, снижения частоты развития многоплодных беременностей без потери эффективности ЭКО.

Однако, несмотря на все достижения, современная система культивирования эмбрионов человека все еще субоптимальна, и не более 40-60% эмбрионов развиваются до стадии бластоцисты. Качество сред для культивирования и их состав могут существенно улучшить шансы эмбрионов

для полноценного развития. Так, одним из подходов является добавление в культуральную среду цитокинов и факторов роста, присутствующих в репродуктивном тракте, что может способствовать нормализации процесса роста и развития эмбриона. В частности, добавление в культуру гранулоцитарно – макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) ускоряет развитие эмбриона, повышает процентную долю ранних дроблений, которые приводят к появлению бластоцисты, повышает их внутреннюю клеточную массу и снижает активность процессов апоптоза [63-66].

По результатам многочисленных исследований, за последнее десятилетия отмечается некоторое повышение результативности программ ВРТ, основными причинами которого является активное внедрение ПГТ, оценка морфологического качества эмбрионов методом *time lapse* (непрерывная фотосъемка развития эмбриона до переноса в полость матки), а также усовершенствование состава сред и протоколов последовательного культивирования эмбрионов [9, 67-68].

1.4 Гранулоцитарно – макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

Цитокины и хемокины играют значительную роль в иммунологической адаптации и процессе перестройки тканей, важном для возникновения и развития беременности [66, 69-73]. В последние годы ведется множество исследований по клиническому применению CSF в репродуктивной медицине [74-80].

GM-CSF — полипептидный цитокин, состоящий из 127 аминокислот с двумя участками гликозилирования. Кристаллографический анализ GM-CSF выявил структуру в форме бочонка, состоящую из четырех коротких альфа-спиралей [81].

GM-CSF оказывает свое действие на клетки-мишени посредством взаимодействия с высокоаффинным, гетеродимерным рецепторным

комплексом, включающим α - и β -субъединицы, принадлежащие рецепторам суперсемейства гематопозтинов. Указанная α -субъединица (GM-CSFR α или CD116) входит в состав только GM-CSFR и связывает лиганды с низкой аффинностью. Субъединица β - (GM-CSFR β или CD131) так же входит в состав рецепторов интерлейкина-5 (ИЛ-5) и интерлейкина-3 (ИЛ-3). В результате рекрутинга в рецепторный комплекс GM-CSFR она трансформирует низкоаффинное взаимодействие в высокоаффинное, что в конечном итоге приводит к изменениям экспрессии генов клеткой-мишенью за счет запуска каскада внутриклеточных реакций, опосредованных Янус-киназой (JAK/STAT), передатчиком сигнала и активатором транскрипции (MAPK) и фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3-K) [82]. Данные рецепторы обнаруживаются на мембране эмбриональных клеток уже на стадии 2-х бластомеров [83].

GM-CSF синтезируется не только клетками иммунной системы, такими, как Т-лимфоциты, макрофаги, гранулоциты, моноциты, но и эпителиальными, эндотелиальными клетками органов репродуктивной системы: гранулезными клетками фолликулов [84], эпителиальными клетками, выстилающими фаллопиевы трубы [85] и эндометрия, НК-клетками эндометрия [86], клетками стромальной и децидуальной ткани, а также эпителиальными клетками трофобласта.

GM-CSF продуцируется на протяжении всего менструального цикла, его синтез главным образом регулируется стероидными гормонами яичников и регуляторами, поступающими из семенной жидкости, а также ооцитом и формирующейся зиготой. Эпителиальные клетки, выстилающие фаллопиевы трубы, циклически выделяют GM-CSF, уровень которого достигает пика в поздней стадии пролиферации и сохраняется до середины секреторной фазы. Значительное повышение продукции GM-CSF наблюдается во время секреторной фазы менструального цикла и совпадает со временем имплантации эмбриона. В эпителиальных клетках эндометрия его синтез остается высоким в течение нескольких дней после зачатия, затем под ингибирующим влиянием

прогестерона постепенно снижается. Далее его синтез продолжается в течение всего периода беременности в материнской части плаценты [87].

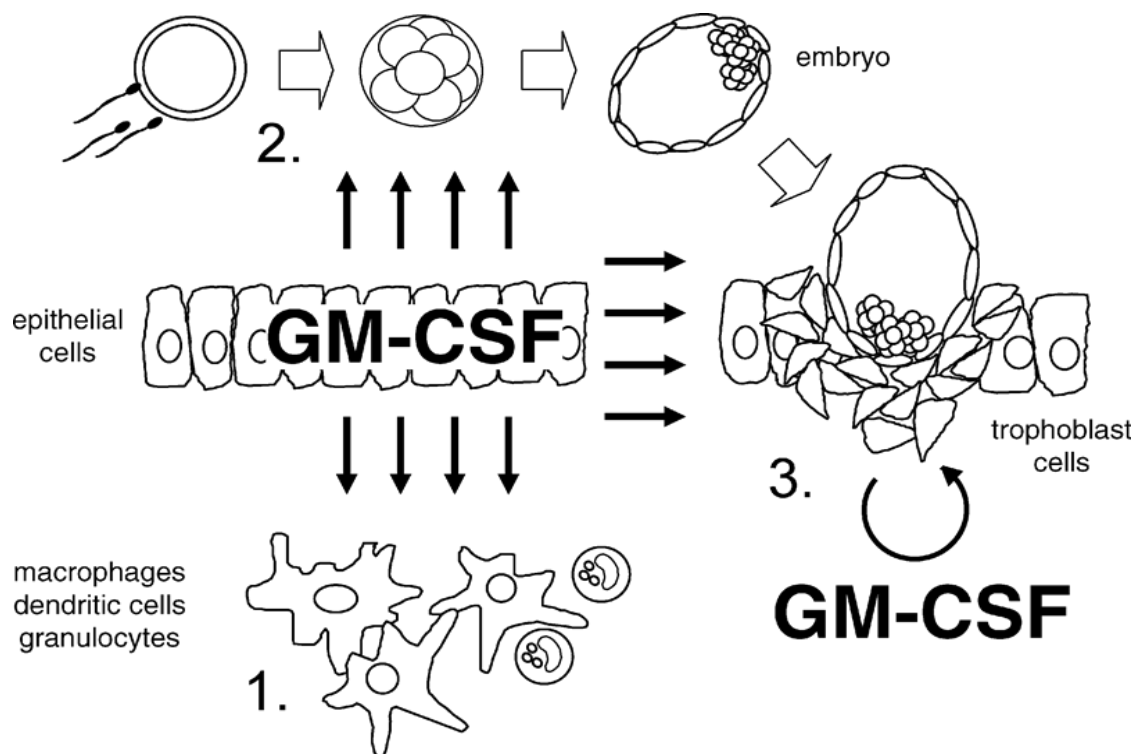


Рисунок 1. GM-CSF, произведенный эпителиальными клетками матки и плацентарными клетками, участвует в процессе репродукции, регулируя в матке содержание лейкоцитов, участвующих в иммунной толерантности матери и децидуальном ремодулировании (1), развитии эмбриона на этапе предимплантации (2) и дифференциации клеток трофобласта в плацентарном морфогенезе (3).

GM-CSF может выступать как ключевой регулятор иммунного ответа в эндометрии, оказывающий влияние на дендрциты и способствующий их накоплению, повышению статуса активации и способности предоставлять антиген для Т-клеток [88]. Учитывая тот факт, что материнские дендрциты необходимы для экспансии популяции Т-клеток в эндометрии, которые ответственны за управление иммунной толерантностью эмбриона в период имплантации [72], экзогенный GM-CSF вполне мог бы способствовать полноценности процессов имплантации и развития плаценты.

В одной из работ Perricone R. и соавторы проводили измерение уровня сывороточного GM-CSF при беременности. Было отмечено его повышение при нормально протекающей беременности и снижение у женщин с привычным невынашиванием беременности, что свидетельствует о смещении баланса иммунологической реакции с Т-хелперов 2 (Th2) и Т-регуляторных клеток (Treg) в сторону Т-хелперов 1 (Th1) и Т-хелперов 17 (Th17) [89].

Так, развитие бластоцисты у мышей с нуль-мутацией по GM-CSF, неполноценно: проявляются такие признаки, как изменения в структуре плаценты, уменьшенные размеры плода, синдром потери плода на поздних сроках беременности, высокая смертность среди родившихся особей [90,91].

Ziebe S. с соавторами провели рандомизированное, многоцентровое, плацебо-контролируемое, двойное слепое проспективное исследование, посвящённое культивированию эмбрионов в среде, содержащей в своем составе GM-CSF в программах ВРТ. В исследование были включены 1332 пациентки. Проводилась стандартная программа ЭКО или программа ИКСИ. Культивирование эмбрионов осуществляли в классической среде без добавления GM-CSF (контрольная группа) и с добавлением GM-CSF (исследуемая группа). При этом концентрация сывороточного альбумина человека (ЧСА), добавляемая в среды, была различна: в группе из 620 пациенток она составила 2 мг/мл, в другой группе из 529 пациенток – 5 мг/мл. Оценка развития эмбрионов проводилась в фиксированные моменты времени: 1 ч после оплодотворения, далее через 20, 27, 44, 68 часов, перенос осуществлялся на 3 сутки развития. Сравнительный анализ эффективности показал, что культивирование эмбрионов в среде с добавлением GM-CSF привело к увеличению частоты имплантации по сравнению с контролем, которая составила 23,0% против 20,0%, соответственно. Затем в обеих средах была изменена концентрация ЧСА с 2 мг/мл до 5 мг/мл, что привело к увеличению частоты имплантации в контрольной группе с 20,0% до 22,4 %, при этом не было отмечено разницы в частоте имплантации с группой исследования, в которой она составила 23,9% и 23,0%. Не было различий в количестве эмбрионов, развившихся до 3-х суток - 42,0% (GM-CSF) против

43,9% (контрольной), а также эмбрионов высокого качества - 15,6% (GM-CSF) против 16,8% (контрольной). Вместе с тем, частота прогрессирующей клинической беременности (12 нед. гестации) была достоверно выше в исследуемой группе по сравнению с контрольной и составила 23,0 % против 18,7 %, при этом с низкой концентрацией ЧСА (2 мг/мл) для GM-CSF группы составила 23,5% против 16,7% в контрольной группе, а с высокой концентрацией ЧСА (5 мг/мл) 22,4% (GM-CSF) и 21,1% (контроль) соответственно. Сравнительный анализ развития эмбрионов исследуемой группы показал, что оплодотворение, культивирование и перенос эмбрионов у пациенток с предыдущими неудачными попытками ВРТ в анамнезе увеличивает частоту наступления клинической беременности по сравнению с контролем (24,5% против 17,0%, соответственно). Данное исследование продемонстрировало эффективность культивирования эмбрионов до 3-х суток в среде, содержащей в своем составе GM-CSF [92]. Одновременно было показано, что присутствие в среде 2 мг/мл GM-CSF не влияет на уровень мозаицизма и анеуплоидии [93].

В 2020 году проведен исследовательский вторичный анализ подгрупп пациентов, участвующих в многоцентровом проспективном рандомизированном исследовании Ziebe S. [92]. Отмечено, что применение GM-CSF приводит к снижению благоприятных исходов в группе с низким качеством эмбрионов, в то время как в группе с высоким качеством эмбрионов GM-CSF оказывал благоприятное воздействие. Полученные данные позволяют предположить, что улучшение показателей имплантации и последующие живорождение, выявленное Ziebe S. и др. является, главным образом, результатом воздействия GM-CSF на морфологически нормальные, а не на морфологические аномальные эмбрионы.

Важно отметить, что этот анализ снимает любые опасения по поводу того, что цитокины, способствующие развитию, могут привести к развитию эмбрионов, которые в противном случае были бы обречены на гибель. Было высказано предположение, что GM-CSF может спасти скомпрометированные по развитию эмбрионы, потенциально приводя к имплантации и к дальнейшему

развитию эмбрионов, которые бы не выжили в отсутствие цитокина [94]. Данный исследовательский анализ не подтверждает интерпретацию того, что GM-CSF действует для спасения неполноценных или поврежденных эмбрионов, что может быть связано с нарушением развития плода и/или плохим неонатальным исходом [95].

В 2016 году Zhou W. с соавторами провели ретроспективное когортное исследование, в которое было включено 212 пациенток старше 35 лет. Проводилась стимуляция яичников в программе ЭКО или в программе ИКСИ. Далее проводили разделение на 2 группы: группа А из 117 женщин, эмбрионы которых культивировались в среде, содержащей низкую концентрацию GM-CSF (0,2 нг/мл) и группа В из 95 женщин, которым культивировали эмбрионы в классической среде. Оценка эмбрионов проводилась по морфологическим критериям двумя профессиональными клиническими эмбриологами в фиксированные моменты времени: 1 ч после оплодотворения, далее через 17, 44, 68, 116 и 140. Существенных различий в частоте дробления (96,2 против 96,5%) и формирования бластоцист (53,2 против 54,0%) между GM-CSF и контрольной группами обнаружено не было. Переносы в цикле стимуляции были проведены у 171 пациентов, из них у 67 пациентов эмбрионы культивировались в классической среде и у 104 - с добавлением GM-CSF. Не было существенной разницы в количестве перенесенных эмбрионов ($2,3 \pm 0,8$ против $2,4 \pm 0,7$), частоте имплантации (26,6% против 23,4%) и прогрессирующих клинических беременностей (37,3% против 38,5%) между контрольной и GM-CSF группой [96].

В ранее опубликованном сравнительном анализе Tevkin S., были проанализированы данные 425 циклов пациенток в возрасте 26-46 лет, проходивших лечение в рамках программ ЭКО или ИКСИ. Женщины в зависимости от возраста были разделены на две группы: 1-я - ≤ 35 лет и 2-я - ≥ 35 лет. Число циклов в исследуемой группе (GM-CSF - 2нг/мл) составило 71, в контрольной - 354. Эффективность культивирования эмбрионов в среде с добавлением GM-CSF у женщин 1-й исследуемой и контрольной групп по ЧНБ

и ЧИ отличались незначительно и составили 33,3% (5/16) и 14,7% (5/34) против 35,0% (47/143) и 17,2% (53/308) соответственно. Анализ эффективности культивирования эмбрионов в среде GM-CSF у пациенток 2-й (старшей) возрастной группы показал, что ЧНБ и ЧИ в группе GM-CSF были выше и составили 32,7% (18/55) и 17,2% (22/128) против 25,5% (56/220) и 10,6% (62/601) в группе контроля. Таким образом, культивирование эмбрионов пациенток старше 35 лет в среде с добавлением GM-CSF увеличивало ЧНБ по сравнению с контролем и составило 32,7% против 25,5% [97].

В 2020 году Chu D. с соавторами провели ретроспективное исследование о влиянии добавления низкой концентрации GM-CSF (0,6 нг/мл) на качество эмбрионов и исходы беременности у пациенток с циклами переноса нативных эмбрионов. В исследовании были проанализированы данные 719 циклов стимуляции пациенток, проходивших лечение методом ЭКО или ИКСИ. Число циклов в исследуемой группе составило 399, в контрольной – 320. Сравнительный анализ эффективности показал, что культивирование эмбрионов в среде с добавлением GM-CSF у пациенток моложе 34 лет привело к статистически значимому увеличению количества пригодных для переноса эмбрионов по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Однако не было статистически значимых различий в скорости дробления и формирования бластоцист между контрольной группой и группой GM-CSF. Для пациентов в возрасте от 35 до 37 лет добавление GM-CSF так же значительно увеличивало количество пригодных для переноса эмбрионов ($p < 0,05$). У пациентов старше 38 лет в группе с добавлением GM-CSF отмечены более высокая скорость дробления ($p < 0,05$) и бластуляции ($p < 0,05$). Между группами контроля и GM-CSF не было значительных различий в количестве перенесенных эмбрионов, частоте биохимической беременности ($p=0,945$), частоте имплантации ($p=0,259$), частоте наступления клинической беременности ($p=0,339$) и частоте ранней потери беременности ($p=0,536$) [98].

Можно предположить, что разные концентрации GM-CSF могут

приводить к различным результатам и относительно более низкая концентрация GM-CSF (0,6 нг/мл), по-видимому, эффективна только для пациенток старшего репродуктивного возраста.

Исследование Rose R.D. 2020 было менее масштабным, одноцентровым. В общей сложности 100 женщин были рандомизированы. У 50 женщин в группе сравнения все эмбрионы культивировались в культуральной среде с добавлением GM-CSF с момента оплодотворения до переноса эмбрионов на 5-е сутки. Концентрация GM-CSF в культуральной среде составляла 2 нг/мл, на 3-й день культивирования после подсчета результатов, промывки, осуществлялся перенос в свежую культуральную среду с той же концентрацией GM-CSF. У 50 женщин контрольной группы культуральная среда не содержала GM-CSF, и аналогичным образом эмбрионы на 3-й день оценивались, промывались, а затем переносились в свежую последовательную культуральную среду. Не было обнаружено статистически значимых различий в количестве живорождений между контрольной группой и группой сравнения (17 (34%) против 11 (22%) соответственно). Культивирование в среде с добавлением GM-CSF в течение 5 дней привело к развитию бластоцист худшего качества по сравнению с контрольной средой. При этом скорость развития эмбрионов на 3-й день была выше в группе с GM-CSF, чем в стандартной группе (73,7% против 65,7%), но это различие не было статистически значимым ($P = 0,34$) [99].

Однако, учитывая совокупность данных, подтверждающих улучшение развития эмбрионов при использовании среды с GM-CSF [92, 96, 100], можно предположить, что *in vivo* до 3-го дня эмбрион находится в маточной трубе, где уровень GM-CSF повышен, затем на 4-5-й день развития эмбрион перемещается в полость матки. Возможно, на более поздних стадиях развития потребность эмбриона (морула и бластоциста) в GM-CSF меньше.

В исследовании Sjoblom C. было показано, что воздействие GM-CSF на преимплантационный эмбрион способно корректировать программу его

развития и приводить к последствиям, которые проявляются после имплантации и обеспечивают повышение выживаемости в перинатальном периоде. Взаимодействие с GM-CSF на раннем этапе развития частично определяет структурную организацию и функцию плаценты на более поздних сроках беременности, обеспечивая лучшую адаптацию плаценты в процессе ее морфогенеза, в значительной степени компенсируя функциональные нарушения, связанные с неоптимальным состоянием окружения эмбриона перед имплантацией.

Механизм, с помощью которого GM-CSF в преимплантационном периоде определяет структуру плаценты и рост плода не до конца ясен, но предположительно, определяется теми же молекулярными событиями, которые обеспечивают благоприятные эффекты GM-CSF на жизнеспособность бластоцисты. Таким образом, изменения метаболизма преимплантационного эмбриона могут объяснить конвергенцию эффектов ростовых факторов и питания на развитие бластоцисты [101].

1.5 Оценка качества эмбрионов по морфологическим критериям.

Для повышения вероятности успешной беременности определяющее значение имеет возможность выбора эмбриона с максимальным потенциалом развития. Это позволяет существенно сократить время до наступления беременности. Облегчая выбор эмбриона для переноса из числа оставшихся криоконсервированных с тем, чтобы наиболее жизнеспособные из них были использованы в первую очередь [7, 8].

С момента внедрения ЭКО в повседневную клиническую практику главным критерием, используемым эмбриологами для оценки стадии развития эмбриона и последующего отбора для переноса, является морфология эмбриона (по системе Gardner D.R., 1999). В многочисленных исследованиях было отмечено, что морфологическая характеристика и потенциал развития эмбриона являются

биомаркерами его жизнеспособности. Например, пронуклеарная морфология [102-104], отсутствие фрагментации [105-107], отсутствие многоядерных бластомеров [108] и их одинаковый размер [109, 110] являются наиболее информативными показателями жизнеспособности эмбриона. Несмотря на имеющиеся критерии оценки качества эмбрионов, они субъективны и недостаточно надежны в прогнозировании вероятности наступления беременности и её дальнейшего развития [111, 112]. Оценка эмбрионов, как правило, основана на морфологическом состоянии эмбрионов всего в несколько дискретных моментов времени, что ограничивает частоту наблюдений, тем самым скрывая то, что происходит в интервалах между наблюдениями. Кроме того, важно иметь в виду, что статус эмбриона (и, следовательно, его класс развития) может заметно измениться в течение всего нескольких часов, а исследование эмбриона под микроскопом дает лишь моментальные «снимки» событий, происходящих в течение чрезвычайно динамичного преимплантационного периода [113-115].

Эмбрионы классифицируются по морфологическим критериям в соответствии с «модифицированной» классификацией Gardner D., принятой Istanbul consensus workshop on embryo assessment (ESHRE, 2011) [116]. Данные критерии включают в себя оценку внутренней клеточной массы, трофэктодермального слоя, прозрачной оболочки и скорость развития бластоцисты.

Внутренняя клеточная масса:

- А (I класс) – хорошо различима, плотно упакованная с большим количеством клеток;
- В (II класс) – хорошо различима, но более свободная группировка среднего количества клеток;
- С (III класс) – трудно различима, содержит незначительное количество клеток.

Трофэктодермальный слой:

- А (I класс) – хорошо организована, достаточное количество клеток, формирующих плотный эпителий;
- В (II класс) – недостаточное количество неравномерно распределенных клеток, формирующих рыхлый эпителий клеток;
- С (III класс) – малое количество клеток.

Однако, практикующие врачи хорошо знают, что не всегда при переносе эмбриона «отличного» или «хорошего» морфологического качества происходит имплантация, при этом не исключено наличие у них анеуплоидного набора хромосом, и в то же время эмбрионы «удовлетворительного» качества могут успешно имплантироваться и приводить к дальнейшему рождению здорового ребенка.

В последнее десятилетие одним из мощных инструментов повышения эффективности методов ВРТ является преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ). Но данный метод имеет ряд ограничений, одним из важнейших аспектов которой является потенциальное негативное воздействие на эмбрион при проведении процедуры биопсии [9-11].

В ряде исследований оценивалась корреляция между морфологией эмбрионов и наличием у него хромосомных аномалий. Так, большинство дисморфизмов, таких как фрагментация, многоядерность, асимметрия и т.д., как правило, встречаются у одних и тех же эмбрионов и связаны с повышенным риском постмейотических нарушений, таких как мозаицизм, полиплоидия и гаплоидия. Было отмечено, что частота хромосомных аномалий увеличивается с 50% до 60% у нефрагментированных эмбрионов и до 70-90% у эмбрионов с фрагментацией >35%. Однако, фрагментация значительно коррелировала с мозаицизмом и другими постзиготными аномалиями, в то время как такой корреляции с анеуплоидиями отмечено не было [117, 118].

Новые методы, такие как time lapse, могут привести к лучшей оценке качества эмбрионов и помочь в выборе эмбрионов с самым высоким потенциалом к имплантации [119]. Было высказано предположение о том, что

покадровые наблюдения с использованием инкубатора со встроенным оптическим микроскопом могут минимизировать изменения в среде культивирования путем интеграции культуры, наблюдения и покадровой записи клеток в одну систему. Вследствие этого можно избежать удаления эмбрионов из инкубатора для периодического наблюдения, обеспечивая непрерывный мониторинг развития эмбрионов. Существуют данные, что покадровой мониторинг в эмбриоскопе не влияет на качество эмбрионов, при этом позволяя проводить морфологический и пространственный анализ развития эмбрионов [120]. Однако, культивирование эмбрионов в эмбриоскопе является более дорогостоящим, чем в стандартном инкубаторе.

На сегодняшний день отбор эуплоидных эмбрионов с использованием комплексного скрининга хромосом (CCS) является наиболее многообещающим подходом, в то время как метаболическая и протеомная оценка отработанных культуральных сред может иметь потенциал для неинвазивной оценки жизнеспособности эмбрионов [121].

Ведутся разработки различных методов тестирования культуральной среды развивающегося эмбриона с целью получения информации о его жизнеспособности.

Метаболический анализ культуральной среды может предоставить ценную информацию о развитии эмбрионов, а также их потенциале к имплантации. Существуют различные методы, которые включают измерение потребления кислорода, тестирование растворимого HLA-G (лейкоцитарный антиген человека) в отработанных средах культивирования, поскольку было предположено, что секреция HLA-G связана с более высокой вероятностью имплантации, пирувата и глюкозы эмбрионом в культуральной среде. Анализ биосинтеза аминокислот, который, по-видимому, коррелирует с развитием бластоцисты, так же может быть измерен как показатель жизнеспособности эмбрионов. Такие методы как колебательная, рамановская спектроскопия, ближняя инфракрасная оптическая спектрометрия были использованы для

анализа отработанных культуральных сред эмбрионов человека, измерения связей внутри функциональных групп молекул на определенных длинах волн. Результаты первоначальных исследований показывают, что спектральные профили, отражающие выраженность окислительного стресса, имеют хорошую корреляцию с исходом беременности [122].

1.6 Молекулярный состав культуральных сред эмбрионов человека

Неинвазивный анализ сред культивирования начал использоваться еще в конце 1980-х годов, когда микроаналитические методы стали достаточно чувствительными для применения к культуральным средам отдельных животных или человеческих эмбрионов [123].

Начальные исследования ограничивались анализом отдельных метаболитов, таких как пируват, глюкоза и лактат, на животных, таких, как мышь и крыса [1264], затем были расширены до отработанных культуральных сред человеческих эмбрионов [125, 126].

Метаболомика – это научное исследование уникальных химических "отпечатков пальцев", которые биологические клетки, ткани или органы оставляют после различных клеточных процессов [127].

В ВРТ термин "метаболомика" относится к определенным продуктам метаболизма, содержащихся в определенных биологических материалах или средах. Так, своевременная биопсия эндометрия или сбор эндометриальной жидкости и, в последующем, анализ метаболитов могут выявить изменения его рецептивности и другие патологические состояния, которые могут в последующем повлиять на репродуктивный процесс. Оценка качества ооцита и его способность к оплодотворению опосредуется, главным образом, метаболомным анализом фолликулярной жидкости, хотя анализ кумулюсных и гранулезных клеток так же может дать важную информацию о функциональности гамет. Для эмбрионов неинвазивный подход заключается в

проведении анализа отработанных сред культивирования с целью получения информации о способности эмбриона к имплантации [128, 129].

Метаболомный профиль, известный также как метаболом, отражает физиологию и функциональный фенотип ткани, клетки или эмбриона, причем любые изменения в функциональной активности клетки проявляются в этом конечном продукте жизнедеятельности клетки, что помогает отличать норму от патологического состояния [130]. В исследуемом биологическом материале/средах культивирования, определяются различные метаболиты, проявляющие клеточную активность и соответствующие им концентрации. Конечной целью этих исследований является понимание того, какие именно клеточные механизмы задействованы и при этом получить возможность "предвидеть" судьбу исследуемого эмбриона [131].

Анализ этих молекул является сложной задачей, поскольку они присутствуют только в ограниченном количестве в питательной среде, доступной для анализа и поэтому методы должны быть очень чувствительными. Объем капель питательной среды, окружающей эмбрион, колеблется от 15-40 МКЛ в единичных эмбриональных культурах до 400-500 МКЛ в групповых культурах. Однако, хотя групповое культивирование приводит к повышению содержания аналитов в отработанных сред, этот метод не позволяет обнаружить различия между отдельными эмбрионами. Таким образом, высокая чувствительность является обязательной характеристикой любого метода анализа отработанной среды культивирования эмбрионов [132].

В настоящее время оценка метаболического профиля осуществляется с помощью спектроскопических/спектрометрических и хроматографических методов, таких как спектроскопия протонного ядерного магнитного резонанса (¹H ЯМР) [133] и методов масс-спектрометрии (МС) [134], отдельно или в сочетании с LC, газовая хроматография, капиллярный электрофорез, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), ближняя

инфракрасная (NIR) оптическая спектроскопия или рамановская спектроскопия [135 - 137] (рисунок 2).

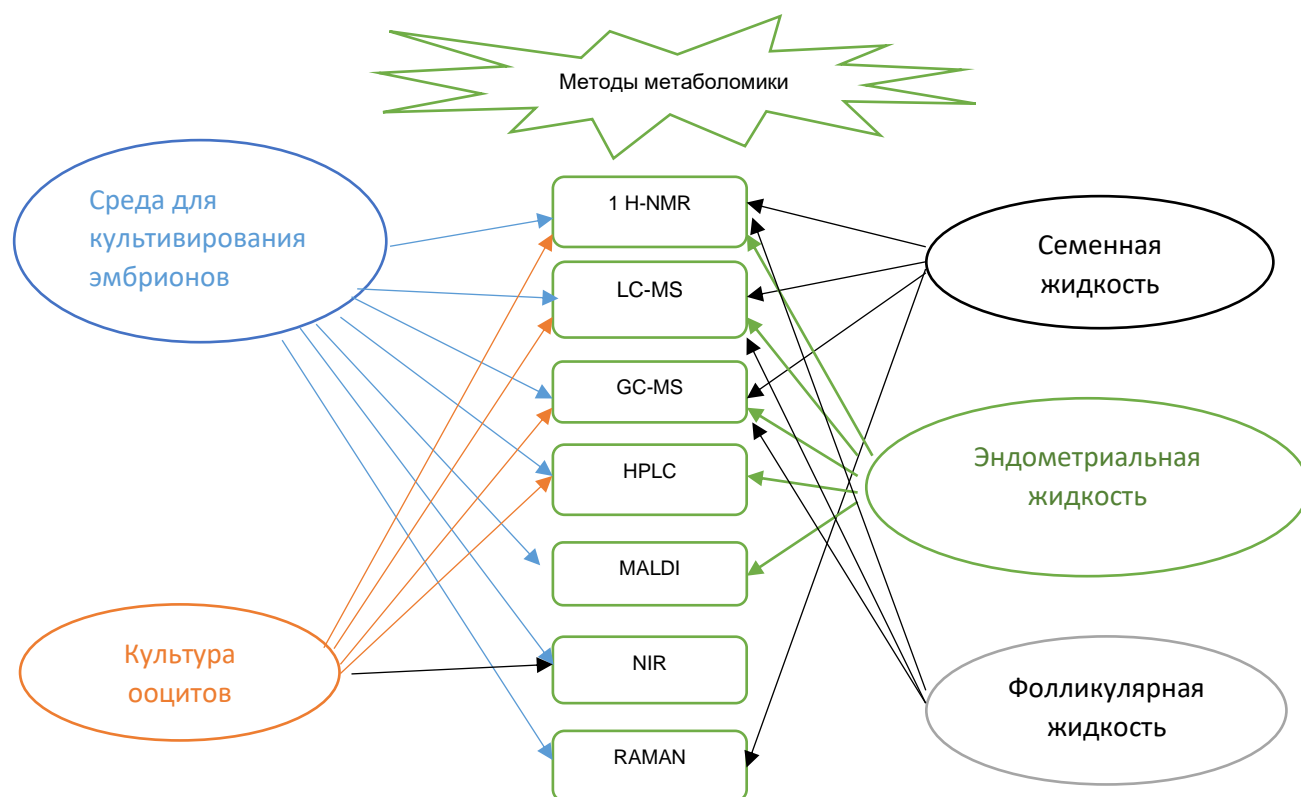


Рисунок 2. Схематическое изображение методов оценки метаболизма в репродукции человека.

1.6.1 Утилизация глюкозы

Метабомика относится к более широкой группе "омиксных" технологий: эта дисциплина включает изучение событий и взаимодействий клеточных структур и процессов от дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) до биологической функции, то есть от ДНК и генов до метаболитов, комплексным и глобальным образом [138]. Геном человека состоит из более чем 250 000 генов, которые кодируют ~200 000 транскриптов и более 1 миллиона белков, в то время как метаболом человека, напротив, состоит только из ~3000 метаболитов (рисунок 3).

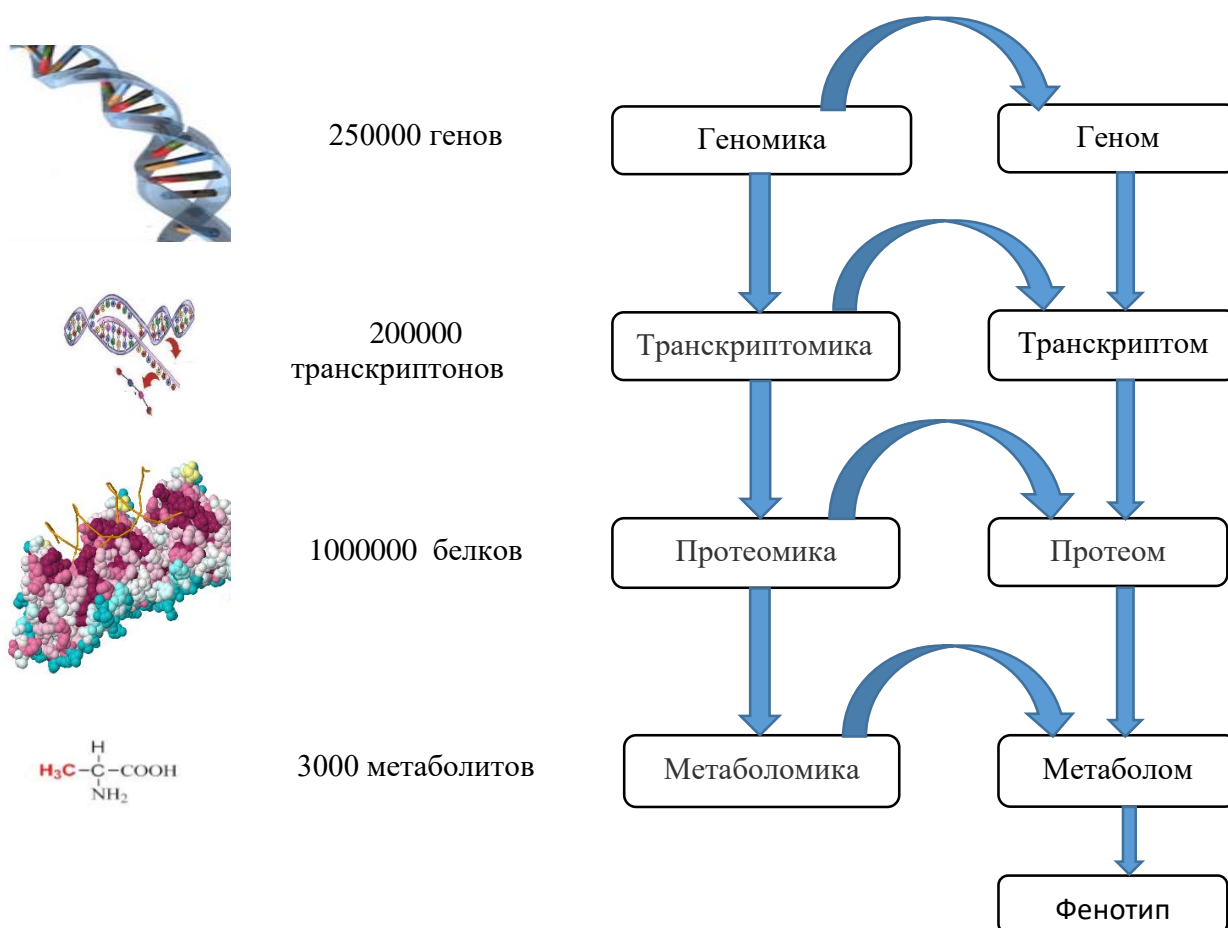


Рисунок 3. "Омический" каскад потока биологической информации в организме.

Меньшее количество метаболитов означает, что метаболомный анализ может выполняться быстрее по сравнению с геномным и протеомным анализом [139]. В отличие от геномики и протеомики, метаболомика имеет дело с различными классами молекул, такими как углеводы, аминокислоты, продукты окисления и карбоновые кислоты [135].

Метаболизм преимплантационных эмбрионов демонстрирует отличительные характеристики, связанные с их жизнеспособностью. Исходя из этого, было высказано предположение о том, что содержание метаболитов в питательных средах отражает имплантационный потенциал отдельных эмбрионов. Эта гипотеза была проверена в последовательных исследованиях, сообщающих о значительной связи между концентрацией и составом метаболитов сред культивирования и развитием эмбрионов.

Взаимосвязь между метаболической активностью и развитием эмбриона с последующей жизнеспособностью исследуется на протяжении нескольких десятилетий. Углеводный метаболизм преимплантационных эмбрионов человека был, в основном, исследован с точки зрения поглощения пирувата, глюкозы и выработки лактата.

Аденозинтрифосфат (АТФ) - это универсальный источник энергии для всех живых клеток, обеспечивающий связь между клетками и тканями организма. Для эмбрионального клеточного метаболизма необходим синтез АТФ, который осуществляется следующими путями: аэробный гликолиз или цикл трикарбоновых кислот (Кребса), и анаэробный гликолиз по пути Эмбдена — Мейергофа. В раннем преимплантационном периоде (стадия дробления) основным источником энергии являются пируват и лактат, при этом потребление глюкозы в этот период минимально [126]. Способность метаболизировать глюкозу значительно возрастает при переходе от стадии морулы к бластоцисте и, тем самым, отражает потенциал развития и жизнеспособность эмбриона [140].

Еще в 1970 году Menke T. и McLaren A. заметили, что бластоцисты мыши, культивируемые в основной среде (без аминокислот), теряли способность к окислению глюкозы [141]. В 1987 году, используя неинвазивную микрофлуоресценцию, Gardner D.K и Leese H.J предложили измерять поглощение глюкозы мышинными бластоцистами 4 суток развития до момента переноса их самкам-реципиентам. Было отмечено более высокое поглощение глюкозы в культуре, эмбрионы из которой имплантировались, чем те, перенос которых не привел к наступлению беременности [142].

Анализ взаимосвязи между потреблением питательных веществ человеческих эмбрионов и развитием *in vitro* был проведен Gardner D.K et al. в 2001г. Было установлено, что потребление глюкозы и пирувата на 4-е сутки значительно выше у тех эмбрионов, которые развились до стадии бластоцисты, по сравнению с эмбрионами, которые остановились в развитии [14]. Эти

результаты согласуются с первоначальными исследованиями, показывающими связь между поглощением пирувата и развитием бластоцисты [125,143].

На основании полученных результатов было доказано, что поглощение пирувата коррелирует с развитием бластоцисты, в то время как его связь с имплантацией или исходом беременности остается неубедительной.

Впоследствии была подтверждена положительная связь между поглощением глюкозы и жизнеспособностью человеческого эмбриона 4-х и 5-х суток развития. При этом эмбрионы женского пола потребляли на 28% больше глюкозы по сравнению с мужскими, данная половая метаболическая разница подтверждает гипотезу о том, что мужские и женские эмбрионы человека отличаются по своей физиологии из-за наличия двух активных X-хромосом и измененного протеома в течение ограниченного времени преимплантационного периода. Слабой стороной работы является то, что данные о половой принадлежности перенесенных эмбрионов были получены уже после родоразрешения. Так же в данной работе была отмечена связь между поглощением глюкозы бластоцистами и частотой наступления беременности, которая не была связана с буквенно-цифровой морфологической оценкой эмбриона [144]. Данное наблюдение было ранее задокументировано на других видах млекопитающих [145,146].

Однако, в недавно проведенном исследовании Зориной И. и соавторов были получены данные о том, что эмбрионы с нормальным и анеуплоидным кариотипом, а также эмбрионы разного пола не проявляли достоверных отличий в потреблении глюкозы на пятый день культивирования. При этом повышенный уровень потребления глюкозы указывал на более высокие показатели развития эмбриона на момент исследования и большую вероятность наступления беременности после переноса его в полость матки [147].

В то время как измерения концентрации глюкозы в крови и моче не вызывали трудностей, измерение глюкозы в культуральной среде является вопросом точности и чувствительности. Стандартные подходы не способны

точно измерить небольшие различия в концентрации питательных веществ, которые могут быть приписаны отдельному эмбриону. Но, к сожалению, данный метод является сложным в проведении исследований в рутинной клинической практике. Поэтому только те немногие лаборатории, которые имеют доступ к количественной микрофлуориметрии и способны к точному количественному определению питательных веществ в суб-микролитровых объемах, произвели большинство исследований в этой области [137].

В одной из работ Robertson S. с соавторами изучили влияние GM-CSF на развитие преимплантационных эмбрионов мышей. Инкубация бластоцисты с рекомбинантным GM-CSF вызывала 50% увеличение поглощения неметаболизируемого аналога глюкозы - 3-О-метил глюкозы [148]. Таким образом, эти данные указывают на то, что при опосредованном связывании GM-CSF с низкоаффинными рецепторами происходит увеличение потребления глюкозы, коррелирующее с повышением пролиферации и/или жизнеспособности бластомеров.

В дополнение к глюкозе, лактату и пирувату, аминокислоты могут выступать в качестве источника энергии, а также играть другие метаболические роли в процессе развития преимплантационных эмбрионов.

1.6.2. Аминокислоты.

Увеличение скорости формирования бластоцисты было достигнуто в основном за счет включения смесей заменимых и незаменимых аминокислот в среды культивирования.

Аминокислоты, помимо синтеза белка, играют важную роль в раннем эмбриональном развитии. Как известно, глицин является осморегулятором, влияющим на изменение объема эмбриональных клеток [149-151].

Первоначально, используя высокоэффективную жидкостную хроматографию, Houghton F. и соавторы исследовали 18 аминокислот

(аспарагин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, гистидин, глутамин, треонин, аргинин, аланин, тирозин, триптофан, метионин, валин, фенилаланин, лейцин, лизин, изолейцин, глицин) на разных стадиях развития эмбрионов и показали, что эмбрионы, достигающие стадии бластоцисты, демонстрируют отличительный профиль метаболизма аминокислот от тех, которые остановились в развитии. Аминокислота, наиболее последовательно истощаемая в процессе развития эмбрионов, до стадии бластоцисты - лейцин. Профили аминокислот аланина, аргинина, глутамина, метионина и аспарагина так же предсказали потенциальность развития бластоцисты на $> 95\%$ [15].

Далее в проведенном исследовании Brison D. проводил измерение концентрации аминокислот в отработанной культуральной среде в течение 24 часов до 2-клеточной стадии в 4 мкл каплях, содержащих смесь из 18 аминокислот (аспарагин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глутамин, серин, гистидин, треонин, аргинин, аланин, тирозин, триптофан, метионин, валин, фенилаланин, лейцин, лизин, изолейцин). Отработанную среду анализировали на содержание аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В результате данного исследования было установлено, что концентрации аспарагина, глицина и лейцина были в значительной степени ассоциированы с наступлением клинической беременности и последующим живорождением и не зависели от таких предикторов наступления беременности, как возраст женщины, базальный уровень ФСГ, количество клеток дробящегося эмбриона и его морфологической характеристики [129].

Seli E. с соавторами провели исследование метаболомного профилирования культуральных сред человеческих эмбрионов с помощью спектроскопии NIR, показав, что она является более точной в прогнозировании исхода беременности по сравнению с морфологической оценкой у женщин, которым переносили 1 эмбрион на второй или третий день развития [128]. В ранее опубликованной работе Seli E. приведены данные ретроспективного

исследования с использованием ЯМР с целью выявления биомаркеров, связанных с репродуктивными исходами. Было выявлено, что метаболомный профиль культуральных сред коррелирует с репродуктивным потенциалом эмбрионов. Концентрация глутамата, определенная методом ЯМР, была значительно выше в отработанных питательных средах эмбрионов, которые в последующем привели к беременности и родам, по сравнению с теми, которые не имплантировались. Аналогичным образом показатели жизнеспособности, рассчитанные по ЯМР с использованием взвешенных коэффициентов соотношения глутамата и аланина/лактата, были выше для эмбрионов, которые имплантировались [122].

В исследовании Picton H. и соавторов эмбрионы либо фиксировались для проведения интерфазного флуоресцентного гибридизационного анализа *in situ* хромосом 13, 18, 19, 21, X и Y, либо исследовались на митохондриальную активность. Процент эмбрионов, содержащих анеуплоидные клетки, повышался по мере прогрессирования от стадии пронуклеусов (23%) к поздней стадии дробления (50-70%). В культивируемых эмбрионах на 2-3 день, состоящих полностью из генетически нормальных или генетически аномальных клеток, существенно различался обмен аспарагина, глицина и валина. К 3-4 дню эуплоидные и анеуплоидные эмбрионы отличались по профилям серина, лейцина и лизина. Пол существенно ($p < 0,05$) влиял на метаболизм триптофана, лейцина и аспарагина в эмбрионах, находящихся на стадии дробления. В зиготах на стадии пронуклеусов по сравнению с эмбрионами на стадии дробления было существенно выше отношение числа активных митохондрий к количеству неактивных ($p < 0,05$). Более того, активность митохондрий достоверно ($p < 0,05$) коррелировала с нарушениями в обмене аспартата и глутамина [152].

Эти и многие другие дополнительные исследования свидетельствуют о том, что эмбрионы с положительным и отрицательным репродуктивным потенциалом по-разному взаимодействуют с окружающей их средой, что

отражается на метаболитах сред культивирования.

Метаболомика могла бы предложить мощное средство для отбора гамет и переносимых эмбрионов с целью повышения успешности ВРТ, тем самым уменьшая эмоциональное напряжение пар и социально-экономическое воздействие, которое сопровождает эту процедуру. До сих пор немногочисленные данные, полученные в литературе, демонстрируют значительные различия и в результате научные взгляды противоречат друг другу. В настоящее время применение метабомики 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 [123, 128, 153-155].

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

На базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Леонова Б.В. (руководитель отделения – д.м.н., профессор Калинина Е.А.) и лаборатории молекулярной патофизиологии (руководитель лаборатории – к.х.н. Бобров М.Ю.) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН Сухих Г.Т.), в соответствии с поставленной целью исследования, а также решения ее задач, осуществлялся набор пациенток в период с марта 2017 г. по январь 2019 г.

Критерии включения пациенток в исследование:

- ✓ возраст от 18 до 37 лет включительно;
- ✓ женское бесплодие и/или мужской фактор бесплодия (субфертильная сперма супруга);

✓ нормальный овариальный резерв (уровень ФСГ на 2-3 день цикла ≤ 12 МЕ/л; АМГ не менее 1 нг/мл; по данным УЗИ органов малого таза – не менее 5 антральных фолликулов в каждом яичнике);

✓ нормальное анатомическое строение матки;

✓ наличие в анамнезе не менее 3 неудачных попыток ЭКО при переносе бластоцист хорошего качества в анамнезе (в том числе при переносе размороженных бластоцист);

✓ подписанное информированное согласие на включение в исследование.

Критерии невключения в исследование:

✓ 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;

✓ злокачественные новообразования любой локализации, в том числе в анамнезе;

✓ отягощенный акушерско-гинекологический анамнез (эндометриоз III-IV ст., миома матки больших размеров и др.);

✓ опухоли яичников;

✓ острые воспалительные заболевания любой локализации;

✓ хронические заболевания в стадии обострения;

✓ сниженный овариальный резерв;

✓ тяжелая форма патозооспермии.

Критерии исключения пациенток из исследования:

✓ отсутствие роста фолликулов при стимуляции суперовуляции;

✓ отсутствие ооцитов после проведения трансвагинальной пункции.

В исследование была включена 91 супружеская пара, обратившаяся для проведения лечения в программе ЭКО или ИКСИ, прошедшая предварительное обследование, строго соответствующая выше перечисленным критериям. Исследование было одобрено комиссией по этике биомедицинских

исследований при ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (протокол № 2 от 9 февраля 2017 года).

2.2. Дизайн исследования

Дизайн исследования для задач № 1,2

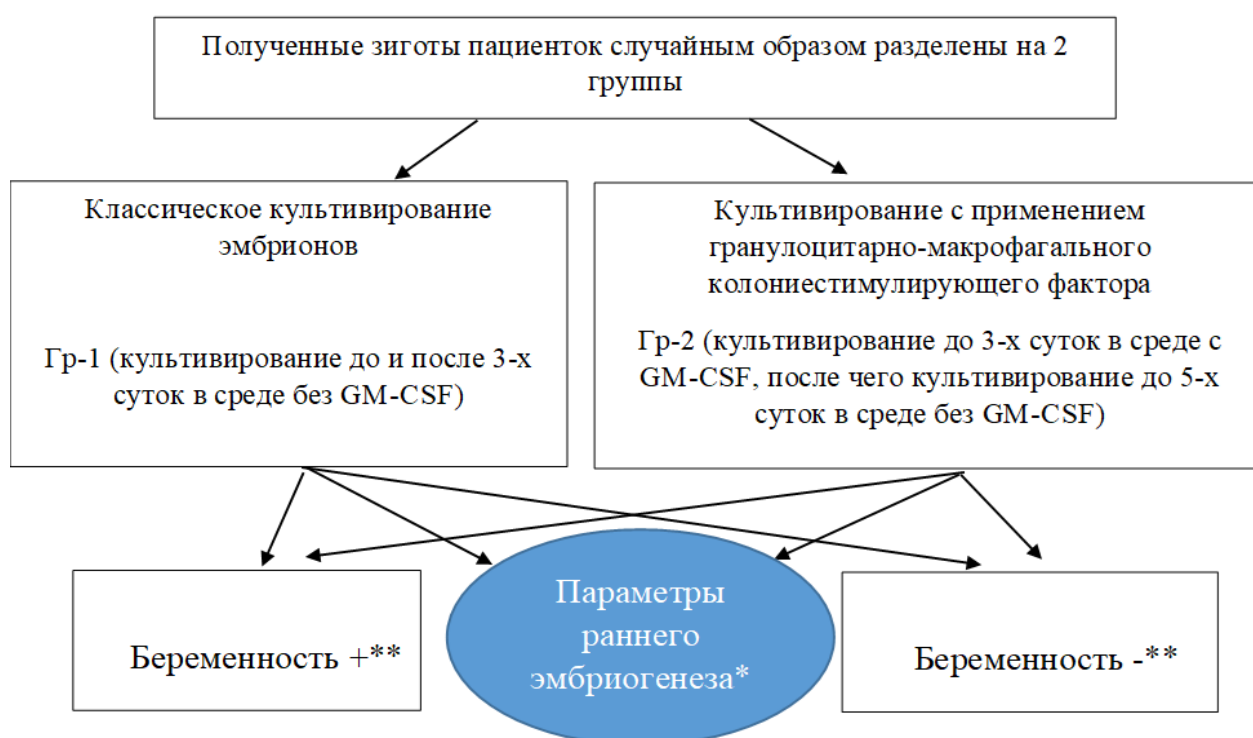


Рисунок 4. Дизайн исследования.

*Параметры раннего эмбриогенеза:

- доля эмбрионов различных классов на 3-е и 5-е сутки развития;
- доля эмбрионов, остановившихся в развитии до 3-х и 5-х суток развития.

** Предполагаемые клиничко-лабораторные предикторы:

- возраст пациентки
- ИМТ
- Сопутствующие гинекологические заболевания
- уровень АМГ
- уровень ФСГ
- уровень ЛГ

Дизайн исследования для задачи №3

Провести анализ эффективности программ ВРТ (частоту наступления биохимической, клинической беременности, ранних репродуктивных потерь, живорождения) у пациенток при использовании разных сред культивирования и переносе в цикле стимуляции или в криоцикле.

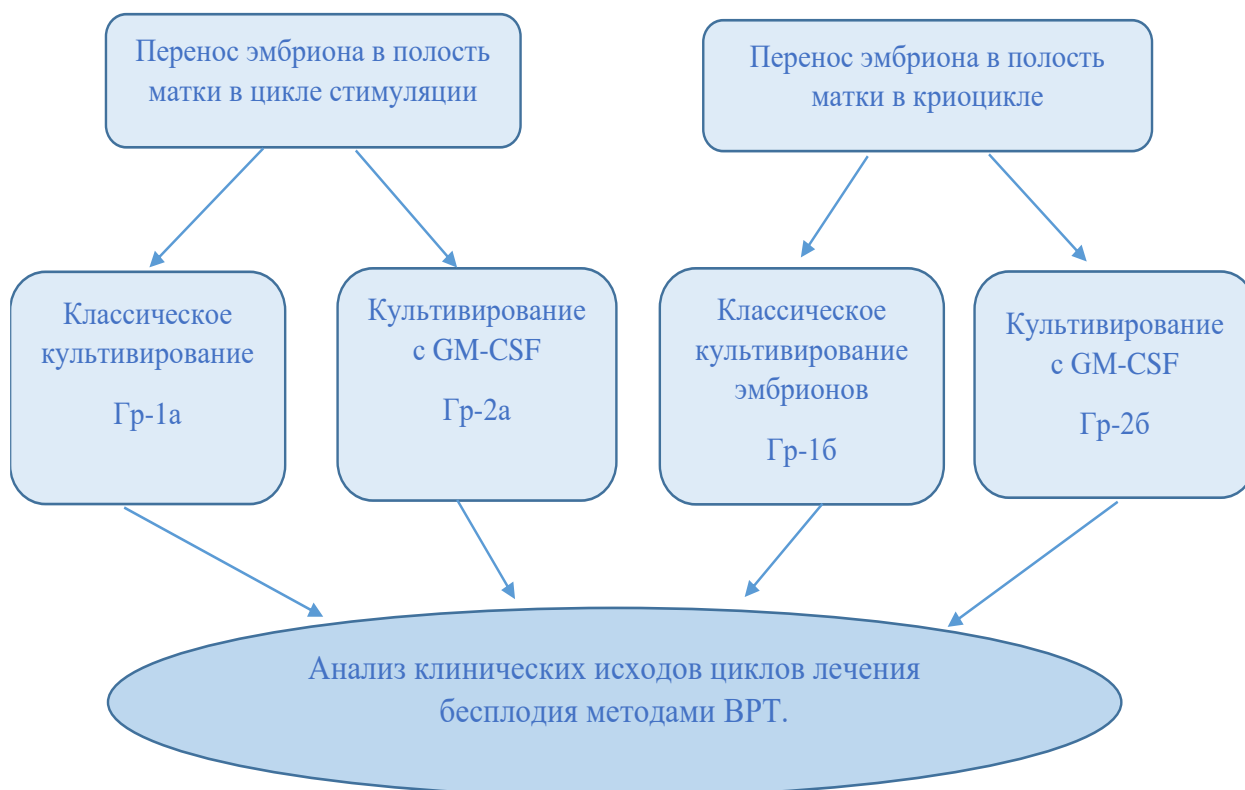


Рисунок 5. Дизайн исследования.

Группа 1а – Перенос эмбриона в полость матки в цикле стимуляции у пациенток с классическим культивированием эмбриона

Группа 2а – Перенос эмбриона в полость матки в цикле стимуляции у пациенток, эмбрионы которых культивировались с применением GM-CSF

Группа 1б – Перенос эмбриона в полость матки в криоцикле у пациенток с классическим культивированием эмбриона

Группа 2б – Перенос эмбриона в полость матки в криоцикле у пациенток, эмбрионы которых культивировались с применением GM-CSF.

Дизайн исследования для задач №4,5

На 3 и 5 сутки культивирования проводили морфологическую оценку качества эмбрионов с последующим забором культуральной среды для определения молекулярных предикторов качества развивающихся эмбрионов.

На 3 сутки развития оценивали количество и симметричность бластомеров, процент фрагментации цитоплазмы, а также синхронность дробления.

В соответствии с морфологическими характеристиками эмбрионов, они были классифицированы на 4 группы [116].

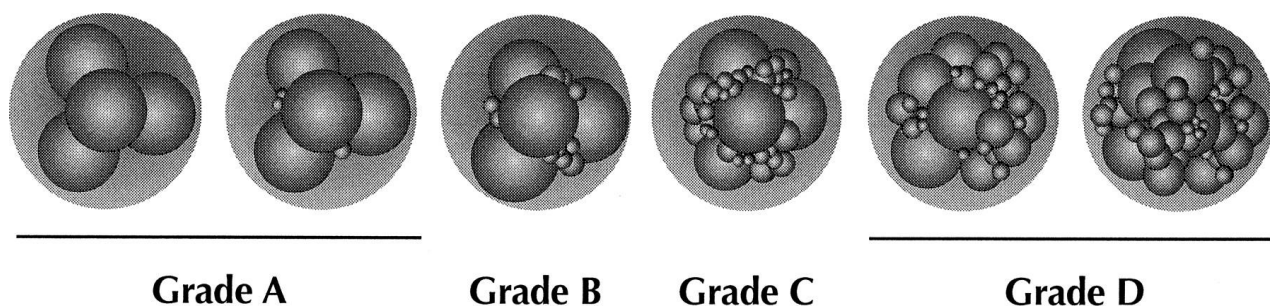


Рисунок 6. Определение степени фрагментации человеческого эмбриона.

класс А - размер бластомеров примерно одинаков, фрагментации цитоплазмы нет или фрагментация не превышает 5%;

класс В - размер бластомеров примерно одинаков, фрагментация не более 10%;

класс С - бластомеры отличаются по размеру, фрагментация 10 - 25%;

класс D - бластомеры значительно отличаются по размеру, фрагментация более 25%. (рисунок 6)

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

* Цифра указывает количество blastomeres, буквенная классификация описана выше.

На 5 сутки развития, оценивали морфологическое качество эмбрионов согласно «модифицированной» классификации Gardner D. (ESHRE, 2011), цифрой обозначена степень зрелости blastocyst:

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

Классификация эмбрионов	Описание
Отличные	3AA, 4AA, 5AA, 6AA
Хорошие	3-6 AB, 3-6 BA, 1-2 AA
Удовлетворительные	3-6BB, 3-6AC, 3-6CA, 1-2AB, 1-2BA
Неудовлетворительные	1-6BC, 1-6CB, 1-6CC, 1-2

1 степень - ранняя blastocyst, полость blastocyst меньше половины объема эмбриона.

2 степень - полость blastocyst больше половины объема эмбриона.

3 степень - полная бластоциста, полость полностью занимает объем эмбриона.

4 степень - расширенная бластоциста, полость бластоцисты становится больше и начинает истончаться прозрачная оболочка.

5 степень - трофэктодерма начинает проникать через прозрачную оболочку.

6 степень — вылупившаяся бластоциста, покинувшая zona pellucida (ZP).

Состояние внутренней клеточной массы характеризует первая буква:

- А (I класс) – хорошо различима, плотно упакована, содержит большое количество клеток.
- В (II класс) – хорошо различима, но более свободная группировка среднего количества клеток
- С (III класс) – трудно различима, содержит незначительное количество клеток

Состояние трофэктодермального слоя характеризует вторая буква:

- А (I класс) – достаточное количество клеток, формирующих плотный эпителий;
- В (II класс) – недостаточное количество неравномерно распределенных клеток, формирующих рыхлый эпителий клеток;
- С (III класс) – малое количество клеток.

Проводили разделение отработанных культуральных сред на группы в зависимости от среды культивирования и исходов имплантации у эмбрионов отличного морфологического качества на 3 и 5 сутки развития, с целью выявления молекулярных предикторов (таблицы 1, 2).



Рисунок 7. Дизайн исследования.

2.3. Методы исследования

Перед началом лечения бесплодия с применением методов ВРТ в амбулаторных условиях по месту жительства и/или в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ было проведено предварительное клинико-лабораторное обследование супружеских пар в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 107н "О порядке использования

вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению" от 30 августа 2012 г.

Применялись следующие общеклинические и специальные методы обследования:

- 1) определение группы крови и резус-фактора;
- 2) определение антител класса IgM, IgG к вирусу иммунодефицита человека 1,2 (ВИЧ 1,2), HBS-антигена, антител к HCV, суммарные антитела к бледной трепонеме в крови у обоих супругов;
- 3) клинический анализ крови;
- 4) биохимический анализ крови;
- 5) гемостазиограмма;
- 6) мазок на степень чистоты из влагалища;
- 7) общий анализ мочи;
- 8) кольпоскопия и цитологическое исследование шейки матки;
- 9) анализ крови на гормоны на 2-3 д.м.ц.: эстрадиол (E2), фолликулостимулирующий (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), пролактин (ПРЛ), дигидроэпиандростерона сульфат (ДГЭА-С), свободный тестостерон (Тсв), тиреотропный гормон (ТТГ), кортизол (К), свободный тироксин (Т4св), 17-оксипрогестерон (17-ОП), соматотропный гормон (СТГ), антимюллеров гормон (АМГ); на 20-22 д.м.ц. – прогестерон (П);
- 10) определение в крови Ig M и Ig G к вирусу краснухи, цитомегаловируса, токсоплазмоза, вирусу простого герпеса I и II типов;
- 11) инфекционное обследование посредством метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) на заболевания, передающиеся половым путем (ЗППП): хламидиоз, уреаплазмоз, микоплазмоз, трихомониаз, вирусы простого герпеса I и II типов, вирус папилломы человека (ВПЧ) 16,18 типов;
- 12) флюорография легких (для женщин, не проходивших это исследование более 12 месяцев);
- 13) молекулярно-биологическое исследование на вирус простого герпеса 1, 2, на цитомегаловирус в крови;

- 14) бактериоскопическое исследование отделяемого влагалища, уретры и цервикального канала с определением титра, и чувствительности к антибиотикам;
- 15) ультразвуковое исследование органов малого таза;
- 16) регистрация электрокардиограммы;
- 17) ультразвуковое исследование молочных желез – женщинам до 35 лет. При выявлении по результатам исследования признаков патологии молочной железы – консультация маммолога, пациенткам старше 35 лет - маммография;
- 18) заключение терапевта о состоянии соматического статуса пациентки, отсутствии противопоказаний к проведению стимуляции суперовуляции, вынашиванию беременности и родам;
- 19) ультразвуковое исследование щитовидной железы, при выявлении эндокринных нарушений - консультация врача-эндокринолога
- 20) спермограмма супруга или партнера;

2.3.1. Общеклинические методы исследования

Были собраны и проанализированы анамнестические данные всех пациенток в целях выявления наследственности, аллергоанамнеза, оперативных вмешательств, ранее перенесенных или настоящих соматических и инфекционных заболеваний, относящихся к разряду экстрагенитальной патологии.

Особое внимание уделялось особенностям становления и характеру менструального цикла (возраст менархе, регулярность и продолжительность менструального цикла, характер менструации, болезненность и интенсивность кровотечения, наличие «мажущих» выделений до и после менструации) и половой функции (время начала половой жизни, количество половых партнеров/браков, регулярность половой жизни, методы контрацепции), образу жизни, уровню комфортности социально-бытовым и трудовым условиям, наличию вредных привычек.

Информация о характере, клиническом течении и методах лечения ранее перенесенных заболеваний половых органов и органов малого таза так же изучалась и подвергалась доскональному анализу. Данная информация была представлена выписками из медицинской документации с обязательным указанием объема выполнения операции, течения послеоперационного периода, результатов гистологического исследования.

Количеству беременностей, условиям их наступления (брак и партнер), наличию осложнений во время беременностей, родов и в послеродовом периоде, количеству детей, их физическому и психическому развитию – анамнезу репродуктивной функции мужчин и женщин при исследовании уделялось особое внимание.

Уточнялась информация о продолжительности и причинах бесплодия пациенток. Так же рассматривались применяемые методы его лечения на предыдущих этапах, собирались сведения о ранее проведенных программах ВРТ (место и дата проведения процедуры, схема стимуляции суперовуляции, количество и качество полученных ооцитов, метод их оплодотворения, количество и качество полученных эмбрионов, длительность культивирования и количество перенесенных в матку эмбрионов, количество криоконсервированных эмбрионов, исход программы). Уточнялось, проводилось ли в предыдущих циклах лечения преимплантационное генетическое тестирование полученных эмбрионов, проводились изучение и анализ результатов исследования.

На этапе подготовки к вступлению в программу ЭКО всем женщинам проводилось измерение длины и массы тела для произведения расчета индекса массы тела (ИМТ) по формуле Кетле: $ИМТ = \text{масса тела} / \text{рост}^2 \text{ (кг/м}^2\text{)}$.

Также следует отметить, что обязательной составляющей исследования являлась оценка состояния опорно-двигательного аппарата, а также сердечно-сосудистой, нервной, дыхательной, пищеварительной, мочевыделительной и эндокринной систем организма в целях выявления наличия противопоказаний для проведения стимуляции функции яичников.

Проведение осмотра наружных половых органов и бимануальное исследование органов малого таза позволяло оценить их развитие и анатомические особенности: размер, форму, подвижность и консистенцию матки, ее болезненность при пальпации, наличие образований в области придатков матки, а также признаки спаечного процесса.

2.3.2. Гормональное исследование

Для того, чтобы проанализировать гормональный фон женщин перед вступлением в программу ЭКО или ИКСИ, на 2-3 день менструального цикла (д.м.ц.) была проведена оценка гормонального статуса.

Таблица 3. **Нормативные показатели концентрации гормонов в плазме крови у женщин репродуктивного возраста.**

Наименование показателя	Нормативные показатели
ФСГ, мМЕ/мл	3,0-10,0
ЛГ, мМЕ/мл	3,0- 8,0
АМГ, нг/мл	1,0- 4,5
Е ₂ , пг/мл	12-165
ПРЛ, мМЕ/л	120-500
К, нмоль/л	200-500
Т св, нмоль/л	1,0-2,5
ДЭА-С, мкмоль/л	0,9-11,7
ТТГ, мМЕ/л	1,0-3,0
Т ₄ св, пмоль/л	10,0-25,0
СТГ, нг/мл	0,05-4,32
17-ОП, нмоль/л	0,3-3,0
П, нмоль/л	16-95

В плазме крови исследовались концентрация следующих гормонов: ФСГ, ЛГ, АМГ, Е2, ПРЛ, К, Тсв, ДЭА-С, ТТГ, Т4св, СТГ, 17-ОП. Концентрацию П оценивали в плазме крови в период лютеиновой фазы на 20-22-й д.м.ц. Нормативные показатели концентрации гормонов в плазме крови у женщин репродуктивного возраста представлены в таблице 3.

2.3.3. Ультразвуковое исследование органов малого таза

До начала проведения лечения в программе ВРТ необходимо было обнаружить и исключить возможные противопоказания. С этой целью на 5-7 д.м.ц. всем пациенткам проводилось предварительное ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза на ультразвуковом аппарате компании «Brulle Kierre» (Siemens, Германия) с использованием трансвагинального датчика частотой 7,5 МГц. Исследование проводилось пациенткам с опорожненным мочевым пузырем. Для обеспечения стерильности использовался одноразовый презерватив.

Оценивались размеры тела матки, ее форма и положение, структура миометрия, полость матки, толщина и структура эндометрия, объем яичников и их расположение, выраженность фолликулярного аппарата. Диагностировались отсутствие объемных образований в малом тазу, степень выраженности спаечного процесса.

Частота проведения УЗ-мониторинга определялась схемой стимуляции функции яичников. Первое исследование органов малого таза осуществлялось в дни начала стимуляции на 2-3 д.м.ц., в зависимости от выраженности фолликулярного аппарата пациентки. Далее УЗ-контроль динамики фолликулогенеза и роста эндометрия проводился на 5-6 день стимуляции функции яичников с целью определения начала введения препарата антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) и возможной коррекции дозы вводимого препарата, далее - один раз в 2-3 дня с целью контроля динамики роста фолликулов и эндометрия и решения вопроса о

назначении триггера финального созревания ооцитов - препарата человеческого хорионического гонадотропина (ХГ).

2.3.4. Спермиологическое исследование эякулята

При предварительном обследовании в рамках подготовки к программе ЭКО или ИКСИ и в день трансвагинальной пункции яичников (ТВП) проводили спермиологическое исследование эякулята.

Перед проведением процедуры пациенты соблюдали предписанные рекомендации: режим полового воздержания в течение 3-5 дней, исключение спиртных напитков и перегреваний (баня, сауна, горячая ванна). Сбор материала производили в стерильный пластмассовый контейнер.

Параметры эякулята оценивали в соответствии с нормативами ВОЗ от 2010 г. (табл. 5) по объему эякулята, консистенции, рН, количеству сперматозоидов в 1 мл и их общему количеству в эякуляте, характеру их подвижности, и морфологии сперматозоидов.

Критериями ВОЗ 2010 г. определены следующие патологии эякулята:

- аспермия – отсутствие эякулята;
- азооспермия – отсутствие сперматозоидов в эякуляте;
- олигозооспермия - снижение концентрации сперматозоидов ниже нормативного значения <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%);
- олигоастенотератозооспермия – сочетание трех видов патозооспермии;
- астенотератозооспермия, олиготератозооспермия, олигоастенозооспермия – сочетание двух видов патозооспермии.

Таблица 4. Нормативы спермограммы (ВОЗ, 2010)

Показатель	Норматив, единицы измерения
Общий объем эякулята	$\geq 1,5$ мл
РН	$\geq 7,2$
Концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята	≥ 15 млн/мл
Общее количество сперматозоидов	≥ 39 млн
Время разжижения	10-60 минут
Подвижность сперматозоидов Общая подвижность сперматозоидов (А+В)	$\geq 40\%$
Сперматозоиды с прогрессивным движением (А)	$\geq 32\%$
Морфология	$\geq 4\%$ нормальных форм
Жизнеспособность сперматозоидов	$\geq 58\%$ живых сперматозоидов
Концентрация лейкоцитов	< 1 млн/мл
Агглютинация	отсутствует
Эритроциты	отсутствуют
Слизь	Небольшое количество
Амилоидные тельца	отсутствуют
Антиспермальные антитела (MAR-тест)	$< 50\%$ сперматозоидов, ассоциированных с антиспермальными антителами

2.3.5. Протокол стимуляции функции яичников

Проведение стимуляции суперовуляции начинали со 2-3 дня менструального цикла. Объем стартовой дозы гонадотропинов подбирали и назначали индивидуально в зависимости от ряда факторов: возраста пациентки, параметров овариального резерва и гормонального статуса. При ультразвуковой оценке определяли динамику роста фолликулов. Выявляли и при необходимости производили коррекцию дозы вводимых гонадотропинов. При достижении лидирующим фолликулом размеров 13-14 мм в диаметре для предотвращения преждевременной лютеинизации фолликулов начинали ежедневное подкожное введение препарата ант-ГнРг в дозе 0,25 мг/сут. При достижении фолликулами размеров 17-19 мм в диаметре с целью финального дозревания ооцитов в качестве триггера овуляции вводился препарат хорионического гонадотропина

человека (чХГ) в стандартной дозе 10 000 ЕД однократно внутримышечно за 35 часов до планируемой ТВП (рисунок 8).

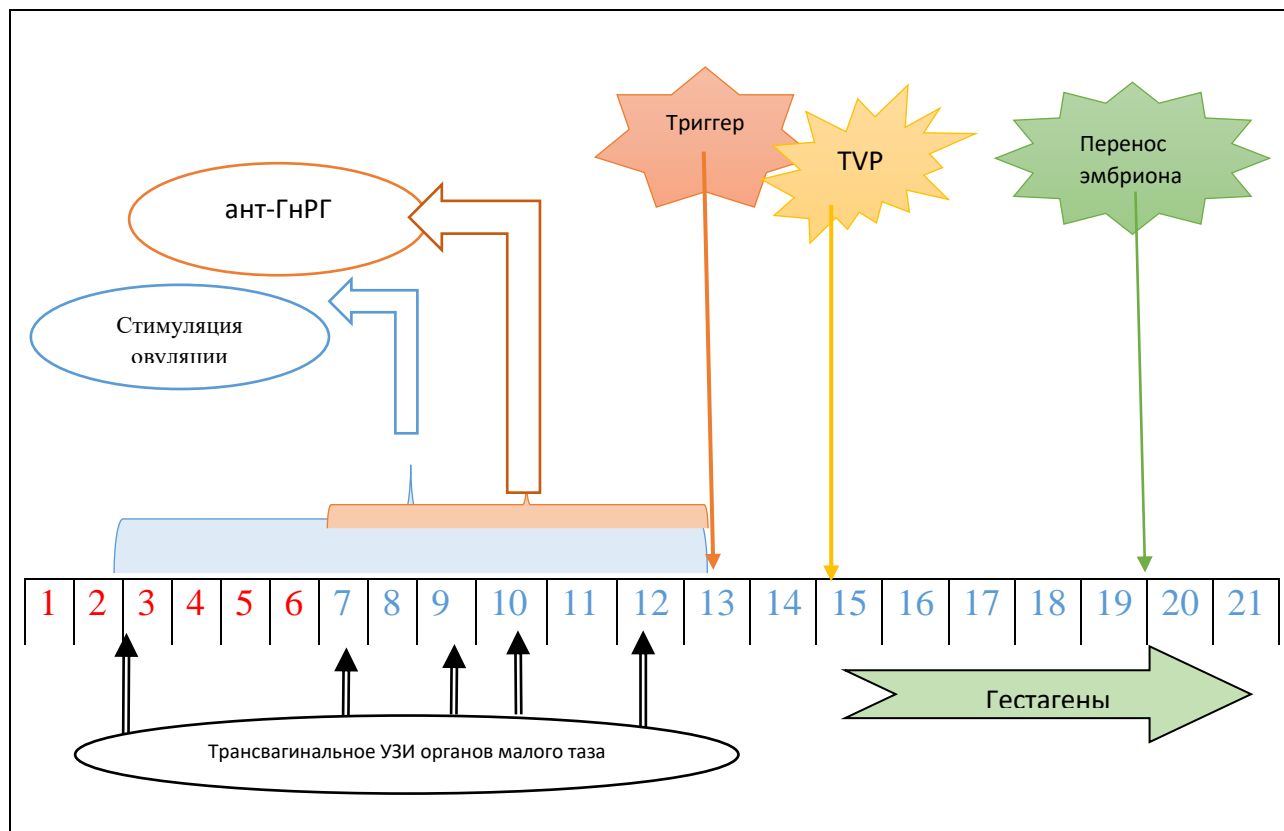


Рисунок 8. Схема стимуляции функции яичников с препаратами Гн и ант-ГнРГ.

2.3.6. Трансвагинальная пункция яичников

Через 35 часов после введения овуляторной дозы чХГ под внутривенным обезболиванием и ультразвуковым контролем с использованием одноразовых игл осуществляли трансвагинальную пункцию фолликулов яичников с целью забора ооцитов. Аспирацию фолликулярной жидкости производили под отрицательным давлением 140-150 мм водного столба в заранее подогретые стерильные пробирки, которые немедленно передавали эмбриологу для последующей идентификации ооцит-кумулюсного комплекса и оценки степени зрелости полученных ооцитов.

2.3.7. Оплодотворение ооцитов и культивирование дробящихся эмбрионов *in vitro*

Сразу же после аспирации фолликулярной жидкости осуществляли идентификацию ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) с последующим промыванием их в буфере для гамет от фолликулярной жидкости и крови и помещали в стерильные планшеты (Nunc, Дания) в среду для культивирования Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA), на 2-3 часа с целью предварительной инкубации при температуре +37,0 С и атмосфере с 6% CO₂. Ооциты оценивали под стереомикроскопом Nikon на нагретой поверхности стерильного ламинарного бокса при поддержании стабильной температуры (+37⁰С).

Метод оплодотворения определяли в зависимости от количества аспирированных ооцитов и показателей спермограммы (концентрация сперматозоидов, количество прогрессивно-подвижных сперматозоидов, характер их подвижности, наличие патологических форм).

Образцы эякулята подвергали седиментационному разделению в градиенте плотности при центрифугировании, отмывали в буфере для гамет (Gamete buffer, СООК, Австралия) и ставили на флотацию.

При нормозооспермии (ВОЗ, 2010) преовуляторные ооциты инсеминировали в четырёхлуночных планшетах Nunc, т.е. каждый ооцит переносили в каплю с содержанием прогрессивно-подвижных сперматозоидов из расчета 25000 сперматозоидов на лунку 500 мкл.

При необходимости проводили оплодотворение ооцитов методом ИКСИ. Перед проведением процедуры после периода предварительной инкубации производили денудирование ооцитов, а именно их ферментативное очищение от клеток кумулюса при помощи раствора гиалуронидазы в течение 20 секунд (Irvine Sc., USA). После этого ооцит-кумулюсные комплексы отмывали в среде Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA) и возвращали в лунки.

После завершения процедуры интрацитоплазматической инъекции оплодотворенные ооциты незамедлительно переносили в культуральную среду Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA) с целью дальнейшего культивирования.

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 основании проведенных ранее исследований на эмбрионах животных, а затем и человека [77]. На 3 сутки культивирования проводили морфологическую оценку качества эмбрионов с последующим переносом их в новые среды культивирования без добавления р-GM-CSF и дальнейшее культивирование до 5 суток.

2.3.8. Перенос эмбрионов в полость матки

Перенос эмбрионов 5-х суток культивирования осуществлялся в полость матки на стадии бластоцисты в асептических условиях стерильным гибким катетером Wallace (Германия) или СооК (Австралия) под контролем УЗИ. В криоцикле в отдельных случаях переносили эмбрионы 6 суток развития. У всех пациенток, включенных в исследование в день переноса эмбриона, оценивали толщину и структуру эндометрия с помощью трансабдоминального УЗИ. По данным УЗИ М-эхо составляла 9-12 мм., эндометрий имел характерную трехслойную структуру, так же не были выявлены объемные образования в области малого таза и признаки хронического эндометрита.

2.3.9. Поддержка лютеиновой фазы

С целью поддержания функции желтого тела в посттрансферном периоде спустя 24 часа после проведения пункции яичников назначали препарат микронизированного прогестерона в дозе 600 мкг/сут.

2.3.10. Диагностика наступления беременности

Диагностику беременности проводили по концентрации β -субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) в сыворотке крови. Исследование проводили через 12-14 дней после проведения программы переноса нативных или криоконсервированных / размороженных эмбрионов в полость матки. Положительный результат соответствовал уровню β -ХГЧ более 20 МЕ/л. На 21 день после переноса проводили трансвагинальное УЗИ для визуализации плодного яйца, еще через 10-14 дней – с целью определения сердцебиения плода.

2.3.11. Подготовка эндометрия в криопротоколе

В случае отрицательного результата β -ХГЧ у пациенток с витрифицированными эмбрионами проводили криоперенос. 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, под контролем УЗИ с помощью катетера Соок (Австралия). Прием микронизированного прогестерона продолжали в течение 14 дней с последующим тестом на наличие беременности.

2.3.12. Специальные методы исследования

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). Не осуществляли забор образцов отработанных культуральных сред 6 суток культивирования.

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.).

Анализ параметров потребления компонентов культуральных сред эмбрионами 3-х и 5-х суток культивирования

Согласно инструкции производителя коммерческих наборов реактивов Amplex Red Glucose Assay kit и Amplex Red glutamic Acid Assay kit (Molecular Probes Life technologies) флуориметром Qubit 3.0 (Life technologies) определяли потребление питательных компонентов из сред культивирования.

Принцип метода основан на сопряжении двух ферментативных реакций: окисления глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) глюкозооксидазой с эквимольным образованием одного из продуктов – перекиси водорода (H_2O_2), которая, в свою очередь, используется ферментом пероксидазой для превращения реагента AmplexRed (10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин) во флуоресцирующее производное резорурфин. Соотношение образующегося резорурфина и перекиси равно 1:1.

Таким образом, снижение флуоресценции резорурфина соответствует снижению концентрации глюкозы в исследуемом образце.

Оценка масс-спектрометрического профилирования культуральных сред эмбрионов 3-х и 5-х суток культивирования

Предварительно перед проведением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) осуществляли экстракцию метаболитов через добавление трех объемов метанола (CH_3OH) к одному объему инкубационной среды. После перемешивания

преципитат осаждали центрифугированием при 14000g, надосадок в дальнейшем использовали для анализа.

Далее в хроматографические флаконы со стеклянными вставками отбирали 18 мкл экстракта каждого образца, добавляли 2 мкл внутреннего стандарта с конечной концентрацией 25 мкм. Разделение проб проводили на колонке Zorbax SB C18 - 5 мкм, длина 15 см, внутренний диаметр 0,5 мм (Agilent, USA) при помощи хроматографической системы Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Scientific, USA).

Элюирование компонентов образцов проводили в изократическом растворе 5% подвижной фазы «В» (0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле) в течение 15 минут, затем в градиенте 5-95% подвижной фазы в течение 10 мин. при скорости потока 40 мкл/мин. Затем следовало промывание 5 мин (95 % раствора В), после чего в течение 1 минуты возвращалась исходная концентрация фазы “В” в 5% и колонка уравнивалась 3 мин. Общее время хроматографии одного образца составило 34 минуты.

Детекцию метаболитов проводили на гибридном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Bruker MaXis Impact (Bruker Daltonics, Germany) в двух измерениях на один образец. Масс-спектры получали при разрешении 50000 в диапазоне 100-1500 m/z, в режиме положительно заряженных ионов. Детекция пиков, удаление шумовых сигналов, обработка, изучение и анализ данных осуществляли при помощи программы Progenesis Q1 2.0 (Waters, Milford, США). Обработка и выравнивание масс-спектров были выполнены с параметрами: тип прибора - масс-спектрометр высокого разрешения; минимальная абсолютная интенсивность пика – 100 единиц; минимальная ширина пика – 0,02 минуты. Для поиска потенциальных метаболитов с соответствующими молекулярными массами использовали базу данных HMDB, KEG. С помощью регрессии частично наименьших квадратов (PLS-DA) определялись те метаболиты, которые вносят наибольший вклад в наблюдаемые различия между группами. Для 50 наиболее значимых

метаболитов проводилась идентификация с помощью базы данных Metlin, а с помощью Progenesis определялась кратность изменений этих метаболитов между группами образцов.

2.3.13. Статистический анализ полученных данных

На индивидуальном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «SPSS Statistics 17.0», «Statistica for Windows» v. 7.0. была проведена статистическая обработка данных. Количественные результаты подвергали обработке методом вариационной статистики. Для каждого количественного параметра были определены среднее значение, среднеквадратическое отклонение, ошибка среднего, медиана, 95% доверительный интервал. Для качественных данных определяли показатели частоты (%).

Тип распределения количественных данных был определен для каждой исследуемой группы при помощи критерия Колмогорова-Смирнова или Шапиро-Уилка, определяемых в зависимости от размера выборки, а также при помощи построения графиков распределения анализируемых данных. Данные манипуляции проводились до сравнительного анализа. При нормальном типе распределения данных определяли среднее значение со стандартным отклонением. Для сравнения данных применяли методы параметрической статистики: t-тест для анализа данных в группах сравнения. Если количественные данные не подчинялись закону нормального распределения, то для их описания применялись медиана и процентиля. Для оценки различий между группами применяли методы непараметрической статистики. Следует отметить, что тест Манна-Уитни и тест Краскела-Уоллиса применяли для сравнения данных в 2-х группах.

Для описания качественных данных использовали частоты и доли, с которыми данные признаки встречались в выборке. Для сравнения качественных показателей и установления значимых различий между ними в 2-х и более

группах использовали тест χ^2 , для вычисления которого прибегали к построению таблиц сопряженности.

Через коэффициент корреляции были оценены зависимые переменные. Корреляционный анализ проводили с использованием параметрического критерия Пирсона при нормальном типе распределения данных. Непараметрический корреляционный критерий Спирмена использовался при отличном от нормального типа распределения данных.

Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ (95% уровень значимости), при $p < 0,01$ (99% уровень значимости). Отношение шансов (ОШ) приведено с 95% доверительным интервалом (ДИ).

Для минимизации ошибки выборки использовались строгие критерии отбора пациентов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно поставленной цели и задачам исследования была обследована 91 супружеская пара, обратившаяся с целью проведения программы ЭКО или ИКСИ по поводу бесплодия, обусловленного трубно–перитонеальным фактором, отсутствием овуляции, мужским фактором (при отсутствии выраженной патозооспермии), а также сочетанным фактором, с обязательным наличием у пациентки не менее 3-х неудачных попыток ЭКО в анамнезе и соответствовавшим выше перечисленным критериям включения/исключения (см. главу 2). Все пациентки подписывали информированное согласие после ознакомления с целью и поставленными задачами исследования.

3.1. Клинико-анамнестическая характеристика включенных в исследование пациенток

Возраст пациенток, а также их антропометрические данные на момент вступления в программу ЭКО или ИКСИ представлены в таблице (таблица 5).

Таблица 5. **Возрастная и антропометрическая характеристика пациенток, включенных в данное исследование.**

Показатель	Включенные в исследование пациентки, n=91
Возраст, лет	31,9 ± 3,3
Рост, см	164,7 ± 6,0
Вес, кг	60,9 ± 7,9
ИМТ, кг/м ²	22,4 ± 2,9

данные представлены как среднее ± стандартное отклонение

Полученные данные о менструальной функции, таких как возраст менархе, продолжительность менструации и менструального цикла, а также возраст начала половой жизни представлены в таблице 6.

На основании критерия Колмогорова – Смирнова было обнаружено, что возраст менархе, продолжительность менструального цикла, начало половой жизни не подчиняются закону нормального распределения.

Таблица 6. Характеристика менструальной и сексуальной функции.

Показатель	Включенные в исследование пациентки, n=91
Возраст менархе, лет	13 (12 – 14)
Продолжительность менструации, дни	5 (4-5)
Продолжительность менструального цикла, дни	28 (28-30)
Начало половой жизни, лет	18 (17-19)

данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля;

При рассмотрении основных характеристик менструального цикла исследуемых женщин было выявлено, что у большинства пациенток средний возраст менархе составил 13 лет, при этом самый поздний возраст - 15 лет, самый ранний – 11 лет. Средняя продолжительность менструального кровотечения составила 5 дней, средняя продолжительность менструального цикла - 28 дней.

В анамнезе у 79 пациенток, включенных в исследование, ранее проводились оперативные вмешательства на органах малого таза, структура которых представлена на рисунке 9.

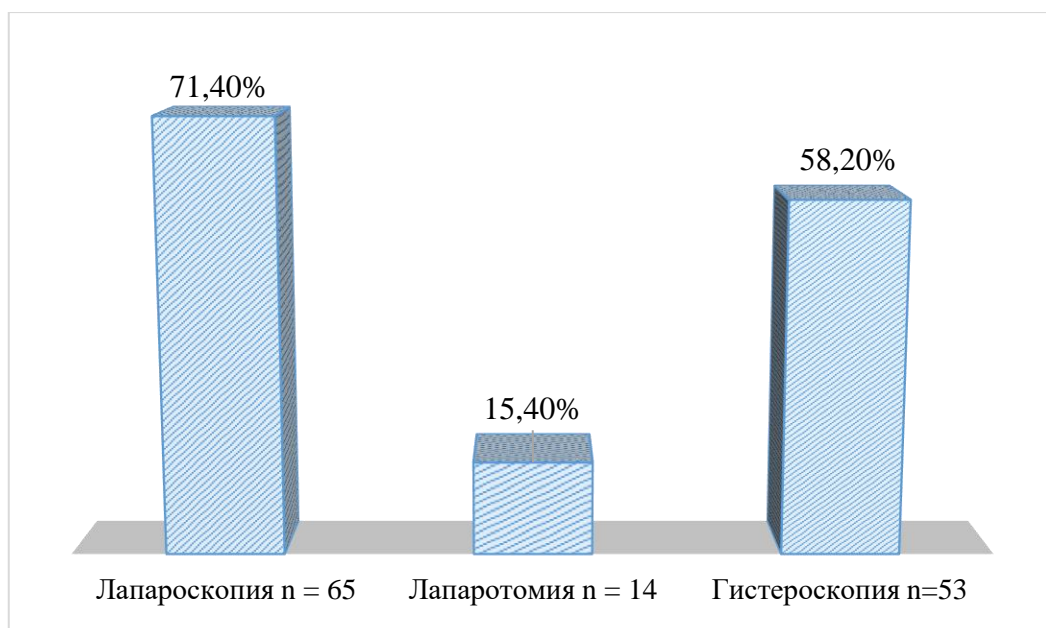


Рисунок 9. Оперативные вмешательства в анамнезе у пациенток.

Таблица 7. Структура гинекологической заболеваемости пациенток, а также перенесенных оперативных вмешательств на органах малого таза.

Показатель	Включенные в исследование пациентки n=91
Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) I-II ст	24,2% (n=22)
Аденомиоз I-II ст	6,6% (n=6)
Миома матки малых размеров	15,4% (n=14)
Односторонняя тубэктомия	13,2% (n=12)
Двухсторонняя тубэктомия	18,7% (n=17)
Миомэктомия	8,8% (n=8)
Сальпингоовариолизис	20,9% (n=19)
Резекция яичников	20,9% (n=19)

данные представлены как абсолютное число пациенток и доли пациенток в %.

В таблице 7 представлены данные о гинекологических заболеваниях, а также характере и количестве ранее перенесенных оперативных вмешательств у исследуемых пациенток.

Среди перенесенных гинекологических заболеваний преобладал наружный генитальный эндометриоз, частота которого составила 24,2%. Так же значительную долю в структуре перенесенных гинекологических заболеваний составила миома матки - 15,4%. Все заболевания, препятствующие наступлению и вынашиванию беременности, были пролечены до проведения программы ВРТ.

Таблица 8. Частота встречаемости экстрагенитальных заболеваний у пациенток, включенных в исследование.

Показатель	Включенные в исследование пациентки (n=91)
заболевания органов желудочно-кишечного тракта	9,9% (n=9)
заболевания эндокринной системы	26,4% (n=24)
заболевания мочеполовой системы	4,4% (n=4)
заболевания органов дыхания	2,2% (n=2)
заболевания ЛОР-органов	2,2% (n=2)

данные представлены как абсолютное число пациенток и доли пациенток в %.

У исследуемых пациенток встречались экстрагенитальные заболевания (таблица 8), которые находились в стойкой ремиссии или медикаментозной компенсации на момент вступления пациенток в протокол ЭКО, такие как:

- ❖ заболевания эндокринной системы: гипотиреоз в стадии медикаментозной компенсации;

- ❖ заболевания мочеполовой системы, а именно хронический пиелонефрит, хронический цистит;

- ❖ заболевания ЛОР-органов, хронический тонзилит;
- ❖ заболевания органов дыхания, хронический бронхит;
- ❖ заболевания органов желудочно-кишечного тракта, хронический гастрит, хронический гастродуоденит, дискинезия желчевыводящих путей;

На момент вступления в программу ЭКО или программу ИКСИ проводили оценку данных репродуктивного анамнеза.

Таблица 9. Характеристика бесплодия в зависимости от его фактора.

Показатель	Включенные в исследование пациентки (n =91)
Тип бесплодия**	
Первичное	40,7 % (n=37)
Вторичное	59,3 % (n=54)
Продолжительность бесплодия, лет*	5 (4-8)
По этиологии **	
Мужской фактор	39,6 % (n=36)
Трубно – перитонеальный фактор	4,4 % (n=4)
Сочетанный фактор	56,0 % (n=51)

*данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля;

**данные представлены как абсолютное число пациенток и доли пациенток в %

Анализ приведенных данных о типе бесплодия женщин выявил незначительное преобладание вторичного бесплодия 59,3 % (n=54) над первичным, который составил 40,7 % (n=37). Средняя продолжительность бесплодия женщин, включенных в данное исследование, составила 5 лет (от 1 до 16 лет) (Таблица 9).

Среди этиопатогенетических причин преобладающую часть составили сочетанный фактор 56,0 % (n=51) и мужское бесплодие 39,6 % (n=36). На рисунке 10 представлена диаграмма с основной характеристикой факторов бесплодия.

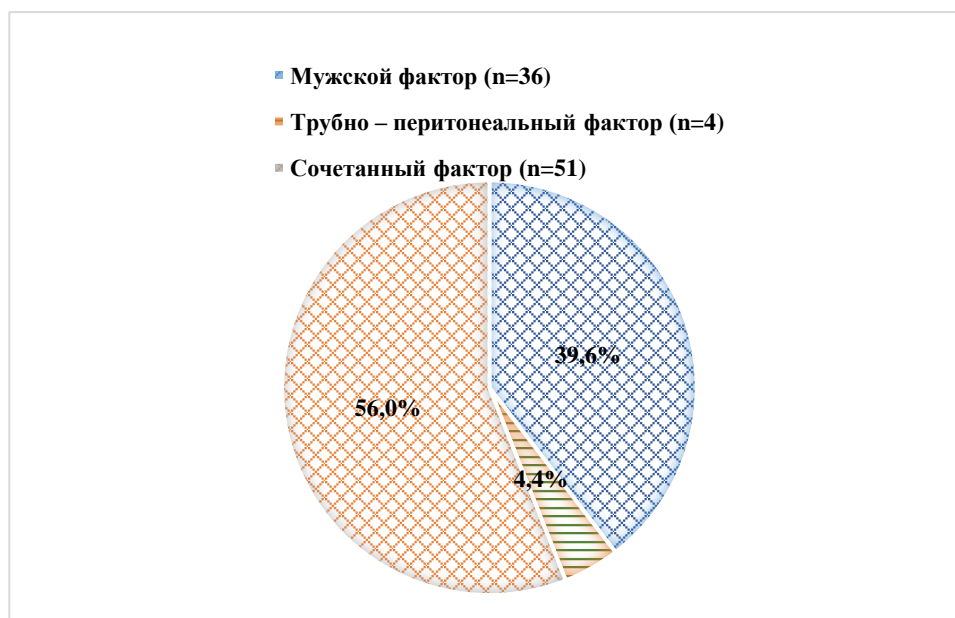


Рисунок 10. Структура причин бесплодия у женщин, включенных в исследование.

Среди пациенток с вторичным бесплодием (n=54) беременность ранее завершилась в 32,6 % неразвивающейся беременностью, в 29,6 % - эктопической беременностью, в 10,2 % - самопроизвольным прерыванием беременности, в 13,3 % - искусственным прерыванием беременности на малом сроке и лишь в 14,3 % случаев - самопроизвольными родами. Стоит отметить, что количество неразвивающихся беременностей, прерываний беременности, эктопических беременностей и своевременных родов не соответствует количеству пациентов, так как у одной пациентки могло быть несколько беременностей с соответствующим исходом (таблица 10).

Таблица 10. Исходы беременностей у женщин с вторичным бесплодием.

Показатель	Включенные в исследование пациентки
Общее количество беременностей	98
Количество своевременных родов с рождением живого ребенка	14,3% (n=14)
Количество искусственных прерываний беременностей	13,3% (n=13)
Количество неразвивающихся беременностей	32,6% (n=32)
Количество самопроизвольных прерываний беременностей	10,2% (n=10)
Количество эктопических беременностей	29,6% (n=29)

данные представлены как абсолютное число пациенток и доли пациенток в % соотношении

3.2. Лабораторные данные включенных в исследование пациенток.

Для того чтобы проанализировать гормональный фон, всем женщинам перед началом программы ЭКО или ИКСИ, на 2-3 д.м.ц., в раннюю фолликулярную фазу проводили оценку гормонального статуса (таблица 11).

На основании критерия Колмогорова – Смирнова было обнаружено, что такие показатели, как АМГ, СТГ, тестостерон и прогестерон не подчиняются закону нормального распределения.

Уровень ФСГ, ЛГ и АМГ указывал на наличие у женщин нормального овариального резерва. Функция щитовидной железы не страдала или была скорректирована до начала программы ЭКО.

Таблица 11. Лабораторные данные включенных в исследование пациенток.

Показатель	Включенные пациентки (n=91)
ФСГ, мМЕ/мл*	6,6 ± 2
ЛГ, мМЕ/мл*	5,3 ± 2
АМГ, нг/мл**	2,7 (2,0-5,1)
Е2, пг/мл*	47,8 ± 26,4
Кортизол, нмоль/л*	348,5 ± 143,3
17-ОН нмоль/л*	2,8 ± 1,2
Тестостерон, нмоль/л**	1 (0,7-1,4)
СТГ, нг/мл**	0,9 (0,3-3,0)
Прогестерон, нмоль/л**	17,5 (8,0-41,8)
ТТГ, мМЕ/л*	1,7 ± 0,9
DHEA-S мкмоль/л*	6,2 ± 3
Т4 св., пмоль/л*	14 ± 2,9

*данные представлены как среднее ± стандартное отклонение

**данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля.

3.3. Особенности протоколов стимуляции суперовуляции, фолликуло- и оогенеза.

Всем женщинам проводили стимуляцию функции яичников с использованием препаратов гонадотропинов (Гн) со 2-5 дня менструального цикла, в начальной дозе 150-225 МЕ, в зависимости от состояния овариального резерва, затем при необходимости с 5-6 дня проводили коррекцию вводимой дозы гонадотропинов. С целью предупреждения преждевременного выброса ЛГ с 6-го дня стимуляции вводили препарат антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРг) в дозе 0,25 мг/сут до дня введения триггера финального созревания ооцитов, в качестве которого использовали препарат хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в стандартной дозе 10000 ЕД.

Таблица 12. Характеристика параметров стимуляции суперовуляции исследуемых пациенток.

Показатели	Включенные пациентки
ФСГ**	39,6% (n=36)
ФСГ/ЛГ**	60,4 % (n=55)
Суммарная доза гонадотропинов на цикл стимуляции (по содержанию ФСГ), МЕ*	1350 (1200-1500)
Длительность стимуляции, дни *	9 (9-10)

* данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля;

**данные представлены как абсолютное число и %

Продолжительность стимуляции составила 9 (9-10) дней, стартовая доза 150-225 МЕ, суммарная доза вводимого гонадотропина (по содержанию ФСГ) составила 1350 (1200-1500) МЕ.

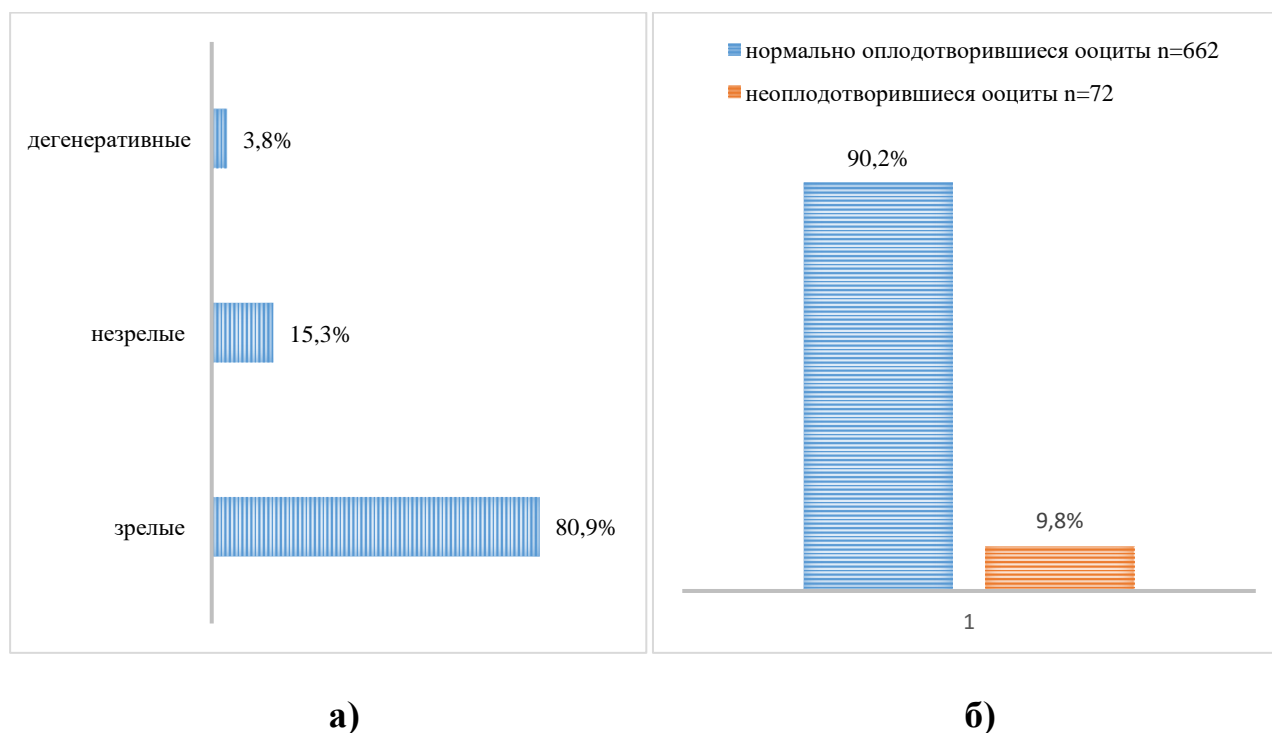


Рисунок 11. а) структура аспирированных ооцитов у пациенток в исследуемых группах б) количество нормально оплодотворившихся и не оплодотворившихся ооцитов.

При трансвагинальной пункции фолликулов яичников полученный аспират передавали эмбриологу с целью идентификации ооцитов и оценки их качества. Из 908 идентифицированных ооцитов 80,9 % были зрелыми (n=734), 15,3% - незрелыми (n=139), 3,8 % - дегенеративными (n=35). На следующие сутки оценивали результат оплодотворения (рисунок 11).

3.4. Характеристика параметров сперматогенеза в супружеской паре.

Несмотря на то, что в момент обращения мужской фактор был у 73,6 % супружеских пар, в день ТВП нормозооспермия была лишь у 4,4% (n=4), остальные 95,6% (n=87) были представлены различными формами патозооспермии, которые выражались в снижении подвижности, количества и повышении числа морфологически патологических форм сперматозоидов. Основную часть при этом представляла такая патология как тератозооспермия (ТЗС) - 57,1 (n=52), астенотератозооспермия (АТЗС) - 30,8% (n=28), олигоастенотератозооспермия (ОАТЗС) – 4,4% (n=4), олиготератозооспермия (ОТЗС) – 3,3% (n=3) (рисунок 12).

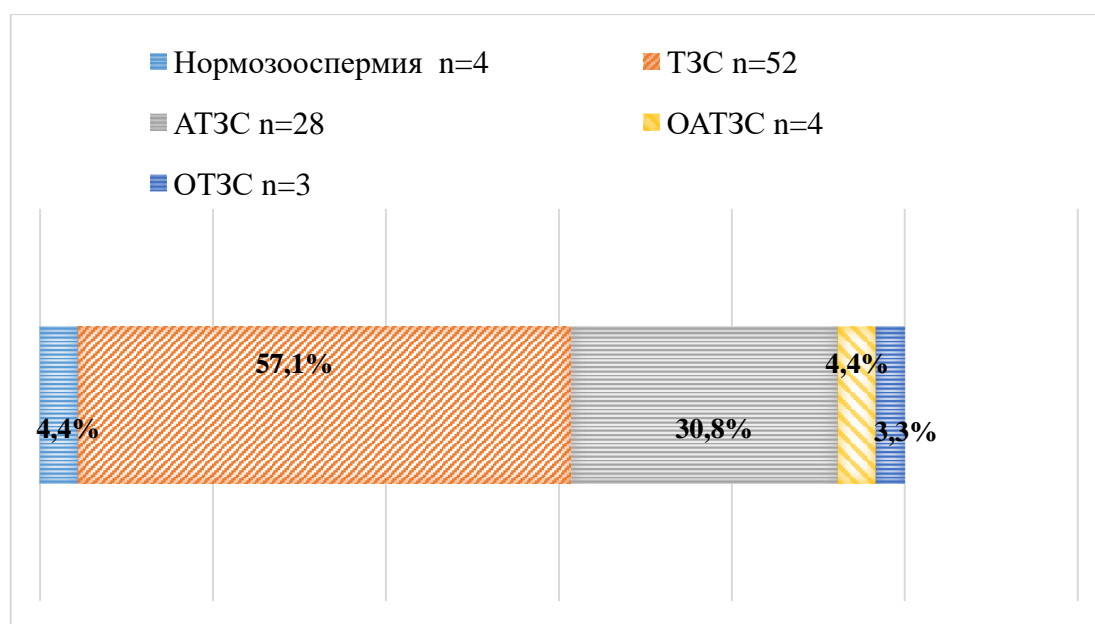


Рисунок 12. Структурная характеристика параметров сперматогенеза в день ТВП.

3.5. Параметры раннего эмбриогенеза.

Оценку параметров раннего эмбриогенеза проводили у всех пациенток, включенных в исследование. Преимущественно оплодотворение производилось методом ИКСИ, что составило 95,1% (n=698) случаев и лишь 4,9 % (n=36) - ЭКО. из 734 ооцитов нормально оплодотворились 662, что составило 90,2%, 72 ооцита не оплодотворились (9,8%) (рисунок 11).

Случайным образом было произведено разделение полученных зигот на две группы в зависимости от среды, в которой они далее культивировались: 1 группа – классическое культивирование (n=330), 2 группа - с добавлением гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (n=332).

Таблица 13. Морфологическая характеристика качества эмбрионов на 3 сутки развития в группах сравнения.

Показатель	Группа 1 (культивирование до и после 3-х суток в среде без GM-CSF) (n =330)	Группа 2 (культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, после чего культивирование до 5-х суток в среде без GM-CSF) (n =332)	P, χ^2 -тест
Эмбрионы отличного качества	49,4 % (n =163)	51,6 % (n =171)	0.587
Эмбрионы хорошего качества	28,5 % (n =94)	31,9% (n =106)	0.335
Эмбрионы удовлетворительного качества	4,2 % (n =14)	7,2 % (n =24)	0.099
Эмбрионы неудовлетворительного качества	9,4 % (n =31)	6,0% (n=20)	0.104
Эмбрионы, остановившиеся в развитии	8,5 % (n =28)	3,3% (n =11)	0.005

данные представлены как абсолютное число и %

На 3-е сутки после оплодотворения в обеих группах производили морфологическую оценку качества всех эмбрионов вне зависимости от среды

культивирования, с последующим переносом их в новую культуральную среду без добавления GM-CSF (таблица 13).

В группе 2 (с добавлением GM-CSF) отмечалось меньшее количество эмбрионов неудовлетворительного качества и остановившихся в развитии по сравнению с группой 1 (без добавления GM-CSF), что составило 6,0 % и 3,3 % против 9,4 % и 8,5 % соответственно.

Так же наблюдалось незначительное увеличение количества эмбрионов отличного/ хорошего/удовлетворительного качества во 2 группе – 51,6% (n=171) / 31,9 % (n=106) / 7,2 % (n=24), по сравнению с 1 группой – 49,4% (n=163) / 28,5% (n=94) / 4,2 % (n=14).

Таблица 14. Морфологическая характеристика качества эмбрионов на 5 сутки развития в группах сравнения.

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

данные представлены как абсолютное число и %

На 5-е сутки после оплодотворения производили морфологическую оценку качества эмбрионов согласно «модифицированной» классификации D. Gardner (таблица 14).

При оценке морфологического качества эмбрионов на 5 сутки развития отмечали незначительное увеличение эмбрионов отличного качества в группе 1 – 23,9% (n=79) по сравнению с группой 2 - 19,6% (n=65), при этом количественное соотношение эмбрионов хорошего качества составило 15,7% (n=52) группе 2 по сравнению с группой 1, где этот показатель составил - 11,5% (n=38). Эмбрионы удовлетворительного качества преобладали в группе 1 (n= 20), что составило 6,1 %, а в группе 2 (n=12) - 3,6%

Таблица 15. Морфологическая характеристика качества эмбрионов на 6 сутки развития в группах сравнения.

Показатель	Группа 1 (культивирование до и после 3-х суток в среде без GM-CSF) (n =45)	Группа 2 (культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, после чего культивирование до 5-х суток в среде без GM-CSF) (n =66)	P, χ^2-тест
Эмбрионы отличного качества	17,8% (n =8)	7,6% (n = 5)	0.102
Эмбрионы хорошего качества	8,9% (n = 4)	10,6% (n = 7)	0.767
Эмбрионы удовлетворительного качества	6,7% (n =3)	22,7% (n = 15)	0.025
Эмбрионы неудовлетворительного качества	51,1% (n = 23)	31,8% (n=21)	0.042
Эмбрионы, остановившиеся в развитии	15,5% (n = 7)	27,3% (n = 18)	0.149

данные представлены как абсолютное число и %

Эмбрионы 5-х суток на стадии морулы, которые составили в группе 1 13,6% (n=45), а в группе 2 – 19,9 % (n=66), оставляли культивировать до 6-х суток, затем

производили оценку их морфологического качества, при этом были получены следующие результаты (таблица 15).

На 6 сутки развития основную часть в 1-й и 2-й группе составили эмбрионы, не пригодные для последующей криоконсервации: неудовлетворительного качества – 51,1 % против 31,8 %, эмбрионы, остановившиеся в развитии - 15,5 % против 27,3 %.

Остальные 33,4 % в 1-й группе и 40,9 % во 2-й группе (отличного - 17,8 % и 7,6 %, хорошего - 8,9 % и 10,6 %, удовлетворительного качества - 6,7 % и 22,7 %) составили эмбрионы, которые в дальнейшем были криоконсервированы.

Из общего числа развившихся эмбрионов, пригодных для последующего переноса или криоконсервации в группе 1 (культивирование до и после 3-х суток в среде без GM-CSF) относились к пациенткам с нормальным ИМТ – 85,5%, остальные 14,5 % составили пациентки: с дефицитом массы тела - 6,6% и избыточной массой тела 7,9%. В группе 2 (культивирование до 3-х суток в среде с GM-CSF, затем до 5-х суток в среде без GM-CSF) основную часть составили пациентки с нормальным ИМТ, что составило 81,4%, 10% - с дефицитом массы тела и 8,6% - с избыточной массой тела.

В процессе анализа клинико-anamnestических данных пациенток была обнаружена взаимосвязь между наличием или отсутствием у них НГЭ и исходами стимуляции. Наличие НГЭ у пациенток не оказывало негативного влияния на качество ооцитов (рисунок 13), в то время как было выявлено негативное влияние НГЭ на морфологическое качество полученных эмбрионов в обеих группах. Однако в группе 2 с добавлением GM-CSF процентное соотношение развившихся эмбрионов отличного и хорошего качества было выше у пациенток с наличием НГЭ по сравнению с его отсутствием (рисунок 14, таблица 16).

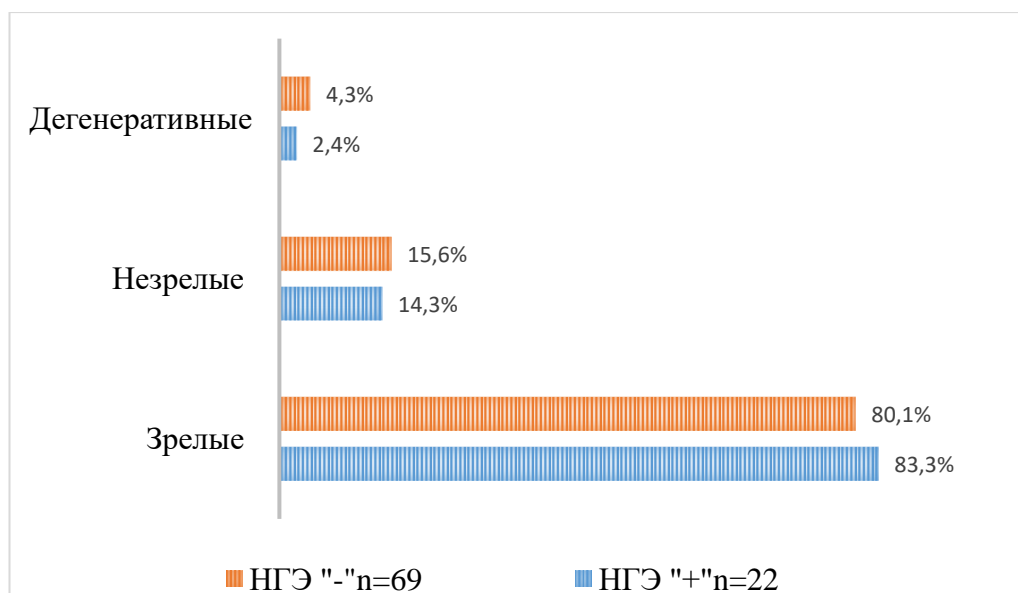


Рисунок 13. Качественное распределение ооцитов в зависимости от наличия или отсутствия НГЭ у исследуемых пациенток.

Таблица 16. Морфологическая характеристика качества эмбрионов на 5 сутки развития в группах сравнения в зависимости от наличия или отсутствия НГЭ у исследуемых пациенток.

Показатель	НГЭ «+»		НГЭ «-»		p, χ^2
	Группа 1 n =85	Группа 2 n =73	Группа 1 n =245	Группа 2 n =259	
Эмбрионы отличного качества	23,5% (n =20)	21,9% (n =16)	27,4% (n =67)	20,8% (n = 54)	p1 =0.810 p2= 0.088
Эмбрионы хорошего качества	15,3% (n = 13)	23,3% (n = 17)	11,8% (n = 29)	16,2% (n =42)	p1= 0.203 p2= 0.158
Эмбрионы удовлетворительного качества	5,9% (n =5)	2,8% (n =2)	7,4% (n =18)	9,7% (n = 25)	p1= 0.340 p2= 0.355
Эмбрионы неудовлетворительного качества	5,9% (n = 5)	6,8% (n = 5)	15,1% (n = 37)	15,8% (n=41)	p1= 0.804 p2= 0.821
Эмбрионы, остановившиеся в развитии	49,4% (n = 42)	45,2% (n = 33)	38,3% (n = 94)	37,5% (n = 97)	p1= 0.599 p2= 0.832

данные представлены как абсолютное число и %

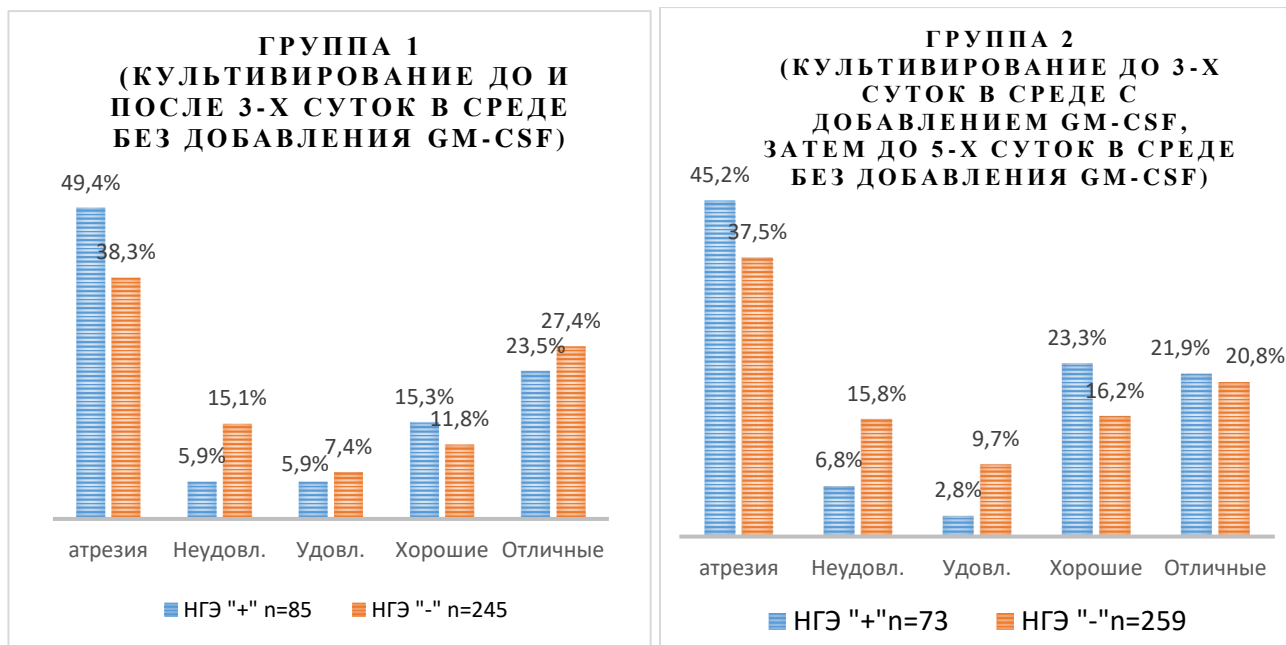


Рисунок 14. Морфологическая характеристика качества эмбрионов разных групп в зависимости от наличия или отсутствия НГЭ у исследуемых пациенток.

В группе с классическим культивированием была выявлена прямая взаимосвязь между морфологическим качеством эмбрионов и количеством попыток ЭКО в анамнезе (между отличным и неудовлетворительным качеством χ^2 , $p=0,034$), а также отсутствием беременностей в анамнезе (χ^2 , $p=0,011$).

Статистический анализ между группами в отношении морфологического качества эмбрионов не выявил значимых различий.

3.6 Эффективность программ ВРТ.

Данные о ЧНБ и исходах программ ВРТ в группах 1 и 2 в зависимости от цикла, в котором осуществлялся перенос эмбриона, представлены в таблице 17 и на рисунке 15.

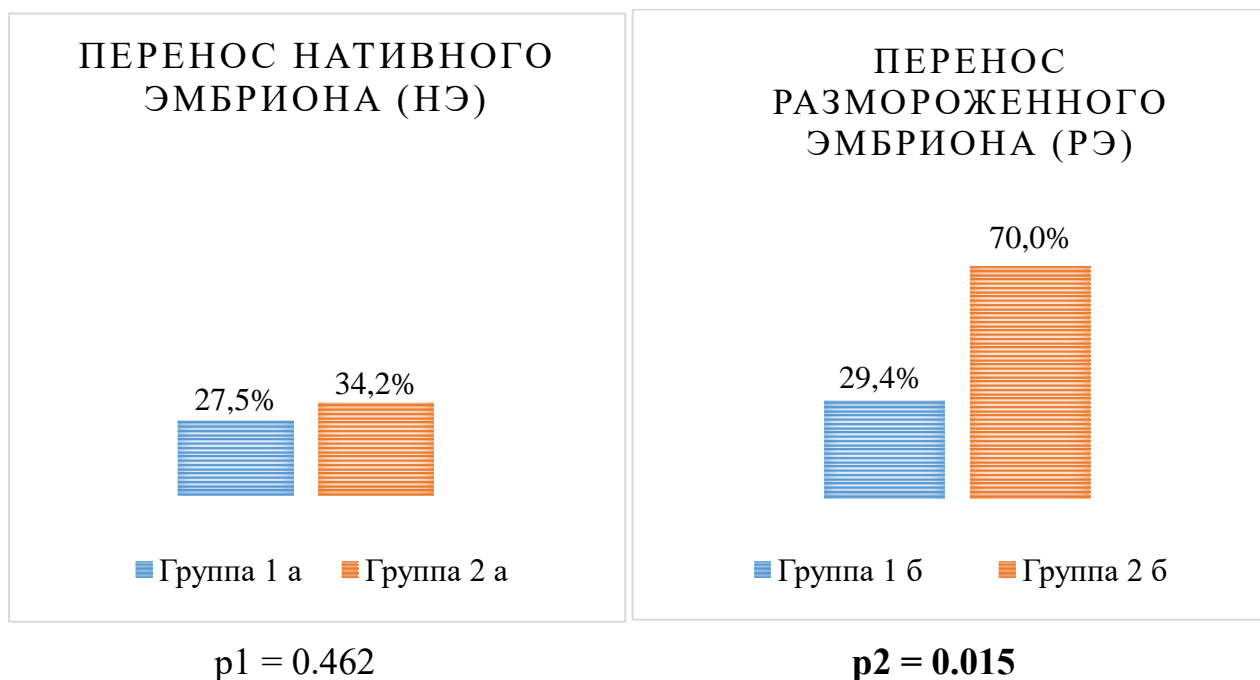


Рисунок 15. ЧНБ в группе 1 (без GM-CSF) и 2 (культивирование до 3-х суток в среде с добавлением GM-CSF, затем до 5-х суток в среде без GM-CSF) в зависимости от цикла, в котором производился перенос.

У пациенток группы 2 результатом культивирования эмбрионов в среде с GM-CSF в цикле стимуляции стало незначительное увеличение частоты наступления клинической беременности (ЧНБ) из расчета на перенос эмбриона (34,2 % против 27,5 %), а также значимое увеличение ЧНБ в криоцикле (70,0 % против 29,4 % при классическом культивировании).

Особо следует отметить увеличение частоты живорождения из расчета на количество наступивших беременностей – 92,3 % против 64,3% и отсутствие неразвивающихся беременностей при переносе нативных эмбрионов в группе 2 с добавлением GM-CSF по сравнению с группой 1. В цикле переноса размороженного эмбриона увеличение живорождения в группе 2 – 85,7 % против 60,0 % и снижение количества неразвивающихся беременностей до 14,3 % против 40,0 % в группе 1 (таблица 17).

Таблица 17. 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 (частота)	Цикл стимуляции (ПЭ)		Цикл переноса размороженного эмбриона (РЭ)		ОШ (95% ДИ)	p, χ^2
	Группа 1а n=51	Группа 2а n=38	Группа 1б n=17	Группа 2б n=20		
Биохимическая беременность из расчета на перенос эмбриона	2,0 % (n=1)	2,6% (n=1)	0 % (n=0)	0 % (n=0)	1,35 (0,08; 22,64) -----	p 1а-2а = 0,845 ---
Клиническая беременность из расчета на перенос эмбриона	27,5 % (n=14)	34,2 % (n=13)	29,4 % (n=5)	70,0 % (n=14)	1,37 (0,50; 3,76) 5,60 (1,13; 29,42)	p 1а-2а = 0,495 p 1б-2б = 0,015
Неразвивающаяся беременность из расчета на количество наступивших беременностей	28,6 % (n=4)	0% (n=0)	40,0 % (n=2)	14,3 % (n=2)	----- 4,0 (0,19; 72,55)	p 1а-2а = 0,040 p 1б-2б = 0,239
Эктопическая беременность из расчета на количество наступивших	7,1 % (n=1)	7,7 % (n=1)	0% (n=0)	0 % (n=0)	1,08 (0,01; 91,5) -----	p 1а-2а = 0,957 -----
Прогрессирующая беременность из расчета на количество наступивших	64,3 % (n=9)	92,3 % (n=12)	60,0 % (n=3)	85,7 % (n=12)	6,67 (0,56; 340,9) 4,00 (0,19; 72,55)	p1а-2а = 0,086 p 1б-2б = 0,239
Живорождение, из расчета на количество наступивших	64,3 % (n=9)	92,3 % (n=12)	60,0 % (n=3)	85,7 % (n=12)	6,67 (0,56; 340,9) 4,00 (0,19; 72,55)	p1а-2а = 0,086 p1б-2б = 0,239

Таблица 18. 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*** («-») n=37	Группа 1а*** («+») n=14	Группа 2а*** («-») n=25	Группа 2а*** («+») n=13	p1- p2-
Возраст, лет*	33 (29-35)	31,5 (29-33,75)	33 (31-34)	33 (31-35)	p1-0,263 p2-0,635
Возраст супруга, лет*	35 (31-38)	34 (30-36,8)	34 (32-36)	35 (34-39)	p1 < 0,05 p2 < 0,05
ИМТ	22,2 (21,0-24,2)	21,9 (20,8-23,8)	22,2 (20,4-24,6)	21,9 (21,2-23,9)	p1 < 0,05 p2 < 0,05
НГЭ I-II ст.**	18,9 % (n=7)	21,4 % (n=3)	20,0 % (n=5)	53,8 % (n=7)	p1-0,842 p2-0,036
Миома матки**	18,9 % (n=7)	7,1 % (n=1)	4,0 % (n=1)	23,1 % (n=3)	p1-0,307 p2-0,073
ФСГ*	6,28 (5,75-8,05)	5,98 (3,92-9,67)	6,71 (5,2-7,29)	6,36 (5,02-7,76)	p1-0,837 p2-0,963
ЛГ*	5,41 (4,49-6,17)	4,03 (3,4-6,1)	5,10 (4,20-6,63)	3,96 (5,02-7,56)	p1-0,084 p2-0,676
АМГ*	2,89 (2,13-4,55)	2,53 (1,2-5,11)	2,46 (1,87-4,69)	2,58 (2,26-3,68)	p1-0,688 p2-0,609
Суммарная доза Гн, МЕ*	1400 (1200-1537)	1350 (1025-1500)	1350 (1200-1500)	1350 (1050-1500)	p1-0,721 p2-0,327
Продолжительность стимуляции, дни*	9 (9-10)	9 (9-10)	9 (9-11)	9 (8-10)	p1 < 0,05 p2 < 0,05
ИКСИ**	91,9 % (n=34)	92,9 % (n=13)	100 % (n=25)	100 % (n=13)	p1-0,910

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

** данные представлены как абсолютное число и %, χ^2 -тест;

*** а – в цикле стимуляции

Таблица 19. 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*** («-») n=12	Группа 1б*** («+») n=5	Группа 2б*** («-») n=6	Группа 2б*** («+») n=14	p1- p2-
Возраст, лет*	32 (30-34)	33(32-34)	34 (33-35)	29 (28-34)	p1-0,768 p2-0,098
Возраст супруга, лет*	36 (32-40)	34 (33-35)	35,5 (32,8-36)	32,5 (32-38)	p1 < 0,05 p2 < 0,05
ИМТ*	22,2 (22,1-22,9)	22,2 (20,8-22,8)	21,8 (21,2-27,8)	21,8 (21,0-24,0)	p1 < 0,05 p2 < 0,05
НГЭ I-II ст.**	66,7 % (n=8)	0 % (n=0)	0 % (n=0)	14,3 % (n=2)	p1- 0,015 p2- 0,342
Миома матки**	16,7 % (n=2)	0 % (n=0)	16,7 % (n=1)	21,4 % (n=3)	p1- 1,000 p2- 0,812
Неразвивающаяся беременность в анамнезе**	33,3 % (n=4)	20 % (n=1)	50,0 % (n=3)	28,6 % (n=4)	p1- 0,594 p2- 0,370
ФСГ*	6,86 (5,30-8,70)	6,43 (5,88-7,29)	5,78 (5,07-6,93)	6,87 (6,47-8,56)	p1-0,953 p2-0,135
ЛГ*	5,15 (4,90-5,40)	5,91 (4,3-6,85)	6,23 (4,62-7,05)	5,53 (5,11-7,50)	p1-0,591 p2-0,678
АМГ*	2,84 (2,20-5,10)	1,78 (0,78-2,36)	2,78 (1,95-5,08)	3,27 (2,71-5,23)	p1-0,680 p2-0,678
Суммарная доза ГН, МЕ*	1350 (1050-1500)	1200 (1125-1500)	1237 (1087-1312)	1400 (1312-1462)	p1-0,859 p2-0,069
Продолжительность стимуляции, дни*	9 (8-11)	9 (9-11)	9 (8,25-9)	8 (8-9)	p1 < 0,05 p2 < 0,05
ИКСИ**	100 % (n=12)	100 % (n=5)	100 % (n=6)	100 % (n=14)	

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

** данные представлены как абсолютное число и %, χ^2 -тест;

*** б – в криоцикле

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 2 (с добавлением GM-CSF) в цикле переноса нативного эмбриона, а также значимое уменьшение ЧНБ в группе 1 (без добавления GM-CSF) в цикле переноса размороженного эмбриона. 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.

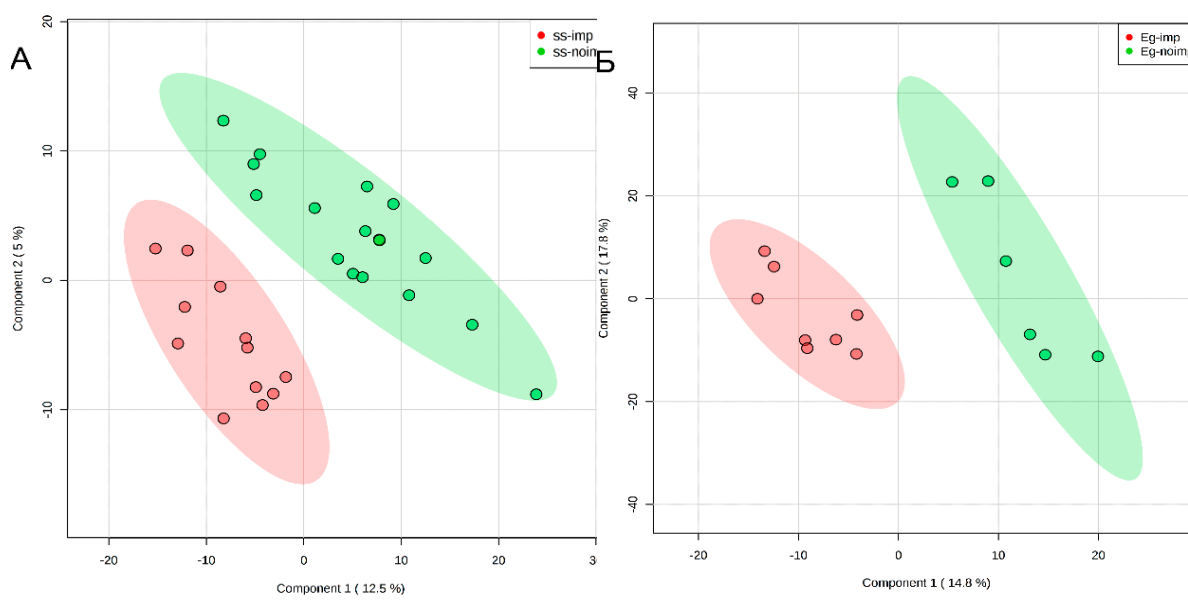
Помимо этого, возраст мужчин, включенных в исследование, а также показатели их спермограммы статистически достоверно не отличались между группами (таблица 19).

3.7 Ассоциация профиля метаболитов сред культивирования на 3-и и 5-е сутки культивирования с вероятностью наступления беременности.

Полученные эмбрионы у включенных в исследование пациенток были разделены на четыре класса в соответствии с морфологической оценкой на 3-и и 5-е сутки культивирования.

Анализ сред культивирования 3-х и 5-х суток развития, производился у эмбрионов «отличного» морфологического класса (3АА, 4АА, 5АА, 6АА), в среде, содержащей и не содержащей GM-CSF, у 43 пациенток в возрасте от 24 до 37 лет, проходящих программу ЭКО или ИКСИ, которым был осуществлен перенос эмбрионов в полость матки. Было исследовано 45 образцов 3-х суток культивирования и 42 образца 5-х суток культивирования.

С использованием ВЭЖХ-МС были получены наборы данных хроматографического разделения и детекции молекулярных ионов исследуемых образцов. После детекции хроматографических пиков и удаления шумовых сигналов, для уменьшения размерности многокомпонентных наборов, данных и для лучшей визуализации сравниваемых образцов по профилям метаболитов нами был проведен дискриминантный анализ методом частичных наименьших квадратов (PLS-DA) (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA).



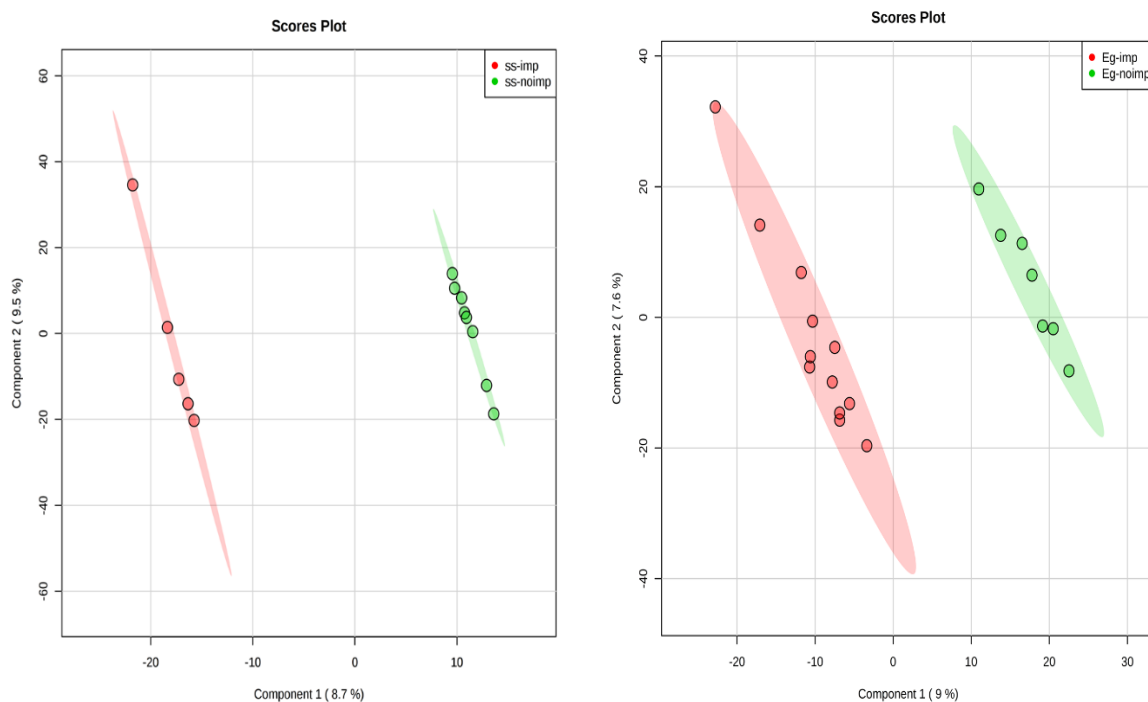
Гр. 1-3 (культивирование в среде без добавления GM-CSF) **Гр. 2-3** (культивирование в среде с добавлением GM-CSF)

Рисунок 16. Различия профилей метаболитов в питательных средах имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов, выявленные при помощи дискриминантного анализа (PLS-DA) на 3 сутки культивирования.

● - имплантация, ● - отсутствие имплантации.

После проведения статистического анализа PLS-DA нами были получены достоверные различия между сравниваемыми группами в зависимости от вида среды культивирования и исходов после переноса эмбриона в полость матки пациенток. Можно видеть, что во всех случаях происходит четкое

кластерирование групп имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов, как при использовании среды без добавления GM-CSF на протяжении 5 суток, так и при культивировании последовательно на средах с добавлением и без добавления GM-CSF. При этом на 3 сутки различия более выражены, что отражается в больших значениях величин главных компонент по сравнению с данными, полученными для сред 5-х суток культивирования (рисунки 16,17).



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)

Рисунок 17. PLS-DA. Различия профилей метаболитов в питательных средах на 5 сутки культивирования.

● - имплантация, ○ - отсутствие имплантации.

По результатам проведенного многомерного статистического анализа были сформированы списки молекулярных ионов в каждой из четырёх исследуемых

групп, которые в наибольшей степени обуславливали наблюдаемые межгрупповые различия. Так же была проведена первичная идентификация возможных метаболитов с соответствующими молекулярными массами с использованием базы данных HMDB, KEGG. В результате был получен ряд потенциальных молекулярных маркеров с различным уровнем представленности в группах с успешной и неуспешной имплантацией (таблицы 20, 21). Кратность изменений каждого метаболита определялась с помощью пакета Progenesis Q1.

Таблица 20. Списки метаболитов на 3 сутки культивирования, идентифицированных по базам данных HMDB, KEGG.

Гр.1-3 (без добавления GM-CSF, 3 сут.)			Гр.2-3 (с добавлением GM-CSF, 3 сут.)		
Название	KEGG индекс	Кратность	Название	KEGG индекс	Кратность
Ретиноевая 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	Дигидротестостерон	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

Так, в группе 1-3 - на 3 сутки культивирования в средах без добавления GM-CSF у имплантировавшихся эмбрионов наблюдалось изменение представленности потенциальных метаболитов: ретиноевая кислота (кратность изменения - 1,28), гамма-линоленовая кислота (1,28), арахидоновая кислота

(1,24), пиридоксаль (1,28), фенилацетальдегид (1,25), L-аланин (1,21), андростерон (1,41) были выше по сравнению со средами у неимплантировавшихся эмбрионов.

Далее на 5 сутки культивирования в средах без добавления GM-CSF в Гр. 1-5 были выявлены следующие изменения содержания кандидатных веществ: отмечено снижение L-фенилаланин (1,2), L-глутамат (2,25), фенэтиламин (3,88), пироглутамовая кислота (2,25), молочная кислота (15,84), гидроксипропионовая кислота (15,84), простагландин G2 (1,85) у имплантировавшихся по сравнению с неимплантировавшимися эмбрионов, с одновременным увеличением L-триптофан (1,18), полуальдегид 2-аминомуконовой кислоты (2,8), индолацетальдегид (1,8), 4-пипридоксиновая кислота (1,26).

При анализе группы 2-3 – среда, содержащая GM-CSF на 3 сутки культивирования у имплантировавшихся эмбрионов, наблюдалось увеличение представленности следующих потенциальных метаболитов: фенилпируват (2,57), фенилуксусная кислота (1,63), андростерон (2,05), дигидротестотерон (2,05), S-аденозил-метионинамин (1,5), простагландин G2 (1,75), 4-гидроксифенилацетальдегид (1,63).

На 5 сутки в группе 2-5 – среда без добавления GM-CSF у имплантировавшихся эмбрионов отмечено увеличение представленности фенилпируват (1,75), 2-гидроксифенилацетат (4,97), L-аргинин (1,35), фосфокреатин (5,6), пальмитиновая кислота (1,36), стеариновая кислота (2,87), гамма-линолевая кислота (1,36), альфа-линолевая кислота (1,36), стеарионовая кислота (1,5), сфинганин (1,66), фитосфингозин (3,63), L-гулонат (1,17), ретиноевая кислота (7,04) и снижение линолевая кислота (21,4), простагландин G2 (2,27), миристиновая кислота (3,86), дигомо-гамма-линолевая кислота (4), L-серин (5,57) по сравнению со средами неимплантировавшихся эмбрионов.

Таблица 21. Списки метаболитов на 5 сутки культивирования, идентифицированных по базам данных HMDB, KEGG.

Гр.1-5 (без добавления GM-CSF, 5 сут.)			Гр.2-5 (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
Гидроксипропионовая 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
			Стеарионовая кислота	c16300	+ 1,5
			Простагландин G2	c05956	- 2,27
			Сфинганин	c00836	+ 1,66
			Фитосфингозин	c12144	+ 3,63
			L-гулонат	c00800	1,17
			Ретиноевая кислота	c00777	7,04

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 В6, метаболизм бета-аланина, метаболизм ретинола, метаболизм альфа-линоленовой кислоты, метаболизм фенилаланина, метаболизм глицина, серина и треонина, биосинтез стероидных гормонов) (рисунок 18). При этом наблюдалось изменение разных метаболитов для каждого пути в соответствующей группе.

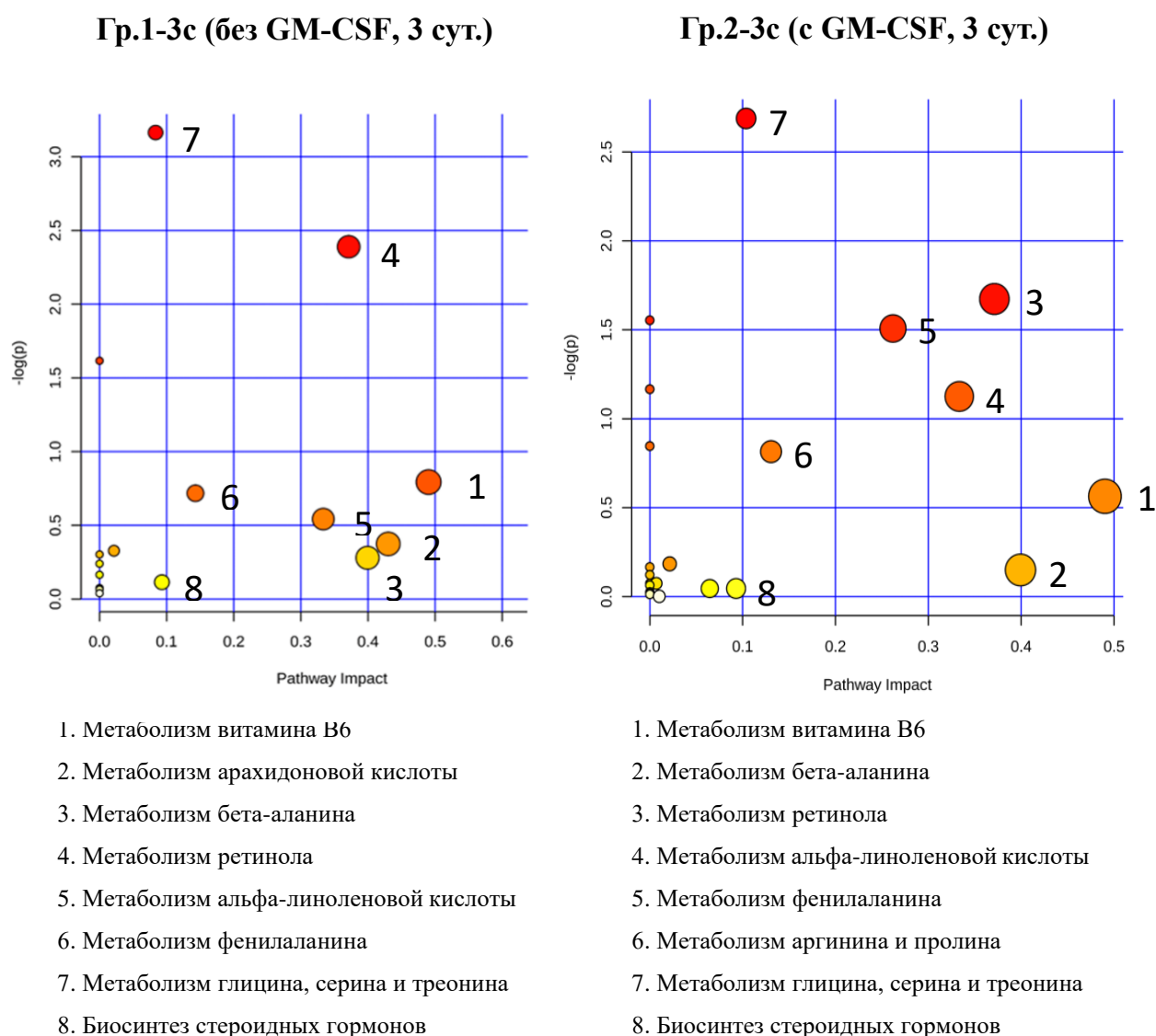
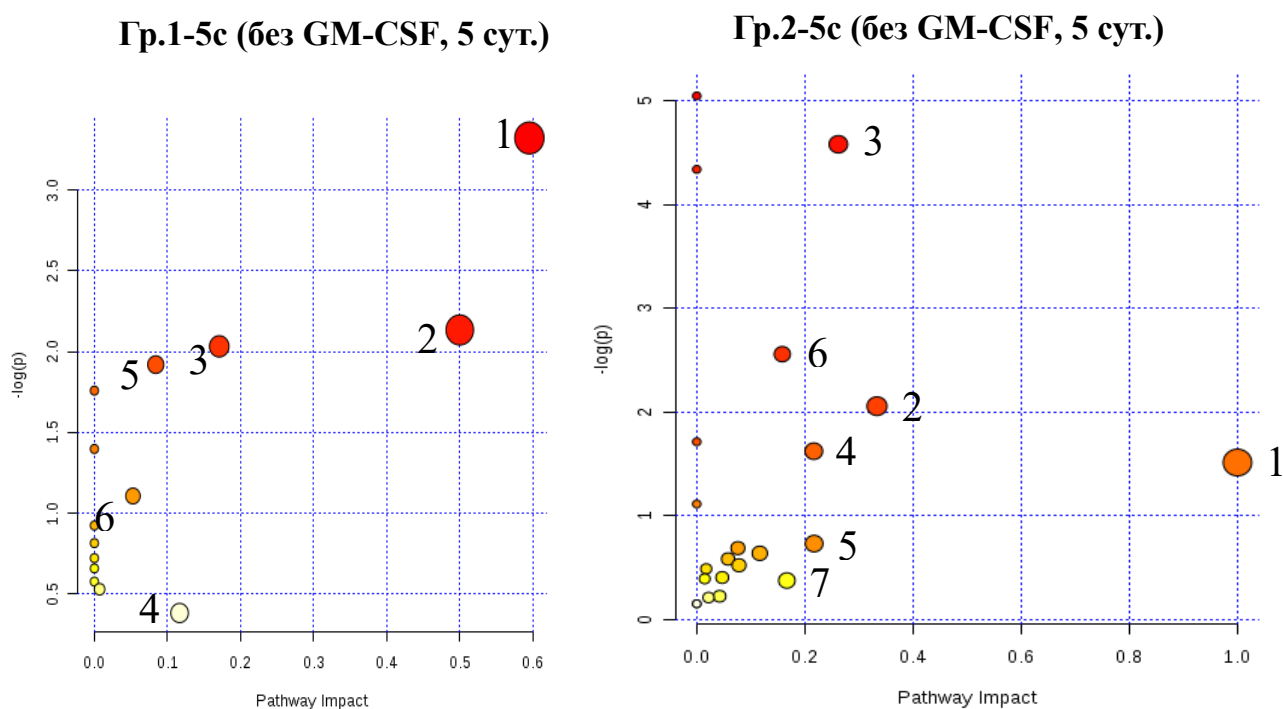


Рисунок 18. Анализ потенциальных путей биосинтеза и метаболизма, включающих выявленные в питательных средах метаболиты на третьи сутки культивирования.

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, в состав которой добавлен GM-CSF (рисунок 19).



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

Рисунок 19. 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.

3.8 Ассоциация уровня потребления глюкозы эмбрионов в разных средах культивирования с вероятностью наступления беременности.

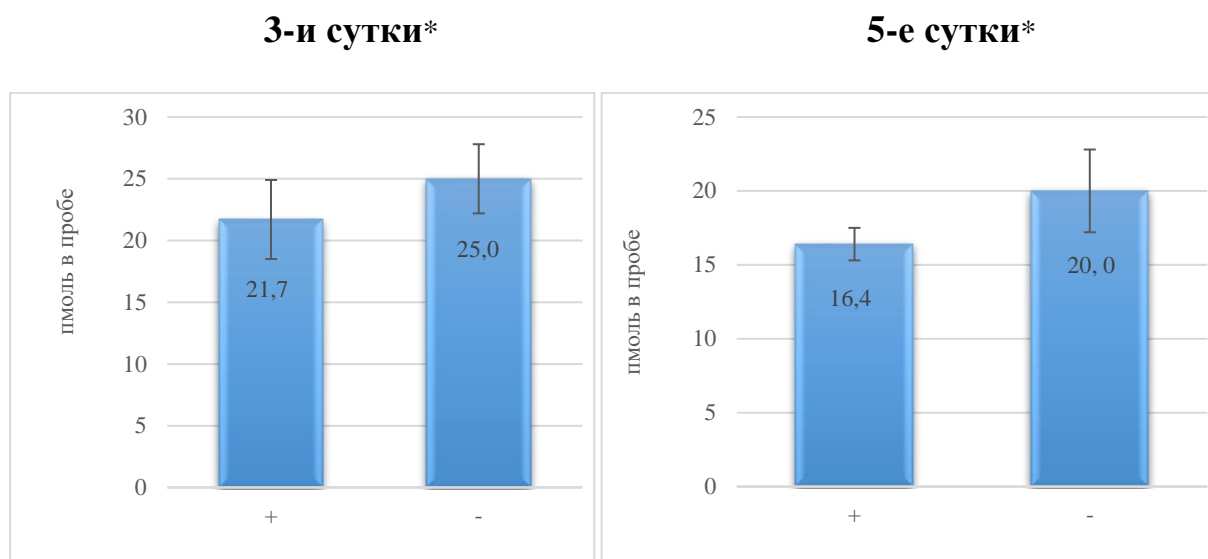
Так же нами проведен анализ изменения уровня глюкозы в культуральных средах на 3-и и 5-е сутки развития эмбрионов «отличного» морфологического качества в зависимости от среды культивирования (с добавлением GM-CSF или без добавления GM-CSF) и частоты последующей имплантации.

Таблица 22. Оценка содержания глюкозы в культуральных средах эмбрионов группы 1 на 3-и и 5-е сутки развития.

Сутки	Среда без добавления GM-CSF		p
	Имплантация +	Имплантация -	
3-и*	21,7±3,17	25±1,75	0,048
5-е*	16,4±1,11	20±2,78	0,032

*данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; содержание глюкозы пмоль в пробе; в группе 1 культивирование до 3-х и 5-х суток проводили 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±3,17 пмоль в пробе, для неимплантировавшихся эмбрионов 25,03±1,75 (критерий Манна-Уитни, $p = 0,048$), на 5 сутки для имплантировавшихся эмбрионов - 16,4±1,11, для неимплантировавшихся эмбрионов 20 ±2,78 ($p = 0,032$) (рисунок 20, таблица 22).



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

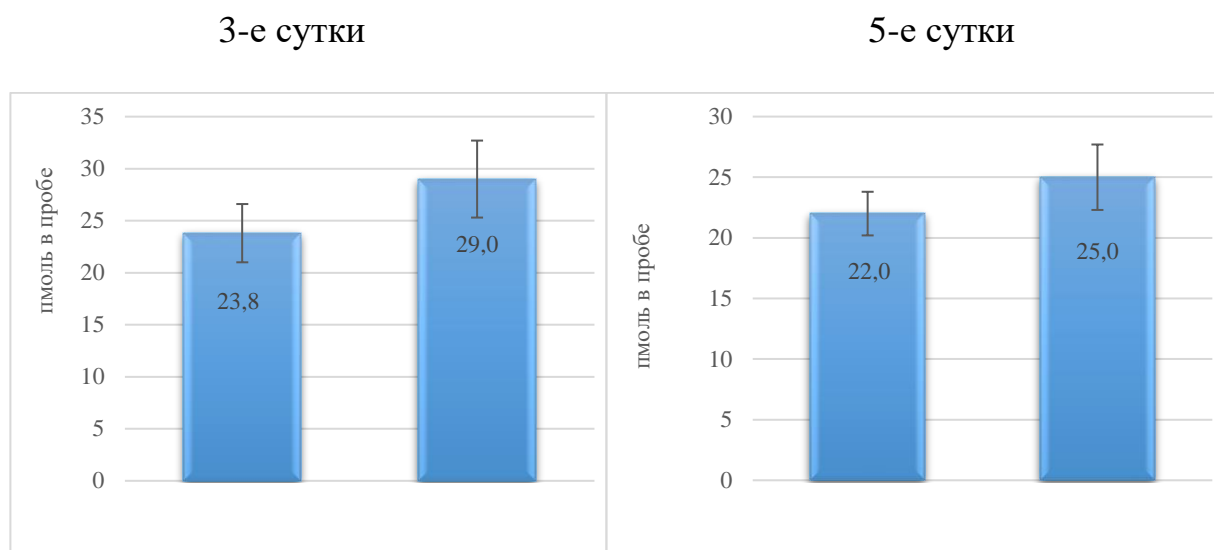
Рисунок 20. Изменение содержания глюкозы в питательных средах имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов группы 1 на 3-и и 5-е сутки культивирования (до и после 3-х суток в среде без добавления GM-CSF).

Таблица 23. Оценка содержания глюкозы в культуральных средах эмбрионов группы 2 на 3-и и 5-е сутки развития.

Сутки	Имплантация +	Имплантация -	p
3-и*	23,8 \pm 2,79	29 \pm 3,69	0,04
5-е*	22 \pm 1,83	25 \pm 2,72	0,05

*данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение; содержание глюкозы ммоль в пробе; в группе 2 культивирование до 3-х суток в среде с добавлением GM-CSF, затем до 5-х суток в среде без добавления GM-CSF.

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 ммоль в пробе, для неимплантировавшихся эмбрионов 29 \pm 3,69 (p = 0,04), на 5 сутки имплантировавшихся эмбрионов - 22 \pm 1,83, для неимплантировавшихся 25 \pm 2,72 (p = 0,05) (рисунок 21, таблица 23).



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

Рисунок 21. 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).

В результате исследования было установлено, что вне зависимости от использованной культуральной среды, наблюдается увеличение потребления глюкозы на 3-и и 5-е сутки развития у эмбрионов с повышенным потенциалом к имплантации.

Таким образом, уровень потребления глюкозы эмбрионами из культуральных сред может служить критерием последующей успешной имплантации.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

У большинства супружеских пар репродуктивного возраста, столкнувшихся с такой проблемой как невозможность зачатия желанного ребенка, единственной возможностью достижения беременности является применение ВРТ.

Несмотря на последние достижения в этой области, частота наступления беременности достигла определенного предела и на протяжении многих лет не имеет значимой тенденции к росту. Эффективность ВРТ зависит от таких факторов, как состояние овариального резерва пациентки, ее возраста, причины бесплодия, наличия сопутствующих гинекологических (морфологическое состояние эндометрия в период «окна имплантации», своевременное выявление различных внутриматочных патологий) и соматических заболеваний [17, 22, 23, 156, 157].

В женском репродуктивном тракте эмбрионы подвергаются воздействию различных цитокинов и факторов роста, которые играют значительную роль в регуляции нормального эмбрионального развития, способствуют имплантации эмбриона и впоследствии обеспечивают оптимальное развитие плода и плаценты [158-160]. Выявлено более десятка различных ростовых факторов (активин А, инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), колониестимулирующие факторы: GM-CSF, макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF-2), фактор, ингибирующий лейкемию (LIF), фактор роста фибробластов, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и другие, которые, как правило, достигают пиковых концентраций к моменту оплодотворения и преимплантационному росту эмбриона. Дефицит и нарушение их секреции могут приводить к снижению качества эмбрионов, последующим неудачам имплантации, а также потерям беременности в первом триместре [42,161-163].

Культуральные среды играют значимую роль в успешном взаимодействии гамет *in vitro*, их состав и качество могут существенно повлиять на последующее

развитие эмбриона. В связи с этим было высказано предположение о том, что добавление в культуральные среды цитокинов и факторов роста, присутствующих в репродуктивном тракте, для нормализации процессов роста и развития эмбриона *in vitro*, может улучшить результаты ЭКО. Данные, полученные в исследованиях на эмбрионах животных, а также положительный опыт клинических зарубежных исследований подтолкнули исследователей к созданию среды, в состав которой входит GM-CSF. Были проведены исследования, в которых изучали эффективность добавления GM-CSF в культуральную среду, при этом отмечалось ускоренное развитие эмбриона, повышение процентной доли ранних дроблений, последующее более частое развитие до стадии бластоцисты лучшего качества (увеличение их внутренней клеточной массы и снижение активности процессов апоптоза) [64, 65].

Вышеуказанные сведения легли в основу данного исследования, целью которого было оценить эффективность применения культуральной среды, содержащей в своем составе гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе. На первом этапе работы мы проанализировали клинико-анамнестические данные включенных в исследование пациенток, провели анализ параметров оо- и эмбриогенеза, а также эффективность программ ВРТ.

Средний возраст включенных в исследование пациенток составил $31,9 \pm 3,3$ лет. При анализе антропометрических данных было выявлено, что средний рост пациенток был $164,8 \pm 6,0$ см, вес - $60,9 \pm 7,9$ кг, ИМТ - $22,4 \pm 2,9$ кг/м², 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, менструации -5 дней.

Проанализированные данные о типе бесплодия показали незначительное преобладание вторичного бесплодия 59,3 % (n=54), при этом средняя продолжительность бесплодия составила 5 лет (от 1 года до 16 лет).

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

Гипотеза о том, что эндометриоз приводит к снижению фертильности или бесплодию, до настоящего времени остается все еще противоречивой. В то же время не вызывает сомнений наличие взаимосвязи между эндометриозом и бесплодием [164].

При эндометриозе среди выявленных молекулярных механизмов бесплодия необходимо отметить многоуровневое негативное влияние эндометриоза на такие последовательные этапы как формирование фолликулов и ооцитов, процесс оплодотворения, ранний эмбриогенез и последующая имплантация. Фолликулогенез при наличии НГЭ характеризуется нарушениями стероидогенеза, присутствием достаточно большого количества иммунокомпетентных клеток таких как, В-лимфоциты, НК-клетки, с измененным соотношением моноцитов – макрофагов, а также синтеза простагландинов. Провоспалительные изменения фолликулярной жидкости оказывают свое влияние на оогенез, при этом отмечается удлинение фолликулиновой фазы, уменьшение размеров доминантного фолликула и активация апоптоза клеток кумулюса [165].

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 13), однако выявлено негативное влияние на морфологическое качество полученных эмбрионов, что согласуется с другими ранее проведенными исследованиями [164-167]. 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 14).

Затем мы проанализировали влияние эндометриоза на ЧНБ, влияние которого доказано во множестве исследований [168-170]. Проведенный нами анализ выявил значимое увеличение ЧНБ у пациенток с наличием НГЭ в группе 2 (с добавлением GM-CSF) в цикле переноса нативного эмбриона, а также значимое уменьшение ЧНБ в группе 1 (без добавления GM-CSF) в цикле переноса размороженного эмбриона.

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 в среде без GM-CSF).

В литературе присутствуют противоречивые данные о влиянии добавления в среду GM-CSF на морфологическое качество эмбрионов [92, 96, 98, 100, 148, 171]. Нами получены данные, что частота формирования морулы и бластоцисты практически не различалась в группах сравнения (таблицы 13,14,15). 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).

Помимо влияния на потенциал развития эмбрионов, GM-CSF также влияет на исход беременности, при этом уменьшается количество неразвивающихся беременностей и ранних преэмбрионических потерь.

Проведенный нами анализ эффективности ВРТ у пациенток при использовании разных сред культивирования показал, что в группе 2 результатом культивирования эмбрионов в среде с GM-CSF стало незначительное увеличение ЧНБ в цикле переноса нативных эмбрионов (34,2%

против 27,5%), однако наблюдалось значимое увеличение ЧНБ в цикле переноса РЭ (70,0% против 29,4%).

Полученные нами данные согласуются с результатами предыдущих клинических исследований, в которых описывается, что при культивировании эмбрионов в среде с добавлением GM-CSF увеличивается ЧИ [92, 97, 98, 172].

Проведенное ранее ретроспективное исследование с применением среды, содержащей в своем составе GM-CSF и контрольной среды без добавления GM-CSF, включало 350 пациенток, средний возраст которых составил $38,4 \pm 3,6$ и $38,9 \pm 3,6$ лет, с неудачными попытками ВРТ или неразвивающейся беременностью в анамнезе. Перенос эмбрионов проводили на 3-й день культивирования. Было установлено что показатели ЧНБ были одинаковыми: 20,3% (29/143) и 18,8% (36/192) в группе с GM-CSF и контрольной группах соответственно. Однако, в группе с GM-CSF наблюдали более низкий уровень прерывания беременности до 12-й неделе беременности из расчета на перенос эмбрионов в полость матки (13,8% против 44,4%), что в результате привело к более высокой частоте родов (19,5% против 9,5) [173].

Так же в результате применения среды, содержащей GM-CSF для культивирования эмбрионов, у 31 пациентки средний возраст которых составил $35,7 \pm 4,6$ лет с неудачными попытками ВРТ (от 1 до 13 неэффективных попыток в анамнезе), беременность наступила у 14 (45,2%) пациенток, частота имплантации составила 23,8%. Все беременности оказались одноплодными. У двух пациенток из 14 была диагностирована неразвивающаяся беременность на сроке 8-9 недель. Недостатком данного исследования было отсутствие разделения на группы, их малочисленность и отсутствие указания на какие сутки был произведен перенос эмбриона в полость матки [172].

Улучшение результативности ЭКО для пациенток с наличием в анамнезе неудачных попыток могут быть объяснены следующим образом: GM-CSF воздействует на морфологически нормальные, а не на морфологические аномальные эмбрионы [95], обеспечивает регуляцию иммунологических процессов, приводя к последующей имплантации бластоцисты, обеспечивая

правильное развитие плаценты и в дальнейшем - прогрессирование клинической беременности [173].

В исследовании Perricone R. было показано, что у пациенток с привычным невынашиванием наблюдался пониженный уровень GM-CSF в периферической крови во время беременности, что может быть связано у таких пациенток со снижением способности синтезировать данный цитокин [89].

Наличие исходных иммунных дисфункций может стать серьезной причиной развития ооцитов более низкого качества, дефектов их оплодотворения и последующего нарушения развития эмбрионов, что, в конечном итоге, приводит к отсутствию беременности или ее потерям на ранних сроках развития. GM-CSF является одним из регуляторов взаимодействия между трофобластом, дендритными, эпителиальными клетками эндометрия и эндометриальными лейкоцитами, представленными маточными натуральными киллерами (uNK), макрофагами и Т-клетками, тем самым способствует иммунной толерантности материнского организма по отношению к эмбриону. Недостаточная продукция GM-CSF может нарушать имплантацию как при естественной беременности, так и при использовании методов ВРТ [65].

Учитывая вышеизложенное, был разработан алгоритм по ведению пациенток с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

Перенос меньшего количества эмбрионов привел к тому, что большее количество эмбрионов стало доступно для последующей криоконсервации. Перенос свежих эмбрионов в настоящее время является наиболее часто используемым методом ЭКО, хотя многие проведенные исследования показывают, что беременности, возникающие в результате переноса криоконсервированных/размороженных эмбрионов, имеют лучшие акушерские и перинатальные исходы [174-176].

На следующем этапе работы, оценивали профиль метаболитов в классических средах и с применением GM-CSF, нами были отобраны образцы сред третьего и пятого дней культивирования эмбрионов, относящихся к

“отличной” категории согласно «модифицированной» классификации Gardner D. (ESHRE, 2011).

Сочетание ВЭЖХ и масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) позволяет разделять молекулярные компоненты культуральной среды и с высокой точностью определять их молекулярные массы. Определение параметров хроматографической подвижности, площадей хроматографических пиков и значений молекулярных масс соединений дает возможность для первичной идентификации компонентов культуральных сред и их относительной представленности в сравниваемых группах. Данный метод может обеспечить высокую специфичность и чувствительность, идентифицировать, а также дать количественную оценку метаболитам в широком диапазоне молекулярных масс.

Заслуживает внимание тот факт, что 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.

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. Нами был проведен анализ метаболических путей, в которых могут принимать участие потенциальные метаболиты. Было выявлено изменение содержания некоторых аминокислот: аланина, триптофана, серина и аргинина и

ряда их производных. Ранее в работе Houghton FD было показано, что в питательных средах эмбрионов человека на разных стадиях их развития *in vitro* изменялось содержание выше представленных аминокислот. По их мнению, оценка изменения содержания комбинации аминокислот может выступать в качестве предиктора их способности достигнуть развития до стадии бластоцисты [15].

Также нами было выявлено изменение содержания таких аминокислот как: фенилаланин и ее производных: фенилацетальдегид, фенилуксусная кислота, 4-гидроксифенилацетальдегид и фенилпируват на 3-и и 5-е сутки культивирования как в первой, так и во второй группе. Данное наблюдение может быть свидетельством важной роли метаболических превращений фенилаланин в эмбриональном развитии, поскольку эта аминокислота, помимо участия в синтезе белков, является предшественником для синтеза катехоламинов, косубстратом для интерконверсии других аминокислот и может участвовать в энергетическом обмене.

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. Так же нами были выявлены сходные метаболические превращения, связанные с метаболизмом витамина B6, ретинола, аланина, фенилаланина, альфа-линоленовой кислоты и стероидных гормонов (рисунок 18), как при культивировании в среде без добавления GM-CSF, так в среде с добавлением GM-CSF, что может свидетельствовать об их существенном вкладе в развитие эмбриона на данном сроке культивирования. Полученные данные подтверждаются результатами ряда работ, где было показано наличие ассоциации процессов обмена витаминов и аминокислот с нормальным фенотипом эмбрионов [152, 177].

На 5-е сутки в средах культивирования наблюдалось значительное повышение количества метаболитов, о чем свидетельствует увеличение списка метаболических путей. Обращает на себя внимание смещение метаболической активности в сторону метаболизма аминокислот и моносахаров у эмбрионов, в группе 1, которые культивировались в среде без добавления GM-CSF. Данное наблюдение представляется закономерным, поскольку используемая среда содержит глюкозу и полный набор заменимых и незаменимых аминокислот. В группе 2 также наблюдалось обогащение по путям превращения аминокислот, однако обращало на себя внимание обогащение по путям биотрансформации жирных кислот.

Можно предположить, что культивирование эмбрионов в течение первых трех суток в среде с пониженным по составу и количеству содержанием аминокислот, а также в присутствии GM-CSF переключает метаболические пути на синтез и превращение жирных кислот, что может выступать в качестве положительного фактора в успешности имплантации.

Жирные кислоты играют важную роль как структурные компоненты различных липидов, субстраты для энергетического обмена [178], а также являются предшественниками различных медиаторов, в частности простагландинов, которые участвуют в процессах развития и дифференцировки. Как недавно было показано, GM-CSF способствует дифференцировке Т-лимфоцитов за счет регуляции активности циклооксигеназы-2 и продукции простагландина E2 [179].

В нашей работе наблюдалось преимущественное снижение содержания простагландина G2 (PGG). Снижение данного эйкозаноида может быть связано как со снижением его продукции, так и с усилением его утилизации. Известно, что PGG после образования быстро конвертируется циклооксигеназами в другой простагландин H (PGH), который является предшественником большинства простагландинов. Таким образом, повышение содержания PGG может свидетельствовать о снижении

активности циклооксигеназы и возможному снижению синтеза простагландинов. Ранее было показано, что простагланины синтезируются клетками бластоцисты, а нарушение продукции этих эйкозаноидов приводит к падению способности к имплантации [180]. Таким образом, снижение утилизации общего предшественника простагландинов PGG и увеличение его содержания в питательных средах на стадии бластоцисты может быть одним из потенциальных маркеров исхода имплантации.

В недавно проведенной работе А. Yagi. с помощью анализа ВЭЖХ-МС свободных жирных кислот в культуральных средах эмбрионов 5-х суток культивирования разделение производили на две группы в зависимости от их морфологических характеристик. Авторы показали достоверное снижение содержания свободных жирных кислот в средах эмбрионов с лучшими морфологическими характеристиками [181]. Однако, в данной работе не проводилась оценка взаимосвязи между содержанием жирных кислот в питательной среде и имплантационным потенциалом культивируемых эмбрионов. Таким образом, анализ жирных кислот и их метаболитов может быть одним из подходов для оценки имплантационного потенциала.

Следует отметить, что списки идентифицированных метаболитов отличались в анализируемых группах, однако при анализе метаболических путей отмечено значительное совпадение биохимических процессов (рисунок 18, 19), что свидетельствует о том, что идентифицированные метаболиты в группах эмбрионов, культивировавшихся в разных питательных средах, входят в состав одних и тех же путей биохимических превращений. Это, в свою очередь, свидетельствует в пользу значимости данных путей в формировании эмбрионального фенотипа с повышенным имплантационным потенциалом. Полученный результат показывает, что для выявления списка специфических маркеров, необходимо учитывать состав инкубационной среды, в которой проводилось культивирование. Тем не менее, проведенное метаболомное профилирование указывает на то, что вне зависимости от использованных

питательных сред, имеются достоверные отличия в их молекулярном составе, позволяющие дифференцировать группы имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов как на третьи, так и на пятые сутки культивирования.

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 без него) в программе ЭКО или ИКСИ в зависимости от уровня потребления глюкозы в культуральных средах (таблицы 22,23; рисунки 20,21).

Полученные нами данные свидетельствуют о статистически значимых различиях в потреблении глюкозы между имплантировавшимися эмбрионами как в 1-й, так и во 2-й группе по сравнению с неимплантировавшимися эмбрионами в тех же группах, которые потребляли глюкозы меньше.

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).

Однако, нами отмечено более высокое потребление глюкозы на 3-и и 5-е сутки в среде без добавления GM-CSF по сравнению со средой с добавлением GM-CSF.

Эти данные, полученные нами, не согласуются с результатами предыдущего исследования, проведенного Robertson S. на мышинных эмбрионах, в котором описывается, что культивирование до стадии бластоцисты с рекомбинантным GM-CSF вызывало 50% увеличение поглощения неметаболизируемого аналога глюкозы-3-О-метил глюкозы [148]. Это может быть связано с разными методами анализа потребления глюкозы, а также с видовой специфичностью исследуемых эмбрионов.

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

Успешная имплантация зависит от множества факторов. Так повышение ЧНБ при наличии в среде культивирования GM-CSF указывает на роль факторов роста и других биоактивных соединений в процессе подготовки эмбриона к имплантации. Дальнейшее изучение роли различных факторов роста и цитокинов на ранних этапах развития эмбрионов позволит выявить новые подходы для повышения эффективности исходов в программах ВРТ.

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 сокращений и условных обозначений

АМГ - антимюллеров гормон

антГнРГ - антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона

ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВПЧ – вирус папилломы человека

ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон

ДГЭАС - дегидроэпиандростерон-сульфат

ДИ – доверительный интервал

Е2 - эстрадиол

17-ОП – 17-оксипрогестерон

ЗППП - заболевания, передающиеся половым путем

ИКСИ - (от англ.-intracytoplasmic sperm injection, ICSI)

интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит

ИМТ- индекс массы тела

К- кортизол

ЛГ – лютеинизирующий гормон

НГЭ - наружный генитальный эндометриоз

ОКК - ооцит-кумулюсные комплексы

ОШ - отношение шансов

П - прогестерон

ПГТ-А - преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии

ПНИ -повторные неудачи имплантации

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЭ - перенос эмбриона

рФСГ - рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон

СТГ – соматотропный гормон

Т – тестостерон

Т4св - свободный тироксин

ТВП – трансвагинальная пункция яичников

ТТГ - тиреотропный гормон

УЗИ - ультразвуковое исследование

ФСГ - фолликулостимулирующий гормон

ХГЧ - хорионический гонадотропин человека

ХГ - человеческий хорионический гонадотропин

чМГ - человеческий менопаузальный гонадотропин

ЧНБ - частота наступления клинической беременности

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zeyneloglu, H. B. [et al.] / Remedies for Recurrent Implantation Failure. // *Semin Reprod Med* – 2014 - 32(04)- P.297-305.
2. Tehraninejad ES. [et al.] / The sequential embryo transfer compared to blastocyst embryo transfer in in vitro fertilization (IVF) cycle in patients with the three repeated consecutive IVF. A randomized controlled trial. // *Gynecol Endocrinol.*- 2019 – 15-P.1-5.
3. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP et al. ESHRE PGD Consortium “Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS).” *Hum Reprod.* 2005;20(1):35–48
4. М.Б. Аншина, Н.В.. Долгушина, Ю.А.. Колода, В,С. Корсак, В.М.. Савина, А.А. Смирнова Терминология вспомогательных репродуктивных технологий: международный глоссарий проблемы репродукции 2019, т. 25, № 1, с. 6-15 <https://doi.org/10.17116/repro2019250116>
5. Malina A [et al.] / Psychological consequences of IVF fertilization – Review of research. // *Ann Agric Environ Med* – 2017 - 24(4): 554–558.
6. Chronopoulo E. [et al.] / IVF culture media: past, present and future. // *Hum Reprod Update* – 2015-21:39–55.
7. Bergh C. / Single embryo transfer: a mini-review. // *Hum Reprod* -2005- N 2 – P. 323 – 327.
8. Gardner DK. [et al.] / Diagnosis of human preimplantation embryo viability. // *Hum Reprod Update* – 2015 – 21 – P. 727–747.
9. Cimadomo D. [et al.] / The impact of biopsy on human embryo developmental potential during preimplantation genetic diagnosis. // *Biomed Res Int* - 2016 Article - ID 7193075, 10 pages.
10. Chen M. [et al.] / Can comprehensive chromosome screening technology improve IVF/ICSI outcomes? A meta-analysis. // *plos One* - 2015 -21.
11. Munne S. [et al.] / Chromosome mosaicism in human embryos. // *Biol Reprod* -1994 – 51- P. 373–379.

12. Nel-Themaat L. [et al.] / A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. / *Placenta* – 2011- 32(Suppl 3) – P. 257–263.
13. Tabiasco J. [et al.] / Soluble HLA-G in IVF/ICSI embryo culture supernatants does not always predict implantation success: a multicentre study. // *Reprod. Biomed. Online* -2009 - Vol.18 (3) - P. 374–381.
14. Gardner DK. [et al.] / Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. // *Fertil Steril* 2001- 76- P.1175–80.
15. Houghton FD. [et al.] / Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. // *Hum Reprod* - 2002-17- P.999–1005.
16. Zegers-Hochschild F [et al.] / The International Glossary on Infertility and Fertility Care. // *Fertil Steril* 2017-108:393–406, Published simultaneously in: *Hum. Reprod* 2017 -32:1786–801.
17. Бесплодие и возраст. Пути решения проблемы. / Под ред. Т.А. Назаренко., Мишеева Н.Г. // М.: медпресс-информ - 2014. – 7 с.
18. Kjelberg A. [et al.] / Randomized single versus double embryo transfer: obstetric and paediatric outcome and a cost-effectiveness analysis. // *Hum Reprod* – 2006 - vol. 21 (pg. 210-216).
19. Kallen B [et al.] / Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years. // *Hum Reprod* – 2010 - vol. 25 (pg. 1026-1034).
20. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Multiple gestation associated with infertility therapy. / *Fertil Steril* – 2012 – 97- 825–34.
21. Sullivan E.A. [et al.] / Single embryo transfer reduces the risk of perinatal mortality, a population study. // *Hum Reprod* 2012 – 27 - 3609–15.
22. Махмадалиева М.Р и др. / Влияние избытка массы тела и ожирения на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий // *Журнал акушерства и женских болезней* - 2018. - Т. 67.- № 2. - С. 32–39.

23. Серебренникова К.Г. др. Подготовка к ВРТ и тактика ведения пациенток с оперированными яичниками и сниженным овариальным резервом.// XXV Юбилейная международная конференция РАРЧ -2015- С 14-17
24. D. Haouzi, H. Dechaud, S. Assou , C. Monzo, J. de Vos, and S. Hamamah // Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophectoderm and endometrial cells during the implantation period// Human Reproduction // Vol.26, No.6 pp. 1440–1449, 2011 // doi:10.1093/humrep/der075
25. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. Hum Reprod Update 2006;12:617– 630
26. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. Fertil Steril 1992;58:537 –542.
27. Fazleabas AT, Strakova Z (2002) Endometrial function: cell speci changes in the uterine environment. Mol Cell Endocrinol186:143–147
28. Oborna I, Novotny R, Brezinova J, Petrova P, Lichnovsky V, Fingerova H. 2004. Changes in the development of uterine pinopodes in steroid hormone supplemented cycles. Physiological research 53:423-430
29. Singh M, Chaudhry P, Asselin E. 2011. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. Journal of Endocrinology 210(1):5-14.
30. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. 2000. Embryo implantation. Developmental biology 223(2):217-237.
31. Lim H, Song H, Paria B, Reese J, Das SK, Dey S. 2002. Molecules in blastocyst implantation: uterine and embryonic perspectives. Vitamins & Hormones 64:43-76.
32. Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions; 2009. © Thieme Medical Publishers. p 062-079
33. Chrysoula Dosiou [et al.] / Giudice Natural Killer Cells in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Loss: Endocrine and Immunologic Perspectives. // Endocrine Reviews -2005- 26(1)- 44–62.

34. М.А. Маслова и др. / Оценка значимости молекулярно-генетических маркеров в эндометрии в прогнозировании исхода беременности в программе экстракорпорального оплодотворения. // Акушерство и гинекология.-2015- №3-С. 26-32.
35. Laufer N, Simon A. Recurrent implantation failure: Current update and clinical approach to an ongoing challenge. *Fertil Steril*. 2012;97(5):1019–20
36. Coughlan C, Ledger W, Wang Q et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(1):14–38
37. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T (2006) Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 21:3036–3043 4.
38. Fukui A, Funamizu A, Yokota M, Yamada K, Nakamura R, Fukuhara R, Kimura H, Mizunuma H (2011) Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia. *J Reprod Immunol* 90:105–110
39. Achache H, Revel A (2006) Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 12:731–746
40. Soares, S. R., M. M. Barbosa dos Reis and A. F. Camargos (2000). "Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity diseases." *Fertil Steril* 73(2): 406-411
41. Pabuccu, E. G., I. Yalcin, T. Bodur, G. S. Caglar and R. Pabuccu (2016). "Impact of office hysteroscopy in repeated implantation failure: Experience of a single center." *Journal of the Turkish German Gynecology Association* 17(4): 197-200.
42. Lambert, M., C. Hocke, C. Jimenez, S. Frantz, A. Papaxanthos and H. Creux (2016). "Repeated in vitro fertilization failure: Abnormalities identified in the diagnostic assessment Echecs repetes de fecondation in vitro : anomalies retrouvees sur le bilan diagnostique." *Gynecologie Obstetrique Fertilité* 44(10): 565-571
43. Kowalik CR, Goddijn M, Emanuel MH, Bongers MY, Spinder T, de Kruif JH, Mol BW, Heineman MJ. Metroplasty versus expectant management for women

with recurrent miscarriage and a septate uterus. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;6:CD008576

44. Vomstein K, Voss P, Molnar K, Ainsworth A, Daniel V, Strowitzki T, Toth B, Kuon RJ. Two of a kind? Immunological and clinical risk factors differ between recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* 2020;141:103166

45. Implantation failure of endometrial origin: what is new? Bellver J, Simón C. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2018 Aug;30(4):229-236. doi: 10.1097/GCO.0000000000000468. PMID: 29889670

46. Liu L, Zhou F, Lin X et al. Recurrent IVF failure is associated with elevated progesterone on the day of hCG administration. *European J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;171(1):78–83.

47. Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:388-400.

48. Liang P. Y., L. H. Diao, C. Y. Huang, R. C. Lian, X. Chen, G. G. Li, J. Zhao, Y. Y. Li, X. B. He and Y. Zeng (2015). "The pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine profile in peripheral blood of women with recurrent implantation failure." *Reprod Biomed Online* 31(6): 823-826.

49. Gleicher N., Vidali, A. & Barad, D. H. Successful treatment of unresponsive thin endometrium. *Fertil. Steril.* 95(2123), e13–17 (2011).

50. Gleicher, N. et al. A pilot cohort study of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of unresponsive thin endometrium resistant to standard therapies. *Hum. Reprod.* 28, 172–177 (2013)

51. Kalem Z, Namli Kalem M, Bakirarar B, Kent E, Makrigiannakis A, Gurgan T. Intrauterine G-CSF Administration in Recurrent Implantation Failure (RIF): An Rct. *Sci Rep.* 2020 Mar 20;10(1):5139. doi: 10.1038/s41598-020-61955-7

52. Coughlan C. What to do when good-quality embryos repeatedly fail to implant. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;53:4859.

53. Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HW. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod.* 1999;14:2097–101.
54. Mauro Cozzolino, Patricia Diaz-Gimeno, Antonio Pellicer, Nicolas Garrido / Evaluation of the endometrial receptivity assay and the preimplantation genetic test for aneuploidy in overcoming recurrent implantation failure / *J Assist Reprod Genet*, 2020 Dec;37(12):2989-2997. doi: 10.1007/s10815-020-01948-7
55. P.C. Steptoe [et al.] / Birth after the reimplantation of a human embryo, // *Lancet* 12 -1978-366.
56. Quinn P. [et al.] / Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. // *Fertil Steril* -1985- 44(4): 493- 498.
57. Brinster RL. / A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst // *Exp Cell Res* – 1963 - vol. 32 (pg. 205-208).
58. Carrasco B. [et al.] / Does culture medium influence offspring birth weight? // *Fertil Steril* – 2013 -100(5): 1283-1288,
59. Morbeck DE. [et al.] / Composition of commercial media used for human embryo culture. // *Fertil Steril* – 2014-102(3):759-766.
60. Petersen CG. [et al.] / Randomized comparison of two commercial culture media (Cook and Vitrolife) for embryo culture after IMSI. // *JBRA Assist Reprod.* - 2019 Jan -31; 23(1):33-36.
61. Biggers JD. [et al.] / Choosing a culture medium: making informed choices. // *Fertil Steril* – 2008 - 90: 473-83.
62. Bigger JD. / Thoughts on embryo culture conditions. // *Reprod Biomed Online.* - 2001- 4: 30-8.
63. Sarah A. [et al.] / Embryotoxic cytokines—Potential roles in embryo loss and fetal programming. // *J Reprod Immunol.*- 2018 Feb - pp. 80-88.
64. Kazuhiro Kawamura. [et al.] / Promotion of Human Early Embryonic Development and Blastocyst Outgrowth In Vitro Using Autocrine/Paracrine -Growth Factors. // *plos One.*- 2012-7(11).

65. Sjöblom C. [et al.] / Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. // *Biol Reprod.* - 2002 Dec - 67(6):1817-23.
66. Moldenhauer L.M. [et al.] / GM-CSF is an essential regulator of T cell activation competence in uterine dendritic cells during early pregnancy in mice. // *J Immunol* – 2010-185- P.7085–96.
67. Tiitinen A. / Single embryo transfer: Why and how to identify the embryo with the best developmental potential. // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* - 2019 – 33(1) - P. 77-88.
68. Kovacs P. [et al.] / Non-invasive embryo evaluation and selection using time-lapse monitoring: Results of a randomized controlled study. // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*- 2019 - 233- P. 58-63.
69. Hannan NJ. [et al.] / Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation. // *Curr Opin Obstet Gynecol.* - 2007 Jun - 19(3) - P. 266-72.
70. Amanda N. [et al.] / Csf2 Null Mutation Alters Placental Gene Expression and Trophoblast Glycogen Cell and Giant Cell Abundance in Mice. // *BIOLOGY OF REPRODUCTION* - 2009- 81 – P. 207–221.
71. Hannan NJ. [et al.] / A Bioplex Analysis of Cytokines and Chemokines in First Trimester Maternal Plasma to Screen for Predictors of Miscarriage. // *PLOS ONE.*- 2014 – 3- Vol. 9 - e93320.
72. Guerin L.R. [et al.] / Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? // *Hum Reprod Update* – 2009 – 15- P. 517–35.
73. Salamonsen L.A. [et al.] / Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. // *Semin Reprod Med.* -2007 - 25(6) - P.437-44.
74. Jain S. [et al.] / Effect of Intrauterine Perfusion of Granulocyte Colony-stimulating Factor on Endometrial parameters and In Vitro Fertilization Outcome in

Women Undergoing In Vitro Fertilization/Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles: A Randomized Controlled Trial. // *J Hum Reprod Sci.* - 2018 - 11(3) - P. 254-260.

75. Rahmati M. [et al.] / Colony Stimulating Factors 1, 2, 3 and early pregnancy steps: from bench to bedside // *Journal of Reproductive Immunology* – 2015- 109 P. 1–6.

76. Zhang L. [et al.] / Therapeutic role of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for infertile women under in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) treatment: a meta-analysis.// *Arch Gynecol Obstet.* -2018 - 298(5)- P.861-871.

77. Eftekhar M. [et al.] / Role of granulocyte colony-stimulating factor in human reproduction.// *J Res Med Sci.* -2018 -29- 23:7.

78. Davari-Tanha F. [et al.] / The role of G-CSF in recurrent implantation failure: A randomized double blind placebo control trial // *Int J Reprod Biomed (Yazd).*- 2016 -14(12)-P.737-742.

79. Camargo-Díaz F. [et al.] / Colony stimulating factor-1 and leukemia inhibitor factor expression from current-cycle cannula isolated endometrial cells are associated with increased endometrial receptivity and pregnancy.// *BMC Womens Health.*- 2017 – 22-17(1):63.

80. Würfel W. / Treatment with granulocyte colony-stimulating factor in patients with repetitive implantation failures and/or recurrent spontaneous abortions.// *J Reprod Immunol.*- 2015 -108-123-35.

81. Diederichs K. [et al.] / Novel fold and putative receptor binding site of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. // *Science.* - 1991 - 20 - 254 (5039) P.1779-82.

82. Martinez-Moczygemba M. [et al.] / Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. // *J Allergy Clin Immunol* -2003-112- P. 653–65.

83. Robertson SA. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Jun-Aug; 18(3-4):287-98. Epub 2007 May 18.

84. Zhao, Y. [et al.] / Expression and selective cellular localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue. // *Biol. Reprod.* -1995 -53, P.923–930.

85. Zhao [et al.] / Human fallopian tube expresses granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptors and contain immunoreactive GM-CSF protein. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 1994.- P. 662–665.

86. Giacomini G. [et al.] /Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium // *Hum. Reprod.* - 1995 - № 12. -Vol. 10 - P. 3259–3263.

87. Hamilton JA. [et al.] / GM-CSF Biology. // *Growth Factors* -2004 – 22- P. 225–31.

88. Lachlan M. [et al.] /GM-CSF Is an Essential Regulator of T Cell Activation Competence in Uterine Dendritic Cells during Early Pregnancy in Mice // *The Journal of Immunology* – 2010 -185 – P. 7085–7096.

89. Perricone R. [et al.] / GM-CSF and pregnancy: evidence of significantly reduced blood concentrations in unexplained recurrent abortion efficiently reverted by intravenous immunoglobulin treatment. // *Am J Reprod Immunol.* - 2003 - 50(3):232-7.

90. Sferruzzi-Perri AN. [et al.] / Csf2 null mutation alters placental gene expression and trophoblast glycogen cell and giant cell abundance in mice. // *Biol Reprod* – 2009- 81- P.207–21.

91. Chin PY. [et al.] / Stress response genes are suppressed in mouse preimplantation embryos by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). // *Hum Reprod* - 2009- 24- P. 2997–3009.

92. Soren Ziebe [et al.] / A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. // *Fertility and Sterility®* - 2013 - N 6- Vol. 99.

93. Agerholm I, Loft A, Hald F, Lemmen JG, Munding B, Sørensen PD, et al. Culture of human oocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has no effect on embryonic chromosomal constitution. *Reprod Biomed Online* 2010;20:477–84.
94. Harper J, Magli MC, Lundin K, Barratt CL, Brison D (2012) When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory? *Hum Reprod* 27(2):303–313
95. Rodriguez-Wallberg KA, Munding B, Ziebe S, Robertson SA. GM-CSF does not rescue poor-quality embryos: secondary analysis of a randomized controlled trial. *Arch Gynecol Obstet.* 2020 May;301(5):1341-1346. doi: 10.1007/s00404-020-05532-3. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32274634
96. Zhou Wenhui. [et al.] / Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor supplementation in culture medium on embryo quality and pregnancy outcome of women aged over 35 years. // *Reprod Genet* – 2016- 33- P. 39–47.
97. С.И. Тевкин, М.С. и др. / Культивирование эмбрионов в среде, содержащей гранулоцитарно – макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), у пациентов различных возрастных групп. // *Репродуктивные технологии сегодня и завтра* - 2014, стр.46-49.
98. Chu D, Fu L, Zhou W, Li Y Relationship between granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, embryo quality, and pregnancy outcomes in women of different ages in fresh transfer cycles: a retrospective study. *J Obstet Gynaecol.* 2020 Jul;40(5):626-632.)
99. Rose RD, Barry MF, Dunstan EV, Yuen SM, Cameron LP, Knight EJ, Norman RJ, Hull ML. The BlastGen study: A randomised controlled trial of GM-CSF supplemented blastocyst media. *Reprod Biomed Online.* 2020 May;40(5):645-652.)
100. Siristatidis C, Vogiatzi P, Salamalekis G, Creatsa M, Vrachnis N, Glujovsky D, et al. Granulocyte macrophage colony stimulating factor supplementation in culture media for subfertile women undergoing assisted

reproduction technologies: a systematic review. *International Journal of Endocrinology* 2013;2013:704967.

101. Cecilia Sjoblom. [et al.] / Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Alleviates Adverse Consequences of Embryo Culture on Fetal Growth Trajectory and Placental Morphogenesis. // *Endocrinology* – 2005- 146(5) - P.2142–2153.

102. Tesarik J. [et al.] / The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology.// *Hum Reprod.* -1999- 14(5) - P.1318–23.

103. Scott L. [et al.] / The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. // *Hum Reprod.* -2000 - 15(11)- P. 2394–403.

104. Gianaroli L. [et al.] / Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. // *Hum Reprod.* – 2007- 22(1)- P 241–249.

105. Van Royen E. [et al.] / Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. // *Hum Reprod.*- 1999- 14(9)- P.2345–2349.

106. Van Royen E. [et al.] / Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. // *Hum Reprod.* – 2001 - 16(2) – P. 326–332.

107. Ziebe S. [et al.] / Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. // *Hum. Reprod.* – 1997- 12(7)- P.1545–1549.

108. Van Royen E. [et al.] / Multinucleation in cleavage stage embryos. // *Hum Reprod.* – 2003 -18(5)- P.1062–1069.

109. Hnida C. [et al.] / Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. // *Hum Reprod.* – 2004 - 19(2) – P.288–293.

110. Holte J, Berglund L, Milton K, Garello C, Gennarelli G, Revelli A, et al. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for

implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Hum Reprod.* 2007;22(2):548–557.

111. Vergouw CG. [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)- P.1499–1504.

112. Sturmey RG. [et al.] / Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Assessing embryo viability by measurement of amino acid turnover. // *Reproductive biomedicine online* 17- (2008) - P. 486–496.

113. Mio Y [et al.] / Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. // *Am J Obstet Gynecol* – 2008- 199:660 P. 661–665.

114. Meseguer M. [et al.] / The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. // *Hum Reprod* – 2011 – 26- P. 2658-2671.

115. Rhenman A. [et al.] / Which set of embryo variables is most predictive for live birth? A prospective study in 6252 single embryo transfers to construct an embryo score for the ranking and selection of embryos. // *Hum Reprod* – 2015- 30- P.28–36.

116. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. *Human Reproduction.* 2011;26(6):1270-1280.

117. Munne', S. [et al.] / Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. // *Reprod. Biomed.* – 2007- Online 14 – P. 628–634.

118. Hardarson, T. [et al.] / Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. // *Hum. Reprod.* – 2003- 16- P. 313–318.

119. Daughtry BL. [et al.] / Time-Lapse Imaging for the Detection of Chromosomal Abnormalities in Primate preimplantation embryos. // *Methods Mol Biol.* – 2018 – 1769 – P. 293-317.

120. Cruz M. [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;28:569–73.
121. Nerenz RD. / Omics in Reproductive Medicine: Application of Novel Technologies to Improve the IVF Success Rate. // *Adv Clin Chem.* - 2016 – 76 – P.55-95.
122. Seli E. [et al.] / Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and nearinfrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. // *Fertil Steril* 2007 – 88- P.1350–1357.
123. Leese HJ. / Analysis of embryos by non-invasive methods. // *Hum Reprod* -1987- P 37-40.
124. Brison DR. [et al.] / Energy metabolism in late preimplantation rat embryos, *J Reprod Fertil* , 1991, vol. 93 (pg. 245-251).
125. Gott AL. [et al.] / Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. // *Hum Reprod* – 1990- 5(1)- P.104–108
126. Conaghan J. [et al.] / Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. // *J Assist Reprod Genet* – 1993- P. 21-30.
127. Daviss B. /Growing pains for metabolomics // *The Scientist.* – 2005. –19 (8). – P.25–28.
128. Seli E. [et al.] / Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. // *Fertility and Sterility* – 2010 - 94(2)- P.535–542.
129. Brison DR. [et al.] / Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. // *Human Reproduction* – 2004- 19(10) – P. 2319–24.

130. Vergouw CG. [et al.] / Non-invasive viability assessment of day-4 frozen-thawed human embryos using near infrared spectroscopy. // *Reprod Biomed Online*. - 2011- 23(6) - P. 769-76.
131. Uyar A. [et al.] / Embryo assessment strategies and their validation for clinical use: a critical analysis of methodology. // *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* – 2012 - 24(3)- P.141–50.
132. Rødgaard T. [et al.] / Non-invasive assessment of in-vitro embryo quality to improve transfer success. // *Reprod Biomed Online*. - 2015 - 31(5) – P.585-92.
133. Scott R. [et al.] / Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. // *Fertility and Sterility* – 2008- 90(1)- P.77–83.
134. Villas-Boas S. [et al.] / Mass spectrometry in metabolome analysis. // *Mass Spectrom. Rev.* - 2005- 24 – P. 613–646.
135. Nagy, Z.P. [et al.] / Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media “metabolomics. // *Reprod. Biomed. Online* - 2008- 17 – P. 502–507.
136. Seli E. [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- P. 137–144.
137. Urbanski JP. [et al.] / Noninvasive metabolic profiling using microfluidics for analysis of single preimplantation embryos. // *Anal Chem* - 2008- 80- P 6500–6507.
138. Egea RR. [et al.] / OMICS: current and future perspectives in reproductive medicine and technology. // *Journal of Human Reproductive Sciences* – 2014 - 7(2) – P. 73–92.
139. Revelli A. [et al.] / Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. // *Reprod Biol Endocrinol* - 2009 -7 -40.
140. Devreker F. / Uptake and release of metabolites in human preimplantation embryos. In: Cohen J, Elder K (eds). // *Human Preimplantation Embryo Selection*. London, UK: Taylor and Francis – 2007- P. 325–336.

141. Menke TM [et al.] / Mouse blastocysts grown in vivo and in vitro: carbon dioxide production and trophoblast outgrowth. // *J Reprod Fertil* 1970- 23 –P.117–127.
142. Gardner DK [et al.] / Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. // *J Exp Zool* - 1987- 242- P.103–105.
143. Hardy K. [et al.] / Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. // *Hum Reprod* 1989- 4(2)- P.188–191.
144. Gardner DK. [et al.] / Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. // *Hum Reprod* - 2011- 26 - P.1981–1986.
145. Tiffin GJ. [et al.] / Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. // *J Reprod Fertil* – 1991 – 93- P.125–132.
146. Gardner DK. [et al.] / Sex-related physiology of the preimplantation embryo.// *Mol Hum Reprod* – 2010 – 16 – P.539–547.
147. И.М. Зорина, и др. / Анализ потребления глюкозы и глутамата в питательных средах как метод оценки качества эмбрионов человека пятых суток развития. // *Акушерство и гинекология №5* - 2018 - стр 65-69.
148. Robertson SA. [et al.] / Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. // *Biol Reprod.* - 2001 Apr - 64(4) - P.1206-15.
149. Hammer MA. [et al.] / Glycine transport by single human and mouse embryos. // *Hum Reprod.* - 2000, vol. 15, P. 419-426.
150. Baltz JM. / Osmoregulation and cell volume regulation in the preimplantation embryo. // *Curr Top Dev Biol* – 2001 -vol. 52- P. 55-106.
151. Steeves CL. [et al.] / Regulation of intracellular glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. // *J Cell Physiol* – 2005 - vol. 204 – P. 273-279.

152. Picton HM. [et al.] / Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro. // *Mol Hum Reprod* – 2010 -16- P.557–569.
153. Uyar A. [et al.] / Metabolomic assessment of embryo viability. // *Semin Reprod Med.* - 2014 - 32(2)- P.141-52.
154. Vergouw CG. [et al.] / Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with nearinfrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. // *Human Reproduction.* – 2012 - 27 (8) - P. 2304–11.
155. Ahlström A. [et al.] / Cross-validation and predictive value of near-infrared spectroscopy algorithms for day-5 blastocyst transfer. // *Reproductive Biomedicine Online* – 2011- 22(5) - P. 477–84.
156. Кузьмичев Л. И др. / Принципы комплексной оценки и подготовки эндометрия у пациенток программ вспомогательных репродуктивных технологий. // *Акушерство и гинекология.* – 2010- 5- стр.32–36.
157. Левиашвили М.М. и др. / Оценка рецептивности эндометрия у пациенток с безуспешными программами экстракорпорального оплодотворения в анамнезе. // *Акушерство и гинекология.*- 2012 - 4-1- стр. 65–69.
158. Kaye PL. [et al.] / The role of growth factors in preimplantation development. // *Prog Growth Factor Res* – 1995- 6:1–24.
159. Hegde A. [et al.] / Media composition: growth factors. // *Methods Mol Biol.*- 2012- 912- P.177-198.
160. Richter Kevin S. / The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. // *Curr Opin Obstet Gynecol.* - 2008 -20(3)- стр.292-304.
161. Salmassi A. [et al.] / Expression of mrna and protein of macrophage colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. // *Fertil Steril* – 2005 – 83 – P. 419–425.
162. Wang TH. [et al.] / Insulin-like growth factor-II (IGF-II), igfbinding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. // *Fertil Steril* – 2006 -86- P.1392–1401.

163. Zhang L. [et al.] / Validation of antivascular endothelial growth factor (anti-VEGF) antibodies for immunohistochemical localization of VEGF in tissue sections: expression of VEGF in the human endometrium. // *J Pathol* -1998; 185-P.402–408.
164. Адамян Л.В. / Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация. /Клинические рекомендации по ведению больных- 2013. – 62 стр.
165. Гаспаров А.С.и др. / Эндометриоз и бесплодие: инновационные решения. 2013. — 128 с.
166. Freis A. [et al.] / Relative Morphokinetics Assessed by Time-Lapse Imaging Are Altered in Embryos From Patients With Endometriosis. // *Reprod Sci.*- 2018 - 25(8) – P,1279-1285.
167. Murta M. [et al.] / Endometriosis does not affect live birth rates of patients submitted to assisted reproduction techniques: analysis of the Latin American Network Registry database from 1995 to 2011. // *J Assist Reprod Genet.* - 2018 - 35(8)- P.1395-1399.
168. L Vassilopoulou, M Matalliotakis, M Zervou, C Matalliotaki, D Spandidos / Endometriosis and in vitro fertilisation (Review). // *Experimental and Therapeutic Medicine* 16 (2), 1043-1051, 2018.
169. Harb HM, Gallos ID, Chu J, Harb M / The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis. // *Coomarasamy A.BJOG.* 2013 Oct;120(11):1308-20.
170. Cao X, Chang HY, Xu JY, Zheng Y, Xiang YG, Xiao B, Geng XJ, Ni LL, Chu XY, Tao SB, He Y, Mao GH. / The effectiveness of different down-regulating protocols on in vitro fertilization-embryo transfer in endometriosis: a meta-analysis // *Reprod Biol Endocrinol.* 2020 Feb 29;18(1):16.
171. Sjoblom C. [et al.] / Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. // *Human Reproduction.*- 1999- vol. 14 - P. 3069–3076.

172. Костромина Н. Ю. И др. / Применение среды embryogen для культивирования ооцитов и эмбрионов. // Материалы XXIII международной конференции «Репродуктивные технологии сегодня и завтра». – 2013 -с. 53-54.
173. Renzini M [et al.]/ Clinical efficiency and perinatal outcome of ART cycles following embryo culture in the presence of GM-CSF in patients with miscarriage or early pregnancy loss history. // Hum Reprod - 2013 - 28.
174. Sha T. [et al.] / Pregnancy-related complications and perinatal outcomes resulting from transfer of cryopreserved versus fresh embryos in vitro fertilization: a meta-analysis. // Fertil Steril. - 2018 - 109(2)- P. 330-342.
175. Liu SY. [et al.]/ Obstetric and neonatal outcomes after transfer of vitrified early cleavage embryos. // Hum Reprod. 2013 - 28(8)- P.2093–2100.
176. Maheshwari A. [et al.] / Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozenthawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. // Fertil Steril. - 2012 - 98(2)- P. 368-77.
177. Gode F, [et al.] The Effect Follicular Fluid Vitamin A, E, D and B6 on Embryo Morphokinetics and Pregnancy Rates in Patients Receiving Assisted Reproduction. Gynecol Obstet Reprod Med 2019;25:1. Mebas Medikal Basin Yayin Ltd. Sti.
178. Haggarty P. / Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth: a review // Placenta -2002 - P.28–38.
179. Il-Kyu Kim, [et al.] GM-CSF Promotes Antitumor Immunity by Inducing Th9 Cell Responses Cancer Immunol Res March 1 2019 7 (3) 498-509;
180. Kennedy T. Interactions of eicosanoids and other factors in blastocyst im plantation. EICOSANOIDS Reprod 2012;, p. 73. MTP Press Limited
181. Yagi A. [et al.] / A fatty acid profiling method using liquid chromatography–high resolution mass spectrometry for improvement of assisted reproductive technology. // Clinica Chimica Acta – 2016 - 456 –P.100–106.

ПРИЛОЖЕНИЕ

На основании полученных нами данных разработан алгоритм ведения пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

