

Sverdlovskoj oblasti na 2014 god i na planovyy period 2015 i 2016 godov http://minzdrav.midural.ru/document/list/document_class/48#document_list

3. Ukaz Prezidenta RF ot 7 maja 2012 g. N 606 «O merah po realizacii demograficheskoj politiki Rossijskoj Federacii» Sistema GARANT: <http://base.garant.ru/70170932/#ixzz2vjuDDOhbht> <http://base.garant.ru/70170932/>

4. Karibaeva Sh.K. Opredelenie kachestva zhizni bol'nyh s besplodiem v programme jekstrakorporal'nogo oplodotvorenija. Sh.K.Karibaeva, V.N.Lokshin. Materialy XV mezhdunarodnoj konferencii «Reproduktivnye tehnologii segodnja i zavtra». – Cheboksary. – 2005. p. 17

5. Krutova V.A. Social'no-psihologicheskie i medicinskie aspekty lechenija zhenskogo besplodija: dissertacija ... kandidata medicinskih nauk : 19.00.05. Krutova Viktorija Aleksandrovna; [Mesto zashhity: GOUVPO «Severnyj gosudarstvennyj medicinskij universitet»] - Arhangel'sk, 2006 - Kolichestvo stranic: 177 p. 4 il.

6. Prikaz № 107n ot 30.08.2012 «Porjadok ispol'zovanija reproduktivnyh tehnologij, protivopokazanija i ogranichenija k ih primeneniju»

7. Kokranovskoe rukovodstvo: Beremennost' i rody. D. Ju. Hofmejr, D. P. Nejlson, Z. Alfirevich i dr. Pod obshh.red.G.T.Suhih. – M.: Logosfera, 2010. – 440 p.

8. Swensen A. R., Flood E.M. et al., 2004; Novik A. A. i soavt., 2004; Baranov A. A. i soavt., 2005

9. Colpin H. Adolescents conceived by IVF: parenting and psychosocial adjustment/ H. Colpin, G. Bossaert. Hum Reprod. – 2008. Vol.27, N4. pp. 186–225.

10. Colpin H. Parenting and psychosocial development of IVF children: a follow-up study. H. Colpin, S. Soenen. Hum Reprod. – 2002. - Vol. 4. pp. 1116–1123.

11. Relationships in couples after failed IVF treatment: a prospective follow-up study. G. Sydsjo, K. Ekholm, M. Wadsby [et all.] Human Reproduction – 2005. - Vol.20, No. 7. pp. 1952–1957

12. The links between prenatal stress and offspring development and psychopathology: disentangling environmental and inherited influences. F. Rice, G. T. Harold, J. Boivin [et all.] Thapar Psychological Medicine - 2010. – Vol. 40. pp. 335–345.

13. Impact of a multiple, IVF birth on post-partum mental health: a composite analysis. C. Sheard, S. Cox, M. Oates [et all.] Human Reproduction – 2007. Vol. 22, No. 7. pp. 2058–2065.

14. Parental attitudes toward disclosure of the mode of conception to their child conceived by in vitro fertilization. C. Peters, X. Kantaris, J. Barnes [et all.] Fertility and Sterility- 2005. – Vol. 83, No. 4. pp. 914–919.

15. Wagenaar K. Cognitive and psychological functioning of

adolescents born after IVF. K. Wagenaar – Amsterdam, 2009. 148 p.

16. An overview of studies on early development, cognition, and psychosocial well-being in children born after in vitro fertilization. K. Wagenaar, J. Huisman, P. T. Cohen-Kettenis, [et all.] J Dev Behav Pediatr. – 2008. – Vol. 29. pp. 219–230.

17. Medical, cognitive, emotional, and behavioral outcomes in school-age children conceived by in-vitro fertilization. R. Levy-Shiff, E.Vakil, L. Dimitrovsky [et all.] J Clin Child Psychol. – 1998. Vol.27, N 3. – P. 320-329.

18. Chernikov V. V. Razrabotka i ocenka jeffektivnosti russkoj versii oprosnika QUALIN dlja izuchenija kachestva zhizni detej rannego vozrasta: avtoref. dis. kand.med.nauk: 14.00.33 Vladislav Vladimirovich – Moskva, 2009. – 35 p.

19. Bahtiarova V. O. Sostojanie zdorov'ja detej, rodivshijsja v rezul'tate jekstrakorporal'nogo oplodotvorenija i iskusstvennogo osemnenija: avtoref. dis. ... kand.med.nauk: 14.00.02. Bahtiarova Vera Olegovna. - Moskva, 1993. – 58 p.

20. Nikitina I. V. Patologicheskie sostojanija u novorozhdennyh, rodivshijsja v rezul'tate ispol'zovanija VRT (JeKO i PJe, JeKO i KSD): avtoref. dis. ... kand.med.nauk: 14.00.09. Nikitina Irina Vladimirovna - Moskva, 2005. – 27 p.

21. Kovtun O. P. Faktory riska i podhody k ocenke sostojanija zdorov'ja detej, rozhdennyh s pomoshh'ju vspomogatel'nyh reproduktivnyh tehnologij (obzor literatury). O.P. Kovtun, V. V. Kovalev, A. N. Plaksina. Vestnik ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki. – Ekaterinburg, 2009. No. 1. pp. 129–131.

22. Plaksina A. N. Prognozirovanie zdorov'ja i kachestva zhizni detej, rozhdennyh pri pomoshhi vspomogatel'nyh reproduktivnyh tehnologij: avtoref. dis. ... kand.med.nauk: 14.01.09. Plaksina Anna Nikolaevna – Ekaterinburg, 2011. 28 p.

Authors

Plaksina Anna N.

Closed Joint-Stock Company Family Medicine Center, Yekaterinburg
PhD, Neonatologist

Chernaja Elena V.

Closed Joint-Stock Company Family Medicine Center, Yekaterinburg
Clinical psychologist

Remizov Ruslan P.

Closed Joint-Stock Company Family Medicine Center, Yekaterinburg
Obstetrician-gynecologist

Russian Federation 620043, Ekaterinburg, st. Nachdiva Vasil'eva, 1/3
e-mail: cfm@cfm.ru

УДК : 618.177-089.888.11

Правдюк А. И., Грищенко Н. Г., Паращук В. Ю.

МОРФОКИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ИМПЛАНТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННЫХ В ЦИКЛАХ ВРТ

Клиника репродуктивной медицины им. акад. В. И. Грищенко, г. Харьков, Украина

Резюме. В работе была проведена оценка ряда факторов на предмет их влияния на морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах ЭКО. Были выявлены достоверные отличия по времени четвертого клеточного деления (t5) у эмбрионов, полученных в циклах с применением протоколов с агонистами и антагонистами гонадотропин-релизинг-гормона (ГнРГ). Было также установлено, что использование высоких суммарных доз фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) замедляет развитие эмбрионов. Вместе с тем, возраст партнеров, количество ооцитов и содержание нормальных форм сперматозоидов в эякуляте не оказывали влияние на кинетику развития эмбрионов. Необходимо проведение дальнейших исследований по

выявлению факторов, влияющих на темпы развития эмбрионов.

В работе также исследовали морфокинетические характеристики эмбрионов с установленной имплантацией. Вопреки ожиданиям, значительная часть эмбрионов из этой группы по морфокинетическим критериям имели наименее благоприятный прогноз имплантации. Таким образом, использованная в работе морфокинетическая классификация не позволяла точно предсказывать имплантацию эмбрионов. Вероятно, прогностическая ценность данной классификации может быть улучшена путем интеграции данных о влиянии различных факторов на динамику развития эмбрионов в циклах ВРТ (вспомогательные репродуктивные технологии).

Ключевые слова: протокол КСЯ, эмбрион, ФСГ, имплантация, ЭКО, мониторинг time-lapse, морфокинетика

Одной из центральных проблем клинической эмбриологии является выбор эмбриона с максимальным имплантационным потенциалом для переноса в полость матки. Для решения этой задачи в последнее время предложен ряд инновационных подходов, которые основаны на оценке метаболических характеристик [1], транскрипционного профиля [2], генетической компетентности эмбрионов [3]. Особое внимание привлекает метод, основанный на анализе морфокинетических характеристик развивающегося эмбриона. Внедрение и совершенствование оборудования для покадровой съемки эмбрионов (time-lapse monitoring) открывает новые клинические возможности для непрерывного наблюдения за эмбрионами, что облегчает их морфологическую оценку и делает возможным внедрение новых динамических маркеров для предсказания их жизнеспособности [4].

На данный момент в литературе обсуждаются различные критерии и алгоритмы морфокинетической оценки эмбрионов [5]. Морфокинетическая классификация эмбрионов, предложенная в работе Meseguer et al. [6], на данный момент представляется наиболее завершенной и применимой в клинической практике. Эта система позволяет распределять эмбрионы по четырем категориям в соответствии с их морфокинетическими характеристиками. Принадлежность эмбриона к той или иной категории определяется по соответствию времени его четвертого (t5) и второго клеточного (t3) деления установленным критериям. Нормальным диапазоном для времени t5 является 48–56 часов, а для t3 — 35–40 часов. Каждая категория также подразделяется на две подкатегории в зависимости от продолжительности второго клеточного цикла (cc2) эмбриона. Нормальный диапазон для этого показателя лежит ниже 12 часов. В соответствии с данными Meseguer et al. эмбрионы из каждой категории имеют различный имплантационный потенциал. Таким образом, данная система позволяет предсказывать имплантацию эмбрионов на основании динамических параметров их развития. Однако, по нашему мнению, перед использованием данной классификации для предсказания имплантационного потенциала эмбрионов на практике, ее эффективность должна быть оценена каждой клиникой. Для оценки воспроизводимости результатов Meseguer et al. в клинике мы ретроспективно анализировали морфокинетические показатели в группах эмбрионов с установленной имплантацией.

Одной из проблем, стоящих на пути к широкому применению морфокинетической селекции эмбрионов, является факт изменчивости темпов дробления эмбрионов под действием различных факторов. Так, в частности, было показано, что на морфокинетические характеристики эмбрионов влияют такие факторы, как синдром поликистозных яичников [7], фактор культуральной среды [8], условия культивирования [9], курение [10] и другие. Вместе с тем широкий спектр факторов все еще остается неизученным в этом аспекте. Мы предположили, что факторы, определяющие результативность циклов ВРТ, могут также оказывать влияние на динамику развития эмбрионов.

В связи с этим целью настоящей работы была оценка эффективности применения морфокинетической классификации Meseguer et al. для предсказания имплантационного потенциала эмбрионов, а также изучение влияния ряда факторов на их морфокинетические характеристики.

Материалы и методы

Данные, использованные в настоящем исследовании, были получены в ходе лечебных циклов ВРТ, которые прово-

дились в клинике репродуктивной медицины им. акад. В. И. Грищенко в период с июня 2012 по апрель 2014 года. Диапазон возраста женщин был 23–49 лет. Все эмбрионы были получены после оплодотворения методом ICSI (Intro Cytoplasmic Sperm Injection). Эмбрионы оценивались с помощью морфокинетического анализа, отмечая точное время клеточных событий в часах после оплодотворения методом ICSI. Имплантация перенесенных эмбрионов подтверждалась после 7 недель беременности при выявлении в ходе ультразвукового исследования плодных яиц с сердечным ритмом.

Эмбрионы культивировали в инкубаторах Thermo Heracell 150i при температуре 37 °C в атмосфере с содержанием N₂, CO₂ и O₂ 89, 6 и 5 % соответственно. Культивирование эмбрионов проводили в средах COOK в специальных чашках для группового культивирования (Vitrolife, Венгрия) с 9 или 16 микролунками. Для покадровой съемки использовали систему Primovision (Vitrolife, Венгрия), которая была настроена на частоту съемки 10 мин. Этапы дробления аннотировались вручную в программном обеспечении Primovision Analyzer при просмотре видеопетель каждого эмбриона. Перенос эмбрионов проводили на третьи либо на пятые сутки после оплодотворения.

Статистический анализ проводили путем сравнения средних значений времени клеточных событий при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Морфокинетические характеристики эмбрионов с известной имплантацией

В ходе 130 циклов ЭКО с использованием time-lapse мониторинга (из которых 15 с донацией ооцитов) было произведено 127 переносов эмбрионов при среднем количестве эмбрионов на перенос 2,06. При выборе эмбрионов на перенос в первую очередь учитывали их морфологические характеристики. В случаях выбора между морфологически эквивалентными эмбрионами использовали также их морфокинетические характеристики как вспомогательный критерий селекции. Из перенесенных 262 эмбрионов имплантировалось 92, таким образом, частота имплантации составила 35,1 %.

На первом этапе данного исследования решалась задача по оценке прогностической силы критериев морфокинетической классификации, предложенной Meseguer et al. (2011), для предсказания имплантационного потенциала эмбрионов в циклах ЭКО. Для этого была сформирована специальная группа эмбрионов с установленной имплантацией, выбранная из тех циклов ЭКО, где количество эмбрионов на перенос соответствовало количеству плодных яиц в полости матки.

При помощи иерархической модели морфокинетических критериев (Meseguer et al. 2011) 46 эмбрионов с известной имплантацией были распределены по четырем категориям А, В, С, D (рис. 1а — А — наилучший, В и С — средний, D — наихудший прогноз) в соответствии с временами окончания четвертого и второго клеточного деления и продолжительностью второго клеточного цикла (рис. 1.).

По морфокинетическим характеристикам t5 и t3 большинство имплантировавшихся эмбрионов (40 из 46) относились в равных пропорциях к категориям с наилучшим (категория А) и наихудшим (категория D) прогнозом имплантации. 3 эмбриона относились к категориям В и З — к категории С. Таким образом, имплантационный потенциал эмбрионов из морфокинетических категорий с наихудшим (D) и наилучшим прогнозом (А) был сходным. Кроме того, количество имплантировавшихся эмбрионов из морфокинетических категорий В и С со средним прогнозом было в несколько раз меньше по сравнению с количеством имплан-

тировавшихся эмбрионов из категории D с наихудшим прогнозом.

Вместе с тем, количество имплантировавшихся эмбрионов с продолжительностью второго клеточного цикла (cc2) меньше 12 часов (36 из 46) было в 3,6 раза больше по сравнению с количеством имплантировавшихся эмбрионов (10 из 46) с продолжительностью cc2 больше 12 часов (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что в рамках данного исследования морфокинетические критерии для продолжительности cc2, похоже, имели большую предсказательную силу в сравнении с критериями для t5 и t3. Это не согласуется с иерархическим соподчинением критериев в модели Meseguer et al. 2011, где наибольшей предсказательной силой обладает время окончания четвертого клеточного деления, а наименьшей — время продолжительности второго клеточного цикла.

На следующем этапе работы была проанализирована морфология эмбрионов с известной имплантацией (рис. 3). Анализ распределения эмбрионов по морфологическим категориям показал, что ¼ имплантировавшихся эмбрионов имели 4 бластомера (время оценки 44 часа после оплодотворения) и относились к первому классу качества согласно оценке ALPHA-ESHRE Istanbul Consensus 2011 [11]. Это свидетельствует о том, что эмбрионы высокого качества имели наибольший имплантационный потенциал и что морфология эмбрионов, оцененная через 44 часа после оплодотворения, предсказывала имплантацию точнее, нежели система морфокинетических критериев для t5 и t3 сама по себе.

При попытке объяснить расхождение между результатами Meseguer et al. 2011 и данными, полученными в настоящей работе, было сделано предположение о том, что в наших условиях времена окончания первого, второго и четвертого клеточного деления части эмбрионов смещаются только однонаправленно в сторону увеличения либо уменьшения, что приводит к выходу из ожидаемых диапазонов. Для проверки этого предположения из всех эмбрионов с известной имплантацией были отобраны эмбрионы, девиант-

ные по t5 и/или t3 (категории B, C, D). Для этой группы эмбрионов определяли направление выхода времени клеточных событий за пределы интервалов Meseguer et al. Эмбрионы, у которых время t5 и/или t3 было меньше 48 и 35 часов, соответственно, считались «опережающими», и наоборот — эмбрионы со временем окончания четвертого и второго клеточного деления больше 56 и 40 часов считались «отстающими» (рис. 4). Анализ показал, что исследуемая группа представлена как «отстающими», так и «опережающими» эмбрионами, что не позволило подтвердить предположение о том, что время клеточных делений всех девиантных эмбрионов смещается в одном и том же направлении.

Таким образом, в условиях настоящего исследования морфокинетическая классификация эмбрионов не позволяла эффективно предсказывать их имплантацию сама по себе. В то же время большинство эмбрионов с успешной имплантацией соответствовали критериям для cc2, предложенным Meseguer et al. При этом морфология эмбрионов оставалась хорошим предиктором имплантации. Эмбрионы с отклонениями от «морфокинетической нормы» демонстрировали как запаздывающие, так и опережающие темпы развития.

Анализ факторов, влияющих на морфокинетические характеристики эмбрионов человека

Ранее было показано, что различные факторы, такие как концентрация кислорода, культуральная система, курение, индекс массы тела способны модулировать морфокинетическую программу эмбрионов в циклах ВРТ. Вместе с тем, спектр факторов, которые могут влиять на разворачивание клеточных событий в эмбрионах, изучен недостаточно. В связи с этим на следующем этапе данной работы проводили ретроспективный скрининг факторов различной природы на предмет их влияния на морфокинетические характеристики эмбрионов человека в циклах ВРТ. Помимо параметров t5, t3 и cc2, на которых базируется использованная в работе классификация Meseguer et al., на данном этапе работы оценивали также время деления на 2 и 4 бластомера — t2 и t4, а также суммарную продолжительность треть-

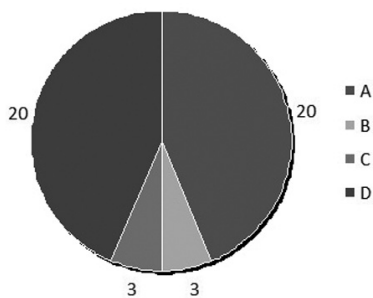


Рис. 1. Распределение эмбрионов с известной имплантацией по морфокинетическим категориям классификации Meseguer et al. (n = 46).

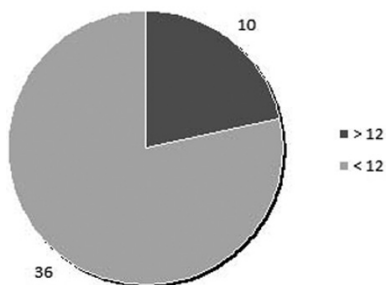


Рис. 2. Продолжительность второго клеточного цикла (cc2) у эмбрионов с известной имплантацией (n = 46).

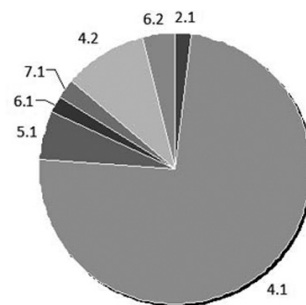


Рис. 3. Морфология двухдневных эмбрионов с известной имплантацией; время оценки 44 ч. после оплодотворения (n = 46).

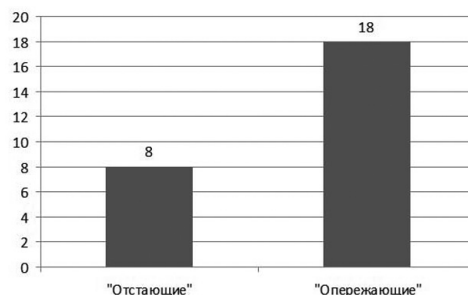


Рис. 4. Структура темпов развития эмбрионов с известной имплантацией из морфокинетических классов B, C, D (n = 26).

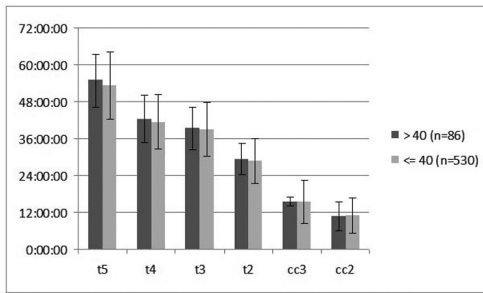


Рис. 5. Морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах ВРТ у пациенток с возрастом 38 и младше, старше 38 лет.

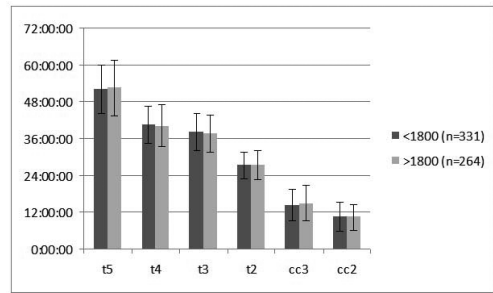


Рис. 9. Морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах ВРТ с различными суммарными дозами ФСГ (значение для разделения групп 1800 МЕ).

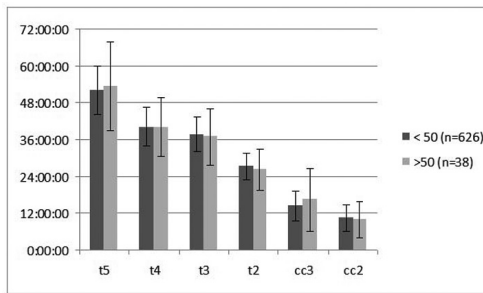


Рис. 6. Морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах ВРТ у пациентов с возрастом 50 и младше, старше 50 лет.

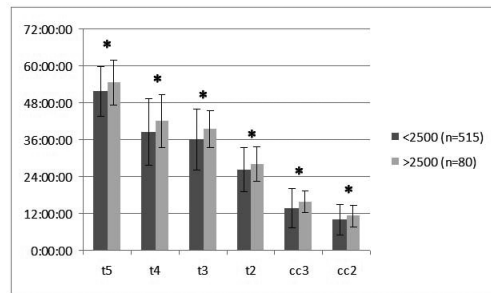


Рис. 10. Морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах ВРТ с различными суммарными дозами ФСГ (значение для разделения групп 2500 МЕ).
* — различия между группами достоверны ($p < 0,05$).

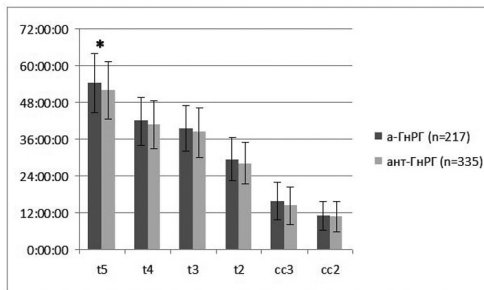


Рис. 7. Морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах ВРТ с использованием протоколов с а-ГНРГ и ант-ГНРГ.
* — различия между группами достоверны ($p = 0.039$).

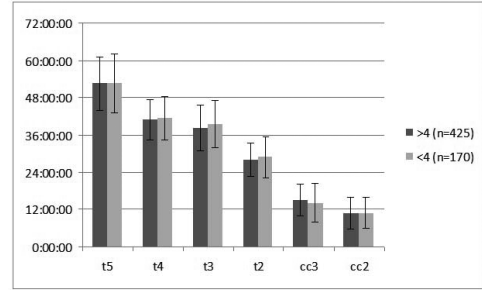


Рис. 11. Морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах ВРТ у пациентов с содержанием нормальных форм сперматозоидов в эякуляте 4 % и больше, меньше 4 %.

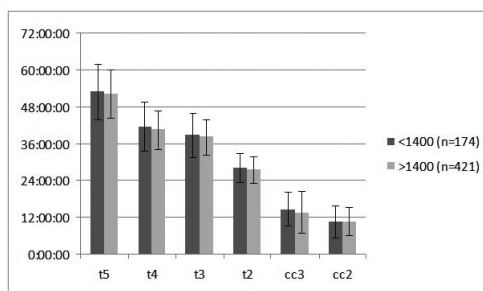


Рис. 8. Морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах ВРТ с различными суммарными дозами ФСГ (значение для разделения групп 1400 МЕ).

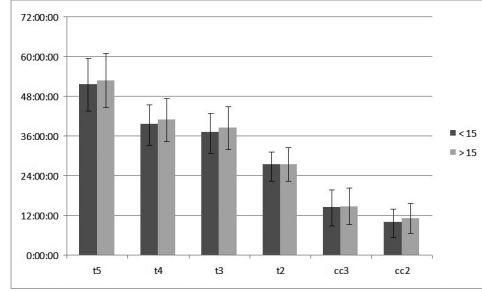


Рис. 12. Морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах ВРТ с количеством полученных ооцитов 15 и менее, более 15 ооцитов.

го и четвертого клеточного циклов сс3. Эти параметры были взяты, чтобы наиболее полно охарактеризовать динамику раннего развития исследуемых эмбрионов.

Как известно, возраст пациенток является одним из существенных факторов, влияющих на результативность циклов ЭКО [12, 13]. Это влияние обусловлено повышением уровня анеуплоидий и других генетических аномалий в ооцитах возрастных пациенток [14, 15]. Кроме того, с возрастом у женщин наблюдается старение митохондриального аппарата и снижение в ооцитах эффективности репаративных процессов, отвечающих за восстановление фрагментированных участков ДНК [16]. Мы предположили, что возрастные изменения в ооцитах могут также оказывать влияние на темпы дробления эмбрионов. Для проверки этой гипотезы проводили сравнение морфокинетических параметров эмбрионов, полученных у пациенток младше и старше 40 лет. Значения морфокинетических параметров эмбрионов не отличались достоверно между исследуемыми группами (рис. 5). Средние значения исследуемых параметров в обеих группах соответствовали нормальному диапазону.

В последнее время внимание исследователей привлекает также изучение роли возраста мужчины в результативности циклов ВРТ. Показано, что частота самопроизвольных абортов повышается в циклах, где возраст партнера был больше 50 лет [17, 18]. В других исследованиях влияние возраста мужчины на результативность ВРТ не подтверждается [19]. В данной работе проводилось сравнение морфокинетических характеристик эмбрионов, полученных в циклах, где возраст мужчин был больше или меньше 50 лет (рис. 6). Различия между группами по исследуемым параметрам не были достоверными, а их средние значения находились в пределах нормальных диапазонов.

Выбор протокола стимуляции суперовуляции зависит от многих клинических факторов и во многом определяет результативность лечебных циклов. Наиболее распространенными протоколами стимуляции являются длинный протокол с агонистами гонадотропин — релизинг гормона (анти-ГнРГ) и протокол с антагонистами ГнРГ (анти-ГнРГ). В данной работе проводили сравнение морфокинетических характеристик эмбрионов, полученных в циклах с а-ГнРГ и анти-ГнРГ. Было обнаружено, что среднее время четвертого клеточного деления у эмбрионов в группе с использованием длинного протокола (54 ч. 25 мин.) достоверно превышает это значение в группе с антагонистным протоколом (52 ч. 36 мин.) (рис. 7). Следует отметить, что усредненные значения времени t5 в обеих группах находятся внутри нормального диапазона 48–56 часов. Эти результаты согласуются с результатами, опубликованными ранее [20], где также было показано, что эмбрионы, полученные в протоколах с агонистами, дробятся медленнее, чем в протоколах с ант-ГнРГ.

Ранее было показано, что в циклах ВРТ, где для контролируемой стимуляции яичников (КСЯ) была использована суммарная доза ФСГ выше 2200 МЕ, наблюдалось снижение частоты наступления беременности [21]. В данной работе было сделано предположение, что темпы дробления эмбрионов могут зависеть от суммарной дозы ФСГ, использованной в ходе КСЯ. Для проверки этой гипотезы проводили сравнение морфокинетических характеристик эмбрионов из групп с суммарной дозой ФСГ меньше и больше 1400, 1800 и 2500 МЕ. Использование в нашем исследовании трех пар групп сравнения было продиктовано желанием более точно определить суммарную дозу ФСГ, при которой степень влияния этого фактора может существенно возрастать.

Средние значения морфокинетических характеристик в группах, полученных при пороговых значениях суммарной дозы ФСГ в 1400 и 1800 МЕ, не обнаруживали достоверных отличий между собой (рис. 8–9). Тогда как группы, сформированные с пороговым значением 2500 МЕ, значимо отли-

чались между собой по всем исследуемым морфокинетическим параметрам (рис. 10). Разница между группами составляла около 3 часов по параметрам t5, t4, t3 и около 2 часов по времени t2. Интервальные характеристики сс3 и сс2 отличались между группами на 2 часа и 80 минут соответственно. Следует отметить, что использование суммарной дозы ФСГ выше 2500 МЕ сопровождалось увеличением времени завершения исследуемых клеточных событий. Эти данные согласуются с результатами, опубликованными Munoz et. al. [20], в то же время замедление темпов развития эмбрионов наблюдалось также при сниженной суммарной дозе ФСГ в группе пациенток с дефицитом массы тела [22]. Это может объясняться наличием нелинейной связи между скоростью развития эмбрионов и суммарной получаемой дозой ФСГ. С другой стороны, использование сниженных или повышенных суммарных доз ФСГ, в свою очередь характеризует клинические группы пациентов, в которых они используются. Следовательно нельзя также исключать, что снижение темпов развития эмбрионов в группе с повышенной суммарной дозой ФСГ связано с биологическими особенностями представительниц этой группы.

Важным критерием, который характеризует фертильность партнера, является процент нормальных форм сперматозоидов в эякуляте. При этом аномальная морфология сперматозоидов может быть связана с рядом таких эпигенетических дефектов как: нарушение метилирования ДНК [23], дефекты centrosомы [24], повышенная фрагментация хроматина сперматозоидов [25]. В данной работе было сделано предположение, что эти эпигенетические дефекты, а также другие факторы, которые влияют на морфологию сперматозоидов, могут влиять на скорость развития эмбриона. В связи с этим, были оценены морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах, где содержание нормальных форм спермиев было выше 4 % (нормальная морфология в соответствии с 5-м руководством ВОЗ) и ниже этого значения (аномальная морфология). При сравнении не было выявлено существенных различий по исследуемым характеристикам между двумя рассматриваемыми группами (рис. 11). Средние значения всех параметров находились в пределах нормальных диапазонов.

Установлено, что эффективность циклов ВРТ растет линейно вместе с увеличением количества получаемых ооцитов до определенного порогового значения. При увеличении числа ооцитов более 15 эффективность лечебных циклов перестает возрастать [26]. Вместе с тем 14 антральных фолликулов на момент назначения триггера финального созревания ооцитов является граничным критерием прогнозирования гиперответа на КСЯ [27]. Связи с этим в данной работе решался вопрос о возможном влиянии числа ооцитов, получаемых в циклах ВРТ, на морфокинетические характеристики эмбрионов. На основании данных литературы, изложенных выше, разделение двух групп сравнения было проведено по пороговому значению 15 ооцитов. Морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах, где количество ооцитов было 15 и меньше ооцитов, не отличались от группы с большим количеством ооцитов и находились в пределах нормальных диапазонов (рис. 12).

Заключение

В работе была проведена оценка ряда факторов на предмет их влияния на морфокинетические характеристики эмбрионов, полученных в циклах ЭКО. Были выявлены достоверные отличия по времени четвертого клеточного деления (t5) у эмбрионов, полученных в циклах с применением протоколов с агонистами и антагонистами ГнРГ. Было также установлено, что использование высоких суммарных доз ФСГ замедляет развитие эмбрионов. Вместе с тем, возраст партнеров, количество ооцитов и содержание нормаль-

ных форм сперматозоидов в эякуляте не оказывали влияние на кинетику развития эмбрионов. Необходимо проведение дальнейших исследований по выявлению факторов, влияющих на темпы развития эмбрионов.

В работе также исследовали морфокинетические характеристики эмбрионов с установленной имплантацией. Вопреки ожиданиям, значительная часть эмбрионов из этой группы по морфокинетическим критериям имели наихудший прогноз имплантации. Таким образом, использованная в работе морфокинетическая классификация не позволяла точно предсказывать имплантацию эмбрионов. Вероятно, прогностическая ценность данной классификации может быть улучшена путем интеграции данных о влиянии различных факторов на динамику развития эмбрионов в циклах ВРТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sfontouris I. A. Non-invasive metabolomic analysis using a commercial nir instrument for embryo selection. I. A. Sfontouris, G. T. Lainas, D. Sakkas [et al.]. *Journal of human reproductive sciences*. 2013. Vol. 6, No. 2. pp. 133–139.
2. Reich A. The transcriptome of a human polar body accurately reflects its sibling oocyte / A. Reich, P. Klatsky, S. Carson, G. Wessel. *The Journal of biological chemistry*. 2011. Vol. 286, No. 47. pp. 40743–40749.
3. Rubio C. Use of array comparative genomic hybridization (array-cgh) for embryo assessment: clinical results. C. Rubio, L. Rodrigo, P. Mir [et al.]. *Fertility and sterility*. 2013. Vol. 99, No. 4. pp. 1044–1048.
4. Herrero J. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. Herrero, M. Meseguer. *Fertility and sterility*. 2013. Vol. 99, No. 4. pp. 1030–1034.
5. Chen A. A. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. A. A. Chen, L. Tan, V. Suraj [et al.]. *Fertility and sterility*. 2013. Vol. 99, No. 4. pp. 1035–1043.
6. Meseguer M. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. M. Meseguer, J. Herrero, A. Tejera [et al.]. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2011. Vol. 26, No. 10. pp. 2658–2671.
7. Wissing M. L. Impact of pcos on early embryo cleavage kinetics. M. L. Wissing, M. R. Bjerge, A. I. G. Olesen [et al.]. *Reproductive biomedicine online*. 2013.
8. Ciray H. N. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media-a sibling oocyte study. H. N. Ciray, T. Aksoy, C. Goktas [et al.]. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2012. Vol. 29, No. 9. pp. 891–900.
9. Zaninovic N. Impact of oxygen concentration on embryo development, embryo morphology and morphokinetics. N. Zaninovic, J. Goldschlag, H. Yin [et al.]. *Fertility and Sterility*. 2013. Vol. 100, No. 3. P. S240.
10. Fréour T. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. T. Fréour, L. Dessolle, J. Lammers [et al.]. *Fertility and sterility*. 2013. Vol. 99, No. 7. pp. 1944–1950.
11. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 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 (Oxford, England)*. 2011. Vol. 26, No. 6. pp. 1270–1283.
12. Yan J. Effect of maternal age on the outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer (ivf-et). J. Yan, K. Wu, R. Tang [et al.]. *Science China. Life sciences*. 2012. Vol. 55, No. 8. pp. 694–698.
13. Preutthipan S. Effect of maternal age on clinical outcome in women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (ivf-et). S. Preutthipan, N. Amso, P. Curtis, R. W. Shaw. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 1996. Vol. 79, № 6. pp. 347–352.
14. Eichenlaub-Ritter U. Genetics of oocyte ageing. U. Eichenlaub-Ritter. *Maturitas*. 1998. Vol. 30, No. 2. pp. 143–169.
15. Fragouli E. Chromosome abnormalities in the human oocyte. E. Fragouli, D. Wells, J. D. A. Delhanty. *Cytogenetic and genome research*. 2011. Vol. 133, No. 2–4. pp. 107–118.
16. Eichenlaub-Ritter U. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. U. Eichenlaub-Ritter, E. Vogt, H. Yin, R. Gosden. *Reproductive biomedicine online*. 2004. Vol. 8, No. 1. pp. 45–58.
17. Frattarelli J. L. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. J. L. Frattarelli, K. A. Miller, B. T. Miller [et al.]. *Fertility and sterility*. 2008. Vol. 90, No. 1. pp. 97–103.
18. Klonoff-Cohen H. S. The effect of advancing paternal age on pregnancy and live birth rates in couples undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer. H. S. Klonoff-Cohen, L. Natarajan. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004. Vol. 191, No. 2. pp. 507–514.
19. Bellver J. Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. J. Bellver, N. Garrido, J. Remohí [et al.]. *Reproductive biomedicine online*. 2008. Vol. 17, No. 5. pp. 595–604.
20. Muñoz M. Dose of recombinant fsh and oestradiol concentration on day of hcg affect embryo development kinetics. M. Muñoz, M. Cruz, P. Humaidan [et al.]. *Reproductive biomedicine online*. 2012. Vol. 25, No. 4. pp. 382–389.
21. Yilmaz N. Is there a detrimental effect of higher gonadotrophin dose on clinical pregnancy rate in normo-responders undergoing art with long protocol? N. Yilmaz, S. Yilmaz, H. Inal [et al.]. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2013. Vol. 287, No. 5. pp. 1039–1044.
22. Lammers J. Effect of female underweight on embryo morphokinetic using time-lapse. J. Lammers, T. Freour, C. Spingart, P. Barriere. *Human Reproduction*. 2013. No. 28 (Suppl. 1): P-085.
23. Navarro-Costa P. Incorrect dna methylation of the dazl promoter cpg island associates with defective human sperm. P. Navarro-Costa, P. Nogueira, M. Carvalho [et al.]. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2010. Vol. 25, № 10. pp. 2647–2654.
24. Ugajin T. The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function. T. Ugajin, Y. Terada, H. Hasegawa [et al.]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2010. Vol. 27, No. 2–3. pp. 75–81.
25. Maettner R. Quality of human spermatozoa: relationship between high-magnification sperm morphology and dna integrity. R. Maettner, K. Sterzik, V. Isachenko [et al.]. *Andrologia*. 2013.
26. Sunkara S. K. Association between the number of eggs and live birth in ivf treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. S. K. Sunkara, V. Rittenberg, N. Raine-Fenning [et al.]. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2011. Vol. 26, No. 7. pp. 1768–1774.
27. Kwee J. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with in vitro fertilization. J. Kwee, M. E. Elting, R. Schats [et al.]. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 2007. Vol. 5. P. 9.

Авторская справка
Грищенко Николай Григорьевич
Клиника репродуктивной медицины им. акад. В. И. Грищенко
Доктор медицинских наук, профессор, директор
61052, Украина, г. Харьков, ул. Карла Маркса, 25
e-mail: ngrishchenko@implant-ivf.com

Правдюк Алексей Игоревич
Клиника репродуктивной медицины им. акад. В. И. Грищенко

*Pravdyuk A. I., Gryshchenko M. G.,
Parashchuk V. Yu.*

MORPHOKINETIC CHARACTERISTICS AND IMPLANTATION POTENTIAL OF HUMAN EMBRYOS OBTAINED DURING ART CYCLES

Academician V. I. Gryshchenko Clinic for Reproductive
Medicine, Kharkov, Ukraine

Abstract. In this paper morphokinetics of embryos with known implantation was analyzed. Contrary to expectations, a significant number of the embryos from this group had the worst implantation prognosis when assessed with morphokinetics criteria classification only. Thus, applied classification did not accurately predict implantation of embryos in terms of our laboratory and clinical conditions. Probably, the predictive value of this classification can be improved by integrating data on the impact of various factors on the dynamics of the development of embryos in assisted reproduction cycles.

Some factors were evaluated for their impact on embryo morphokinetics during ART cycles. We found that application of different controlled ovarian stimulation protocols and gonadotropin dose is accompanied by changes in morphokinetic characteristic of embryos. However, both male and female age, the number of oocytes and number of normal forms of sperm in the ejaculate did not affect the kinetic parameters of embryo development. Further research is needed to identify all the spectrum of factors, which can affect the rate of embryo development.

Keywords: COS protocol, embryo, FSH, implantation, IVF, morphokinetics, time-lapse monitoring

REFERENCES

1. Sfontouris I. A. Non-invasive metabolomic analysis using a commercial nir instrument for embryo selection. I. A. Sfontouris, G. T. Lainas, D. Sakkas [et al.]. *Journal of human reproductive sciences*. 2013. Vol. 6, No. 2. pp. 133–139.
2. Reich A. The transcriptome of a human polar body accurately reflects its sibling oocyte. A. Reich, P. Klatsky, S. Carson, G. Wessel. *The Journal of biological chemistry*. 2011. Vol. 286, No. 47. pp. 40743–40749.
3. Rubio C. Use of array comparative genomic hybridization (array-cgh) for embryo assessment: clinical results. C. Rubio, L. Rodrigo, P. Mir [et al.]. *Fertility and sterility*. 2013. Vol. 99, No. 4. pp. 1044–1048.
4. Herrero J. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. Herrero, M. Meseguer. *Fertility and sterility*. 2013. Vol. 99, No. 4. pp. 1030–1034.
5. Chen A. A. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. A. A. Chen, L. Tan, V. Suraj [et al.]. *Fertility and sterility*. 2013. Vol. 99, No. 4. pp. 1035–1043.
6. Meseguer M. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. M. Meseguer, J. Herrero, A. Tejera [et al.]. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2011. Vol. 26, No. 10. pp. 2658–2671.
7. Wissing M. L. Impact of pcos on early embryo cleavage

kinetics. M. L. Wissing, M. R. Bjerger, A. I. G. Olesen [et al.]. *Reproductive biomedicine online*. 2013.

8. Ciray H. N. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media—a sibling oocyte study. H. N. Ciray, T. Aksoy, C. Goktas [et al.]. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2012. Vol. 29, No. 9. pp. 891–900.

9. Zaninovic N. Impact of oxygen concentration on embryo development, embryo morphology and morphokinetics. N. Zaninovic, J. Goldschlag, H. Yin [et al.]. *Fertility and Sterility*. 2013. Vol. 100, No. 3. P. S240.

10. Fréour T. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. T. Fréour, L. Dessolle, J. Lammers [et al.]. *Fertility and sterility*. 2013. Vol. 99, No. 7. pp. 1944–1950.

11. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 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 (Oxford, England)*. 2011. Vol. 26, No. 6. pp. 1270–1283.

12. Yan J. Effect of maternal age on the outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer (ivf-et). J. Yan, K. Wu, R. Tang [et al.]. *Science China. Life sciences*. 2012. Vol. 55, No. 8. pp. 694–698.

13. Preutthipan S. Effect of maternal age on clinical outcome in women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (ivf-et). S. Preutthipan, N. Amso, P. Curtis, R. W. Shaw. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 1996. Vol. 79, No. 6. pp. 347–352.

14. Eichenlaub-Ritter U. Genetics of oocyte ageing. U. Eichenlaub-Ritter. *Maturitas*. 1998. Vol. 30, No. 2. pp. 143–169.

15. Fragouli E. Chromosome abnormalities in the human oocyte. E. Fragouli, D. Wells, J. D. A. Delhanty. *Cytogenetic and genome research*. 2011. Vol. 133, No. 2–4. pp. 107–118.

16. Eichenlaub-Ritter U. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. U. Eichenlaub-Ritter, E. Vogt, H. Yin, R. Gosden. *Reproductive biomedicine online*. 2004. Vol. 8, No. 1. pp. 45–58.

17. Frattarelli J. L. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. J. L. Frattarelli, K. A. Miller, B. T. Miller [et al.]. *Fertility and sterility*. 2008. Vol. 90, No. 1. pp. 97–103.

18. Klonoff-Cohen H. S. The effect of advancing paternal age on pregnancy and live birth rates in couples undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer. H. S. Klonoff-Cohen, L. Natarajan. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004. Vol. 191, No. 2. pp. 507–514.

19. Bellver J. Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. J. Bellver, N. Garrido, J. Remohí [et al.]. *Reproductive biomedicine online*. 2008. Vol. 17, No. 5. pp. 595–604.

20. Muñoz M. Dose of recombinant fsh and oestradiol concentration on day of hcg affect embryo development kinetics. M. Muñoz, M. Cruz, P. Humaidan [et al.]. *Reproductive biomedicine online*. 2012. Vol. 25, No. 4. pp. 382–389.

21. Yilmaz N. Is there a detrimental effect of higher gonadotrophin dose on clinical pregnancy rate in normo-responders undergoing art with long protocol? N. Yilmaz, S. Yilmaz, H. Inal [et al.]. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2013. Vol. 287, No. 5. pp. 1039–1044.

22. Lammers J. Effect of female underweight on embryo morphokinetic using time-lapse. J. Lammers, T. Freour, C. Splingart, P. Barriere. *Human Reproduction*. 2013. No. 28 (Suppl. 1): P-085.

23. Navarro-Costa P. Incorrect dna methylation of the dazl promoter cpG island associates with defective human sperm. P. Navarro-Costa, P. Nogueira, M. Carvalho [et al.]. *Human reproduction (Oxford,*

England). 2010. Vol. 25, № 10. pp. 2647–2654.

24. Ugajin T. The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function. T. Ugajin, Y. Terada, H. Hasegawa [et al.] Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2010. Vol. 27, No. 2–3. pp. 75–81.

25. Maettner R. Quality of human spermatozoa: relationship between high-magnification sperm morphology and dna integrity. R. Maettner, K. Sterzik, V. Isachenko [et al.] Andrologia. 2013.

26. Sunkara S. K. Association between the number of eggs and live birth in ivf treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. S. K. Sunkara, V. Rittenberg, N. Raine-Fenning [et al.] Human reproduction (Oxford, England). 2011. Vol. 26, No. 7. pp. 1768–1774.

27. Kwee J. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with in vitro fertilization.

J. Kwee, M. E. Elting, R. Schats [et al.] Reproductive biology and endocrinology: RB&E. 2007. Vol. 5. P. 9.

Authors

Gryshchenko Mykola G.

Academician V. I. Gryshchenko Clinic for Reproductive Medicine

DM, professor, director

25 Karl Marx str. Kharkov, Ukraine, 61052

e-mail: gryshchenko@implant-ivf.com

Pravdyuk Alexey I.

PhD, embryologist

e-mail: pravduke@yandex.ru

Parashchuk Valentin Yu.

PhD, physician

e-mail: parashchuk@implant-ivf.com

УДК 616.71

Судакова Л. А., Ходос М. Я., Шипицин Г. Э., Видревич М. Б., Брайнина Х. З.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА «АНТИОКСИДАНТ» ДЛЯ ОЦЕНКИ ОКСИДАНТ/АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЭЯКУЛЯТА

ФГБУ ВПО Уральский государственный экономический университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация;

ЗАО «Центр семейной медицины», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Оксидантный стресс (ОС) — дисбаланс между интенсивностью генерации активных форм кислорода (АФК) и активностью системы антиоксидантной защиты организма — является одной из причин или следствием ряда патологических состояний, в том числе нарушений репродуктивной функции мужчин. О наличии такой связи свидетельствует большое количество публикаций. Проблема заключается в противоречивости и неоднозначности выводов, что обусловлено отсутствием общепринятого определения окислительного стресса, разнообразием и несопоставимостью методов и единиц измерения, количественного выражения экспериментальных данных и их интерпретации.

В работе представлен предложенный нами ранее потенциометрический метод определения оксидантной/антиоксидантной активности эякулята и прибор для его реализации «Антиоксидант».

Представлены результаты пилотного исследования семенной жидкости здоровых и мужчин с патологиями репродуктивной сферы. Установлено, что исследуемые образцы могут обладать как только антиоксидантной активностью (АОА), так и оксидантной/антиоксидантной активностью (ОА/АОА). Обнаружено, что эякулят инфертильных мужчин имеет более высокий уровень оксидантной активности по сравнению с фертильными. Эякулят около 27 % респондентов с нормоспермией обладает антиоксидантной и оксидантной активностью.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования разработанного потенциометрического анализатора «Антиоксидант» для индикации ОС фертильных и бесплодных мужчин.

Ключевые слова: окислительный стресс, мужское бесплодие, оксидантная активность, антиоксидантная активность, прибор Антиоксидант

В норме АФК, такие как, например, супероксид анион, гидроксильные радикалы и перекись водорода являются продуктами различных физиологических и метаболических процессов, происходящих в организме. Когда нарушается баланс двух процессов: производство АФК и нейтрализация их избытка за счет действия антиоксидантной системы организма, возникает ОС, который может стать одной из причин возникновения заболеваний, в том числе приводящих

к бесплодию [1], или сопутствовать им. Отмечают изменение параметров спермограммы (подвижность, морфология, объем, количество лейкоцитов), фрагментацию ДНК сперматозоидов. Данные о взаимосвязи указанных параметров и ОС неоднозначны. Причиной расхождений может быть отсутствие общепринятого определения окислительного стресса, разнообразие и несопоставимость единиц измерения и количественного выражения экспериментальных данных и их интерпретации.

На наш взгляд, наиболее корректно использовать термин «окислительный стресс» для обозначения дисбаланса между продукцией оксидантов, инициирующих процессы свободнорадикального окисления, и активностью системы антиоксидантной защиты организма и рассматривать антиоксидантный/оксидантный баланс организма как интегральный показатель здоровья человека.

В настоящее время не существует единой меры определения ОС и/или степени его выраженности. Измеряют различные параметры, такие как АФК, продукты перекисного окисления биомолекул, ферментативные и неферментативные антиоксиданты, а также общую (суммарную) антиоксидантную активность (рис. 1).



Рис. 1. Методы мониторинга ОС.

АФК преимущественно имеют радикальную природу. Наличие неспаренного электрона делает радикал чрезвычайно