



ИВАНОВА ОЛЬГА ВИКТОРОВНА

**Морфологическая оценка
функциональной способности гамет и
эмбрионов человека после
криоконсервации**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Самара – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный
руководитель:
Официальные
оппоненты:

Шурыгина Оксана Викторовна,
доктор медицинских наук, доцент

Банин Виктор Васильевич, профессор, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой морфологии человека ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Янин Владимир Леонидович, профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии бюджетного учреждения высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия».

Ведущая организация:
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет).

Защита диссертации состоится «14» октября 2020 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета КФУ 03.06 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76, в зале заседания ученого совета (ауд.208).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете

Автореферат разослан «__» ____ 2020 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета, д.б.н., профессор,  Т.А. Аникина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Изучение цитофизиологии гамет и эмбрионов, влияние криоконсервации на процессы их жизнедеятельности является одним из наиболее актуальных направлений исследований биологии и медицины [Kasai M., 2004; Cobo A., 2011; Johnson M.H., 2011; Rienzi L. et al., 2017; Sztein J.M. et al., 2018; Ernstad E.G. et al., 2019; Grynberg M., 2019]. Замораживание клеток временно приостанавливает протекающие биологические процессы с последующим восстановлением их структуры и функции после оттаивания. Сохранение способности гамет и эмбрионов к развитию зародыша и плода после криоконсервации позволяет реализовать репродуктивный потенциал у пациентов с бесплодием. По оценкам ВОЗ, бесплодием страдают 5% населения земного шара, что составляет 48,5 млн. пар, численность которых растет с каждым годом [Mascarenhas M.N. et al., 2012]. Несмотря на имеющиеся успехи в области его лечения, менее 50% начатых циклов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) приводят к беременности [Assisted Reproductive Technology, 2012; ART in Europe, 2015; Ferraretti A. P. et al., 2017]. Тем не менее, по данным регистров ВРТ, частота наступления беременности после криоконсервации с каждым годом становится выше, в сравнении с переносами в «свежих» циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [Assisted Reproductive Technology Surveillance, 2019; ВРТ в России Корсак В.С. и др., 2019; Bai F. et al., 2020]. В связи с чем представляется принципиально важным определение оптимальной для криоконсервации эмбрионов стадии их развития. Селекция эмбрионов для замораживания позволит достичь высокого уровня их выживаемости при оттаивании, а следовательно, и увеличит шансы пациентов на наступление беременности и рождение ребенка.

Очевиден и другой, социальный аспект проблемы сохранения репродуктивного здоровья человека. Демографическая проблема прироста населения является актуальной для большинства стран мира. С помощью репродуктивных технологий ежегодно рождается до 2% детей во всем мире [Faddy et al., 2018].

В настоящее время для криоконсервации гамет и эмбрионов используется технология сверхбыстрого замораживания – витрификация. В данном случае используются высокие концентрации криопротекторов, которые замещают собой молекулы воды в клетках и не позволяют образовываться кристаллам льда. Межклеточная жидкость мгновенно переходит в стекловидное состояние, что позволяет сохранять целостность

клеток в процессе оттаивания [Kuwayama M. et al., 2005; 2007; Best, 2015; Elliott et al., 2017]. Получение первых беременностей после успешной витрификации ооцитов и эмбрионов человека позволило включить эту технологию в практику большинства эмбриологических лабораторий [Palermo et al., 1992; Mazur et al., 2004; Lieberman, Tucker 2006; Li et al., 2014]. Однако, данное направление нельзя считать исчерпанным, поскольку наличие широкого круга нерешенных проблем ещё требует дополнительных исследований. Крайне актуальным остается вопрос выживаемости эмбрионов и их функциональной способности при использования различных видов носителей для хранения замороженного биологического материала (прямой и опосредованный контакт с жидким азотом).

Криоконсервация гамет является единственным способом сохранения репродуктивной функции у пациентов с онкологической патологией, которым предстоит хирургическое, химиотерапевтическое или радиологическое лечение, а также для пациентов с системными заболеваниями, тяжелой эндокринной патологией. Данные специальной литературы о преимуществе использования нативного материала (ооцитов, сперматозоидов) в практике эмбриологических лабораторий по сравнению с замороженным, достаточно противоречивы [Matson et al., 1997; Kuwayama et al., 2005; Kuwayama, 2007; Cobo et al., 2016]. В связи с чем весьма востребованным представляется проведение сравнительного анализа использования нативных и замороженных гамет для реализации их способности к развитию эмбрионов и наступлению беременности.

Генетический скрининг эмбрионов 5-6-х суток развития на наличие анеуплоидий по данным отдельных авторов позволяет более быстро достичь беременности при переносе в полость матки эуплоидной бластоцисты [McArthur 2008, Zegers-Hochschild, 2009; Schoolcraft, 2010; Ernstad et al., 2019]. Однако, данная тактика имеет свои ограничения, поскольку любые дополнительные манипуляции (криоконсервация, биопсия) повышают риск повреждения эмбриона и могут привести к остановке его развития. В этом отношении представляется важным определить, является ли криоконсервация после предварительно проведенной биопсии фактором, ограничивающим ее использование в случае генетического скрининга.

Таким образом, наличие спорных вопросов о морфологических критериях, используемых для селекции эмбрионов доимплантационного развития, оптимальных стадиях развития бластоцист для криоконсервации, преимуществах и недостатках использования нативного и замороженного биоматериала, влияния на выживаемость разных способов контакта с жидким азотом, предварительно проведенной биопсии, не позволяют иметь

целостное представление о функциональной способности гамет и эмбрионов после оттаивания. Изучение этих проблем имеет важное значение не только для развития фундаментальной, но и для практической медицины.

Целью работы явилось определение выживаемости и функциональной способности гамет, эмбрионов 5-6-х суток эмбрионального развития в зависимости от их структуры, а также при прямом и опосредованном контакте биологического материала с жидким азотом; предварительной проведенной биопсии.

Задачи:

1. Определить морфологические критерии эмбрионов 5-6-х суток эмбрионального развития для отбора с целью их криоконсервации, последующего размораживания и переноса в полость матки.

2. Оценить выживаемость гамет после размораживания и сравнить их функциональную способность к оплодотворению, развитию эмбрионов и вероятности наступления беременности при использовании свежего (нативного) и размороженного донорского материала (ооцитов и сперматозоидов).

3. Выявить взаимосвязи между особенностями структуры бластоцист и их выживаемостью, вероятностью наступления беременности после криоконсервации.

4. Изучить особенности выживаемости эмбрионов и их функциональную способность при прямом и опосредованном контакте с жидким азотом во время криоконсервации.

5. Оценить функциональный потенциал бластоцист 5-6-х суток эмбрионального развития и вероятность наступления беременности после предварительно проведенных биопсии и криоконсервации.

Научная новизна. Впервые в рамках проведенного исследования показано, что предложенная система оценки строения гамет и бластоцист 5-6-х суток эмбрионального развития позволяет осуществлять их качественную селекцию для замораживания, гарантируя высокий уровень выживаемости после оттаивания.

В работе показано, что процедура криоконсервации и оттаивания гамет позволяет сохранить их функциональную способность — обеспечивает развитие компетентных эмбрионов и не снижает вероятность наступления беременности.

Крайне важными являются сведения о том, что степень дифференцировки трофобласта и эмбриобласта бластоцисты коррелирует с уровнем выживаемости эмбрионов.

Новым следует признать факт, что стадия хетчинга (вылупления) бластоцист может быть расценена как своеобразный критический период для эмбрионов доимплантационного развития.

В рамках исследования доказано отсутствие негативного эффекта на развивающиеся эмбрионы сочетания процедур биопсии и замораживания при грамотном отборе бластоцист 5-6-х суток по предложенным морфологическим критериям.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в работе сведения об особенностях криоконсервации гамет и эмбрионов *in vitro* существенно расширяют имеющиеся представления о возможностях сохранения репродуктивного потенциала конкретного пациента и популяции человека в целом, а также о возможностях применения криоконсервации в рутинной практике эмбриологических лабораторий.

Приведенные данные убедительно доказывают, что ранжирование эмбрионов 5-6-х суток преимплантационного развития на основании их морфологической оценки позволяет отобрать эмбрионы отличного и хорошего качества для криоконсервации, сохранив их функциональные компетенции.

Детальный анализ выживаемости эмбрионов различных морфологических стадий развития позволил определить наиболее благоприятные для витрификации стадии эмбрионального развития *in vitro*. Такой дифференцированный подход к ранжированию бластоцист 5-6-х суток может быть использован как стандартная практика в работе эмбриологических лабораторий.

Доказано, что система замораживания при прямом контакте с жидким азотом демонстрирует более высокие показатели выживаемости и наступления клинической беременности.

Использование нативного и криоконсервированного биологического материала (ооцитов, сперматозоидов) позволяет заключить, что витрификация сохраняет их компетенции и способствует достижению сопоставимых показателей частоты наступления беременности.

Высокий уровень функциональной способности гамет и эмбрионов позволяет оценить технологию криоконсервации как весьма эффективную и использовать ее при различных клинических ситуациях, в том числе при проведении биопсии и генетического тестирования.

Основное положение, выносимое на защиту:

Выживаемость гамет и эмбрионов доимплантационного развития после предварительно проведенной криоконсервации определяется их

морфологической характеристикой. Замораживание позволяет сохранить функциональную способность и достигнуть сопоставимых с использованием нативного биологического материала клинических показателей (частота наступления беременности).

Достоверность полученных данных.

Достоверность результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования и их решением, использованием комплекса современных морфологических методов, достаточным объемом материала для каждой модели исследования, адекватным применением статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной литературы.

Апробация работы. Основные положения работы доложены на научных конференциях (2018-2019 гг.): XXVIII Ежегодной Международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (2018), XIII Международного конгресса по репродуктивной медицине (2018), Международной конференции КАРМ (2018), XXIX Ежегодной Международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (2019), научной конференции «Актуальные проблемы морфологии: эмбриональный и репаративный гистогенез, филогистогенез», посвященной 105-летию со дня рождения чл.-кор. АМН СССР проф. А. Г. Кнопре (2019), IV Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа медицины» (2019).

Публикации. Материалы диссертации нашли отражение в 14 научных публикациях, пять из которых входят в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК и изданиях, индексируемых базой данных SCOPUS, семь работ опубликованы в материалах различных зарубежных и всероссийских конференций.

Личное участие автора заключалось в сборе информации, планировании исследования, обработке статистических данных, их анализе и компиляции, формировании выводов, подготовке публикаций, научных статей и написании диссертационного исследования.

Структура и объем диссертационной работы

Работа изложена в традиционной форме. Состоит из оглавления, списка принятых сокращений, введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Работа представлена на 115 страницах, иллюстрирована 32 рисунками, 9 таблицами. Библиографический указатель включает 164 научные работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Изучение гамет и эмбрионов было проведено в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения на базе эмбриологических лабораторий ЗАО «Медицинская компания ИДК». Проведение клинического исследования одобрено Комитетом по биоэтике при ФГБОУ ВО «Самарском государственном медицинском университете» МЗ РФ (выписка из протокола №116 от 3 октября 2018 года).

Морфологическую оценку яйцеклеток проводили для выявления присутствия/отсутствия цитоплазматических и экстрацитоплазматических аномалий. Гаметы и эмбрионы были идентифицированы под контролем стереомикроскопа (Nikon, Япония). Для инкубации в условиях 5% O₂ использованы инкубаторы COOK (Австралия). Для культивирования эмбрионов до 5-6-х суток эмбрионального развития были использованы среды Vitrolife (Швеция).

Для витрификации ооцитов использованы среды и протоколы Kitozato (Япония), открытые виды носителей CryoTop (Япония). Для витрификации сперматозоидов использованы среды FertiPro (Франция), носители закрытого типа - соломинки 0,25 (Франция).

Для витрификации эмбрионов были использованы среды Irvine Scientific (США) в соответствии с рекомендациями завода-производителя. В ходе криоконсервации эмбрионов осуществлялся прямой и опосредованный контакт биологического объекта с жидким азотом с помощью носителей открытого CryoTop (Kitozato, Япония) и закрытого CryoTip (Irvine Scientific, США) типов.

Обработку спермы проводили методом центрифugирования в градиенте плотностей (концентраций 40% и 80% в HEPES-буферном растворе) по стандартной методике производителей культуральных сред FertiPro (Франция).

Генетический скрининг эмбрионов методом NGS проводили в лаборатории генетической диагностики группы компаний «Мать и дитя».

Биопсию трофобласта у бластоцист отличного и хорошего качества выполняли на 5-6 день культивирования. Забор 5-7 клеток выполняли при увеличении 400X с помощью микроманипуляторов RI (Cooper Surgical, Denmark). Для нанесения специальных насечек блестящей оболочки применяли активный лазер Laser Octax, Vitrolife (Германия). Для последующей отмычки и аспирации применяли микропипетки COOK

(Ирландия), после чего образцы передавались для проведения генетического скрининга в генетическую лабораторию.

Структуру эмбриона после размораживания оценивали под контролем инвертированного микроскопа Olympus IX-73. В качестве количественного анализа эмбрионов была использована система анализа изображений Octax EyeWare, Vitrolife (Германия) (рис. 6, 7).

Оценку выживаемости эмбрионов после размораживания проводили с помощью программного обеспечения Octax EyeWare, определяли 25%, 50%, 75%, 100% неповрежденных клеток у эмбриона.

При наличии у эмбриона менее 50% дегенеративных клеток его считали выжившим (пережившим криоконсервацию) и способным к дальнейшему развитию (Edgar D.H. et al., 2000; Liebermann J. et al., 2006; Kuwayama M., 2007, Loutradi K.E. et al., 2008)

Для оценки результатов криоконсервации эмбрионов в практике лабораторий используется определение процента (%) выживаемости. Он является ключевым и рассчитывается по формуле:

$$\% \text{ выживаемости} = \frac{\text{количество выживших эмбрионов}}{\text{общее количество размороженных эмбрионов}} \times 100\%$$

Все другие основные показатели: процент оплодотворения, процент дробления, процент развития до бластоцисты были расчитаны в соответствии с The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART Laboratory performance indicators, ESHRE Special Interest Group of embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine (2017):

$$\% \text{ оплодотворения} = \frac{\text{количество ооцитов с 2PN, 2PB}}{\text{общее количество инъецированных ооцитов МП}} \times 100\%$$
$$\% \text{ дробления} = \frac{\text{количество дробящихся эмбрионов 2 дня}}{\text{количество ооцитов с 2PN, 2PB}} \times 100\%$$
$$\% \text{ дозрелости до бластоцисты} = \frac{\text{количество бластоцист}}{\text{общее количество ооцитов с 2PN, 2PB}} \times 100\%$$

Статистическую обработку результатов выполняли на компьютере в среде статистических вычислений R (R v.3.5.3, Studio v.1.1.463), первичный

ввод данных производили с помощью электронных таблиц MS Excel. Использовали методы описательной статистики, тесты для сравнения пропорций, в том числе точный биноминальный для малых выборок и одновыборочный тест пропорций с коррекцией непрерывности для больших выборок.

Контрольными точками были определены: % выживаемости эмбрионов после витрификации, % положительного выявления хорионического гонадотропина человека ХГЧ (+) в крови, частота наступления беременности (ЧНБ) (%) и частота имплантации (ЧИ) (%) у пациентов в исследуемых группах.

ХГЧ (+) = отношение количества случаев с ХГЧ (+)/общее количество переносов X100%

ЧНБ = отношение количества подтвержденных УЗИ беременностей/общее количество переносов X100%

ЧИ = отношение количества плодных мешков (подтвержденных УЗИ)/общее количество перенесенных эмбрионов X100%

Общий объем исследованного биологического материала представлен в таблице №1.

Таблица №1 Характеристика материала и методов исследования

Объект	Методы исследования	Количество
Образец спермы	Микроскопический	120
Ооциты свежие (аутологичные)	Микроскопический Статистический анализ	35
Ооциты замороженные (донорские)	Микроскопический Статистический анализ	23
Ооциты свежие (донорские) для создания эмбрионов и последующей криоконсервации	Микроскопический Система визуализации изображений Статистический анализ	70
Эмбрионы 5-6-х суток развития (аутологичные)	Микроскопический Система визуализации изображений	1406

	Статистический анализ Метод сравнительной полногеномной гибридизации	20
--	--	----

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка качества эмбрионов является наиболее критичным этапом в работе лабораторий ВРТ. Культивирование эмбрионов до 5-6-х (118-144 часа после оплодотворения) суток позволяет им достичь стадии бластоцисты, которая имеет наибольший шанс на имплантацию, чем дробящийся эмбрион. Бластоциста человека представляет собой шар, заполненный жидкостью, у которого четко выделяется скопление клеток - внутренняя клеточная масса (ВКМ) или эмбриобласт и трофобласт (ТБ) (рис. 1).



Рисунок 1. Эмбрион 5-х суток развития, бластоциста человека 5АА, окуляр 10Х, объектив 40Х. ТБ – трофобласт, ВКМ – внутренняя клеточная масса

В ходе работы для упрощения оценки качества эмбрионов и их селекции для переноса и криоконсервации предложена и внедрена в практику лаборатории ВРТ ЗАО «Медицинская компания ИДК» система оценки качества эмбрионов (таблица 2).

По совокупности трех основных параметров (степень экспансии, степень сформированности внутренней клеточной массы ВКМ и трофобласта ТБ), наличия или отсутствия вакуолизации, фрагментации и других морфологических отклонений эмбрионы могут быть ранжированы на несколько групп (отличного, хорошего, удовлетворительного и посредственного качества).

Таблица № 2. Система оценки качества эмбрионов 5-6-х суток развития

Оценка качества эмбриона	Стадия развития бластоцисты
Эмбрион отличного качества	Бластоциста категории АА, АВ, ВА, ВВ, 3,4,5 степени экспансии
Эмбрион хорошего качества	Бластоциста категории ВС, СВ, СА, АС, 3,4,5 степени экспансии, ранняя бластоциста, начало кавитации без вакуолей и фрагментации
Эмбрион удовлетворительного качества	Бластоциста категории СС, 3,4,5 степени экспансии, ранняя бластоциста, начало кавитации с вакуолями или фрагментацией
Эмбрион посредственного качества	Морула, начало кавитации с вакуолями и фрагментацией

Разработанная система оценки качества эмбрионов 5-6-х суток преимплантационного развития позволяет быстро ранжировать бластоцисты для переноса и/или криоконсервации. Однако, нерешенным остается вопрос о наиболее благоприятной стадии развития бластоцисты для последующей витрификации.

Проведя исследование выживаемости эмбрионов в зависимости от стадии развития, мы получили данные, представленные в таблице 3.

Таблица № 3. Выживаемость эмбрионов 5-6-х суток в зависимости от стадии их развития, степени экспансии, сформированности внутренней клеточной массы и трофобласта

Нпп	Стадия развития эмбриона	Степень развития ВКМ	Степень развития трофобласта	Количество эмбрионов	Выживаемость, %
1	0.морула	<NA>	<NA>	5	100.00
2	1.нач.кав	<NA>	<NA>	156	90.33
3	2.ран.бласт	А.вкм1	А.тб1	1	100.00
4	2.ран.бласт	<NA>	<NA>	187	90.00
5	3.бласт	А.вкм1	А.тб1	41	100.00
6	3.бласт	А.вкм1	В.тб1	109	95.51
7	3.бласт	А.вкм1	С.тб1	3	100.00
8	3.бласт	В.вкм1	А.тб1	8	100.00
9	3.бласт	В.вкм1	В.тб1	141	90.33
10	3.бласт	В.вкм1	С.тб1	27	92.16
11	3.бласт	С.вкм1	С.тб1	2	100.00

12	3.blast	<NA>	<NA>	1	NA
13	4.blast	A.vkm1	A.tb1	193	96.96
14	4.blast	A.vkm1	B.tb1	168	97.90
15	4.blast	A.vkm1	C.tb1	1	100.00
16	4.blast	A.vkm1	<NA>	1	100.00
17	4.blast	B.vkm1	A.tb1	21	100.00
18	4.blast	B.vkm1	B.tb1	107	97.21
19	4.blast	B.vkm1	C.tb1	13	100.00
20	4.blast	C.vkm1	B.tb1	1	100.00
21	4.blast	C.vkm1	C.tb1	1	100.00
22	4.blast	<NA>	<NA>	1	100.00
23	5.blast	A.vkm1	A.tb1	43	96.43
24	5.blast	A.vkm1	B.tb1	15	100.00
25	5.blast	B.vkm1	A.tb1	7	100.00
26	5.blast	B.vkm1	B.tb1	8	81.82
27	6.blast	A.vkm1	A.tb1	5	100.00
28	6.blast	A.vkm1	B.tb1	4	75.00
29	6.blast	B.vkm1	B.tb1	3	100.00
30	<NA>	<NA>	<NA>	133	37.68
Итого				1406	94.49

Из таблицы 3 следует, что всего проанализирована выживаемость 1406 эмбриона на разных стадиях развития. Диапазон выживаемости достаточно широкий и составляет от 75 до 100%. Следует обратить внимание, что самый низкий уровень выживаемости демонстрируют эмбрионы 6 степени экспансии, а именно вылупившиеся бластоцисты. Возможно, это связано с отсутствием оболочки оплодотворения и цитотоксичным влиянием криопротекторов на клетки ТБ. Количество эмбрионов в этой группе крайне мало, чтобы сделать какие-либо однозначные выводы по данному поводу.

Анализ зависимости частоты наступления беременности от структуры размороженной и перенесенной в полость матки бластоцисты показал, что по признаку – степень экспансии – показатели ЧНБ возрастают с увеличением степени экспансии. От стадии начала кавитации бластоцисты до увеличенной бластоцисты (степень экспансии 4) наблюдается рост показателей ЧНБ, достигая максимума у вылупленных эмбрионов, лишенных оболочки оплодотворения. Однако, обращает на себя внимание снижение показателей в группе бластоцист со степенью экспансии 5, это эмбрионы, которые находились при замораживании в состоянии хетчинга (вылупления) (таблица № 4 и рисунок 2).

Таблица №4

Распределение положительных (да) и отрицательных (нет) узи по стадиям развития.

о.ст.1		узи			Total
		да	нет		
0.морула	N	1	4		5
	% стр.	20.0 %	80.0 %		
1.нач.кав	N	33	122		155
	% стр.	21.3 %	78.7 %		
2.ран.blast	N	61	127		188
	% стр.	32.4 %	67.6 %		
3.blast	N	147	182		329
	% стр.	44.7 %	55.3 %		
4.blast	N	251	255		506
	% стр.	49.6 %	50.4 %		
5.blast	N	27	45		72
	% стр.	37.5 %	62.5 %		
6.blast	N	8	4		12
	% стр.	66.7 %	33.3 %		
Total	N	528	739		1267
	% стр.	41.7 %	58.3 %		

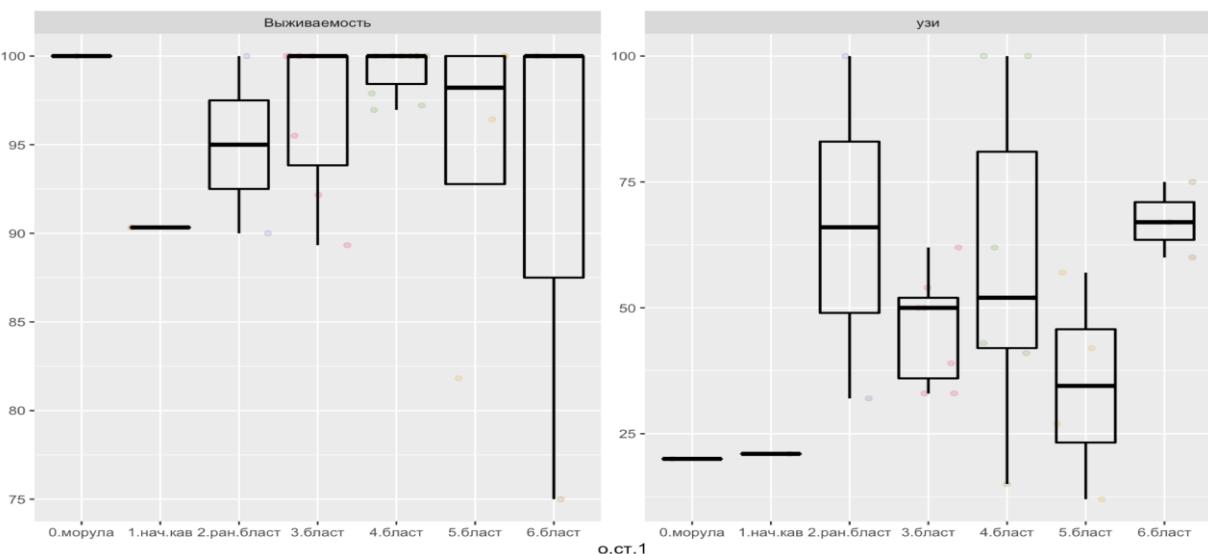


Рисунок 2. Уровни выживаемости и ЧНБ (УЗИ+) в зависимости от стадии развития бластоцитов

Различие в доле положительных УЗИ значимо различалось между стадиями ($p < 0.01$)

Проводя сравнительный анализ по следующему признаку – степени развития ВКМ, мы получили ожидаемые результаты: чем выше степень компактизации клеток в ВКМ, тем более высокие показатели ЧНБ (таблица 5, рис. 3). У бластоцист с ВКМ А (581 эмбрион) показатель ЧНБ составил 51,3%, у бластоцист с ВКМ В (334 эмбриона) – 39,8%. Различия значимы при уровне $p=0,004$.

Следует обратить внимание, что в группе бластоцист с внутренней клеточной массой С (клеток крайне мало или она отсутствует), мы получили 50% ЧНБ. Этот показатель вряд ли можно признать объективным вследствие крайне малочисленной группы (4 эмбриона).

Таблица №5.

Распределение положительных (да) и отрицательных (нет) УЗИ по ВКМ.

o.vkm.1	узи		Total
	да	нет	
A	N	298	283
	% стр.	51.3 %	48.7 %
B	N	133	201
	% стр.	39.8 %	60.2 %
C	N	2	2
	% стр.	50.0 %	50.0 %
Total	N	433	486
	% стр.	47.1 %	52.9 %

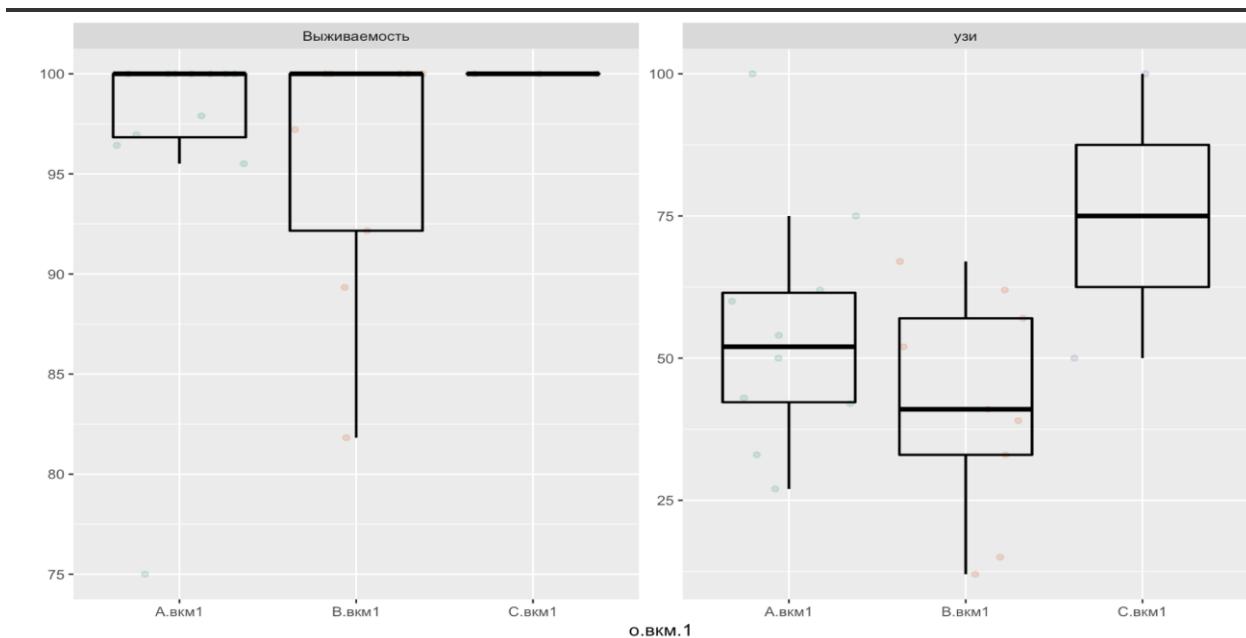


Рисунок 3. Уровни выживаемости и ЧНБ (УЗИ+) в зависимости от степени развития ВКМ

Выраженность ТБ, степень развития которого является наиболее значимой в процессе имплантации, напрямую коррелирует с данными ЧНБ (таблица 6, рис. 4).

При анализе 918 эмбрионов мы получили, что бластоцисты с ТБ класса А (318) дают наиболее показатели – 57,5% ЧНБ, бластоцисты с ТБ класса В (553) – 42,9% ЧНБ, с ТБ класса С – 27,7% ЧНБ. Эти различия достоверны при уровне значимости $p < 0,01$.

Таблица №6.

Распределение положительных (да) и отрицательных (нет) узи по ТБ.

о.тэ.1		узи		Total
		да	нет	
A	N	183	135	318
	% стр.	57.5 %	42.5 %	
B	N	237	316	553
	% стр.	42.9 %	57.1 %	
C	N	13	34	47
	% стр.	27.7 %	72.3 %	
Total	N	433	485	918
	% стр.	47.2 %	52.8 %	

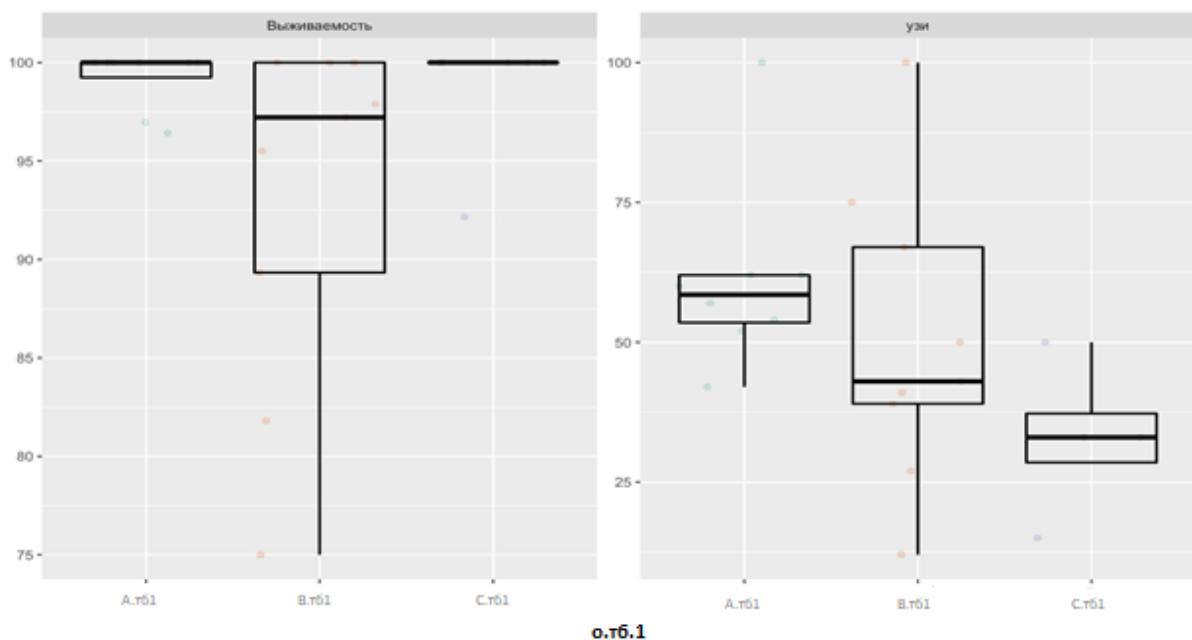


Рисунок 4. Уровни выживаемости и ЧНБ (УЗИ+) в зависимости от выраженности ТБ.

Таким образом, проводя сравнительный статистический анализ, было выявлено влияние всех компонентов оценки бластоцист – стадии, степени сформированности ВКМ и ТБ на степень выживаемости и уровень частоты наступления беременности. Эмбрионы с наиболее высоким уровнем развития ВКМ А и ТБ А дают наиболее высокие результаты. Неожиданными получены результаты по ЧНБ в группе эмбрионов с ВКМ С (50%), вряд ли их можно считать закономерными с учетом малого количества случаев (4). Степень экспансии бластоцист также показывает прямую связь с ЧНБ, исключением являются бластоцисты 5 стадии преимплантационного развития (blastocysts with hatching). По всей вероятности, этот энергетически активный процесс для эмбриона (когда эмбрион экспандирует через определенные промежутки времени) крайне важен. Эмбрион пытается найти наиболее благоприятное место для разрыва оболочки оплодотворения и выхода из нее. По сути, эта стадия развития является своеобразным критическим периодом для эмбриона. Соответственно, в этот момент, он представляется наиболее уязвимым для воздействия внутренних и внешних факторов. Витрификация определенным образом в этот момент и является тем самым внешним фактором, который определяет более низкие показатели ЧНБ у эмбрионов данной стадии развития.

Для оценки эффективности процедуры замораживания при прямом и опосредованном контакте эмбриона с жидким азотом учитывали следующие критерии: выживаемость, средний балл эмбриона/ов на перенос, среднее количество эмбрионов на перенос, частота наступления беременности (таблица 7).

Таблица №7. Основные показатели криоконсервации при прямом и опосредованном контакте эмбрионов с жидким азотом

	Закрытый носитель (CryoTip)	Открытый носитель (CryoTop)	p, значим.
Средний возраст пациента, лет	34,1	33,5	
Количество размороженных эмбрионов	611	678	
Выживаемость, %	84,8%	95,1%	<0,0001*
Средний балл	3,9	4,1	

эмбрионов/перенос			
Среднее количество эмбрионов/перенос	1,2	1,3	
ЧНБ, % (на перенос)	39,5	44,2	0,001*

Результаты проведенного анализа позволяют сделать вывод о более высоком уровне выживаемости эмбрионов при использовании открытых носителей при криоконсервации. Скорее всего это происходит за счет прямого контакта объекта с жидким азотом и высокой скорости замораживания, что может быть решающим фактором, определяющим успех витрификации на открытых носителях. Показатели частоты наступления беременности, которые напрямую зависят от уровня выживаемости, также демонстрируют статистически значимую разницу в пользу использования открытых носителей в эмбриологической практике.

Для оценки влияния комплекса факторов (компетенции ооцитов, результатов генетического скрининга, витрификации) на выживаемость эмбрионов и клинические показатели у пациентов был проведен ретроспективный анализ. Были выбраны 4 группы пациентов с переносом только одного эмбриона (SET – single embryo transfer):

1 группа – пациенты с проведением генетического тестирования методом NGS, где были взяты эмбрионы с генетически эуплоидным статусом с использованием собственных ооцитов (n=20);

2 группа – пациенты без применения NGS, с использованием собственных ооцитов (n=446);

3 группа – пациенты без применения NGS, с использованием донорских ооцитов (n=8).

1, 2 и 3 группы имели сопоставимый возраст (34,1 - 34,3 - 34,6 лет). Однако, с учетом небольшого количества случаев в 3 группы, была сформирована 4 группа наблюдения (циклы без применения NGS, с использованием донорских ооцитов, n=62), где средний возраст пациентов составил 42,3 года. Всего проанализировано 536 криоциклов.

Для оценки влияния витрификации на развивающиеся эмбрионы, подвергающиеся предварительной биопсии эмбриона с забором 3-5 клеток трофобласта, проанализированы результаты выживаемости бластоцист. Биопсия эмбрионов сама по себе является инвазивной процедурой, имеющей риски его повреждения и остановки их в развитии. Полученные в ходе исследования данные приведены в таблице №8.

Таблица №8. Показатели выживаемости, ХГЧ, ЧНБ и ЧИ в криоциклах у пациентов с применением/отсутствием генетического скрининга и донорского материала

группа	n	средн. возраст	выживаемость	различия	ХГЧ(+)	различия	ЧНБ	различия	ЧИ	различия
1 NSd	20	34,10	100,00	* 3 (p=0,060)	60,00		60,00	* 2 (p=0,032)	60,00	* 2 (p=0,049)
2 nSd	44 6	34,34	91,96	** 3 (p<0,001)	41,03		35,20		36,36	
3 nSD	8	34,62	84,62		62,50	** 2 (p<0,001)	62,50	** 2 (p<0,001)	62,50	** 2 (p<0,001)
4 nSDv	62	42,27	92,94		62,90	** 2 (p<0,001)	58,06	** 2 (p<0,001)	56,45	** 2 (p<0,001)

*** В столбце различия указан номер группы с которым имеются значимые различия**

Данные таблицы показывают, что частота выживаемости эмбрионов в 1 группе составила 100%. Это свидетельствует о том, что витрификация не ухудшает качество и жизнеспособность эмбриона после биопсии. Однако, максимальная выживаемость может быть связана, в том числе, и с предварительной селекцией и корректным отбором эмбрионов для биопсии.

Проведенный комплексный анализ влияния компетенции ооцитов, генетического скрининга и витрификации на частоту выживаемости эмбрионов, клинические показатели у пациентов позволяет сделать следующие выводы: процесс витрификации не оказывает негативного влияния на качество и жизнеспособность эмбрионов, в том числе и после проведенной биопсии эмбрионов. Качество ооцитов, их уровень пloidности являются определяющими прогностическими факторами наступления беременности. Генетический скрининг на анеуплоидии значительно улучшает клинические показатели и результаты, делая их сопоставимыми с аналогичными у пациентов с использованием донорских ооцитов.

Использование гамет и эмбрионов в качестве донорского материала для лечения пациентов с бесплодием регламентировано рамками действующего Приказа №107 МЗ РФ, в связи с чем проблема качественной витрификации сперматозоидов и яйцеклеток весьма актуальна. Для замораживания отбираются морфологически зрелые гаметы.

Мы провели ретроспективный анализ основного показателя — подвижности сперматозоидов у здоровых мужчин (доноров спермы). Одними

из основных характеристик, определяющих качество сперматозоидов и их криотолерантность, являются кинетические характеристики. Оценивалась подвижность сперматозоидов до процедуры замораживания и после размораживания.

Проанализировано 120 образцов спермы здоровых мужчин (доноров спермы). После размораживания подвижность сперматозоидов снижалась в 1,1-1,8 раза от исходной. В 100 случаях (83%) снижение подвижности после размораживания составило 1,2-1,5 раза от исходной. Исследование показало, что в 25% случаев имела место низкая криотолерантность сперматозоидов. Отобранные образцы спермы были использованы в дальнейшем для оплодотворения в программах ВРТ. ЧНБ в программах ЭКО/ИКСИ с использование криоконсервированных донорских сперматозоидов составила 42%.

Для оценки влияния витрификации ооцитов мы предприняли сравнение результативности при использовании донорских нативных ооцитов и замороженных (таблица 9).

Из приведенных данных следует, что показатели в группе витрифицированных ооцитов по сравнению с группой нативных ооцитов имеют статистически значимые различия только по показателю дробления. Это может быть следствием нарушением восстановления веретена деления, неполного восстановления органелл ооцита после размораживания. Остальные эмбриологические показатели, а также клинические (ЧНБ, ЧИ) при использовании свежих и замороженных ооцитов не различаются, что позволяет использовать технологию криоконсервации ооцитов на эмбриологическом этапе программ ВРТ без потери снижения шанса на получение беременности.

Таблица 9. Основные показатели качества программ ВРТ при использовании нативных (свежих) и витрифицированных (замороженных) ооцитов

Показатели	Нативные (свежие) ооциты	Витрифицированные (замороженные) ооциты	r, знач.
Количество случаев	35	23	
Средний возраст пациентов, лет	38,9	38,8	
Среднее количество ооцитов, переданных	9,6	9,3	

пациенту			
% размораживания	Не оценивалось	90%	
% оплодотворения	86,5%	73,1%	0,061
% дробления	98,4%	84,2%	0,018*
% дорастания до бластоцисты	61,9%	53,4%	0,170
Среднее количество эмбрионов на перенос	1,2	1,2	
ХГЧ+	48,6%	56,5%	0,219
ЧНБ	45,7%	47,8%	0,470
ЧИ	44,1%	39,3%	0,394

Таким образом, витрификация гамет в практике лабораторий ВРТ позволяет сохранить морфофункциональный потенциал клеток и возможность их использования в будущем, а также осуществлять накопление ооцитов и сперматозоидов, создавать криобанки собственных гамет пациентов и донорских. Использование донорского материала для лечения бесплодия позволяет гарантировать пациентам в том числе и снижение риска возможности переноса гемоконтактных инфекций (гепатит, ВИЧ и др.) Витрификация гамет позволяет сохранить их нормальный морфологический статус и применять данную технологию наравне с нативным материалом без снижения качества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведено определение выживаемости гамет, эмбрионов и их функциональной способности в зависимости от структуры, особенностей контакта биологического материала с жидким азотом и предварительно проведенной биопсии бластоцист. Было установлено, что степень экспансии, структура эмбриобласта и трофобласта имеет корреляции со степенью выживаемости и вероятностью наступления беременности. Также показано, что вид контакта биологического материала с жидким азотом влияет на исходы криоконсервации. При прямом контакте показатели выживаемости бластоцист и клинической беременности выше. В работе продемонстрировано, что предварительно проведенная биопсия трофобласта и криоконсервация бластоцист не ухудшают их функциональный потенциал после размораживания.

Результаты нашего исследования позволили доказать, что криоконсервация гамет в программах репродуктивных технологий может быть использована, не снижая шансы на беременность.

Таким образом, криоконсервация гамет и эмбрионов создает уникальные возможности для выполнения многоплановых программ по лечению бесплодия, имеет большое значение для будущего репродуктивной медицины и повышения клинической эффективности ВРТ.

Выводы:

1. Морфологическими критериями эмбрионов 5-6-х суток эмбрионального развития отличного и хорошего качества являются бластоцисты с эмбриобластом и трофобластом категории А и В, криоконсервация и размораживание которых обеспечивает высокий уровень их выживаемости и сохранение функционального потенциала.
2. Криоконсервация гамет человека не снижает в целом их функциональной активности и позволяет достигать сопоставимой частоты наступления беременности по сравнению с использованием нативного биологического материала.
3. Выживаемость эмбрионов раннего преимплантационного развития имеет широкий диапазон (от 75% до 100%). Самый низкий уровень выживаемости демонстрируют вылупившиеся бластоцисты, что связано с отсутствием оболочки оплодотворения и возможным цитотоксичным влиянием криопротекторов на клетки трофобласта. Размер бластоцисты, степень сформированности внутренней клеточной массы и трофобласта влияют на частоту наступления беременности: чем выше степень дифференцировки трофобласта и эмбриобласта у бластоцисты, тем более высока вероятность наступления беременности
4. Выживаемость эмбрионов и частота наступления беременности имеют более высокие показатели в группе, в которой осуществлялся прямой контакт эмбриона с жидким азотом во время криоконсервации в сопоставлении с группой, где происходил опосредованный контакт бластоцисты с жидким азотом, и эта разница статистически значима.
5. Криоконсервация позволяет проводить биопсию и генетический скрининг эмбрионов 5-х и 6-х суток эмбрионального развития, демонстрируя высокий уровень выживаемости при размораживании, тем самым обеспечивая наиболее высокие показатели частоты наступления беременности при переносе в полость матки эуплоидного эмбриона, сопоставимые с использованием донорского материала (ооцита).

6. Криоконсервация гамет и эмбрионов может быть эффективным инструментом для резервации их биологической компетенции, что позволяет использовать ее для длительного сохранения репродуктивного потенциала.

Практические рекомендации:

1. Предложенная в рамках исследования система оценки качества эмбрионов позволяет по совокупности морфологических критериев оценить и ранжировать эмбрионы 5-х и 6-х суток эмбрионального развития для переноса и/или криоконсервации, что может быть использовано в рутинной практике лаборатории ВРТ
2. Криоконсервация гамет, особенно донорских, позволяет использовать их в рамках донорских программ без рисков передачи гемоконтактных инфекций реципиентам и снижения показателей клинической беременности, в том числе создавая банки собственных и донорских ооцитов для реализации репродуктивной функции в будущем.
3. Проведение витрификации бластоцист 5-6-х суток эмбрионального развития позволяет осуществлять биопсию трофобласта и генетический скрининг, в результате повышая частоту наступления беременности при переносе эуплоидного эмбриона до уровня, сопоставимого с программой использования донорских ооцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По материалам диссертации опубликовано 14 работ (3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 2 статьи в зарубежных журналах, индексируемых SCOPUS, 2 статьи в прочих изданиях, 1 тезисы всероссийской и 6 тезисов международных конференций)

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Иванова, О.В. Оценка эффективности криоконсервации гамет и эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий / О.В. Иванова, О.В. Шурыгина, Д.Ю. Русаков, Т.В. Быкова, А.А. Петрова, С.Н. Юхимец, О.В. Кулакова, С.З. Юлдашев // Морфологические ведомости – Morphological Newsletter. – 2019, Том 27 Выпуск 3.– С. 46-50.

2. Шурыгина, О.В. Ретроспективный анализ 563 эмбриологических протоколов криоциклов: влияние компетенции ооцитов и генетического скрининга эмбрионов человека на результаты витрификации / О.В. Шурыгина, О.В. Иванова, С.Н. Юхимец, С.З. Юлдашева, Д.Ю. Русаков, О.В. Кулакова // Морфологические ведомости – Morphological Newsletter. – 2020, Том 28 Выпуск 1.– С. 51-56.
3. Иванова, О.В. Показатели выживаемости и клинической эффективности витрифицированных бластоцист человека в практике эмбриологических лабораторий / О.В. Иванова, О.В. Шурыгина, А.А. Петрова, С.Н. Юхимец, О.В. Кулакова, Д.Ю. Русаков, Н.Н. Демидова // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2020. – Т 9, №2. – С. 35-39.

Статьи в журналах, индексируемых SCOPUS:

1. Saraeva, N.V. Experience of using time lapse microscopy in the IVF program in patients with good ovarian reserve / N.V. Saraeva, N.V. Spiridonova, M.T. Tugushev, O.V. Shurygina, S.I. Arabadzhyan, O.V. Ivanova // Text : direct // Gynecological Endocrinology. – Volume 35, Published online: 18 Sep 2019. – Issue sup1 : Implantation – Molecular, Biological and Clinical Aspects – P. 15-17. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09513590.2019.1632090>
2. Shurygina, O.V. Assessment of survival of vitrified embryos depending on the stage of development / O.V. Shurygina, S.Z. Yuldasheva, O.V. Ivanova, N.N. Demidova // Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering. – Volume 45, 4th issue, ISSN web 2296-9845, Published online: Jun 2020. – Paper ID. 22-27.

В прочих изданиях:

1. Шурыгина, О.В. Ретроспективный анализ эффективности витрификации бластоцист человека в практике эмбриологических лабораторий / О.В. Шурыгина, А.А. Петрова, О.В. Иванова, Т.В. Быкова, О.В. Кулакова //Репродуктивная медицина (журнал Казахстанской Ассоциации репродуктивной медицины) – 2019, №4 (41). – С. 44-49.
2. Шурыгина, О.В. Новые возможности культивирования эмбрионов человека *in vitro* / О.В. Шурыгина, В.К. Беляков, Г.Б. Немковский, А.Б. Кузнецов, О.В. Иванова, М.Т. Тугушев, О.В. Кулакова // Морфология. – 2020. – Т 157, №1. – С. 75-78.

В сборниках тезисов и материалов конференций:

1. Шурыгина, О.В. Возможности современной оценки качества спермы / О.В. Шурыгина, Т.В. Быкова, А.А. Петрова, О.В. Иванова, С.З. Юлдашева // Сборник тезисов XXVIII Ежегодной Международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра». – Уфа, 2018. – С. 123-124.
2. Шурыгина, О.В. Настоящее и будущее клинической эмбриологии / Шурыгина О.В., Иванова О.В., Кулакова О.В., Юлдашева С.З. // Тезисы Международной конференции КАРМ в журнале «Репродуктивная медицина» - Алматы, 2018. - №4 - С.38.
3. Шурыгина, О.В. Эффективность различного типа носителей для замораживания эмбрионов в программах ВРТ / О.В. Шурыгина, Н.В. Сараева, М.Т. Тугушев, О.В. Иванова // Материалы XIII Международного конгресса по репродуктивной медицине. – Москва, 2019. – С. 394-395.
4. Шурыгина, О.В. Ключевые параметры эффективности криопрограмм и их корреляция с качеством эмбрионов (ретроспективный анализ) / О.В. Шурыгина, Т.В. Быкова, О.В. Иванова, А.А. Петрова// Сборник тезисов XXIX Ежегодной Международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра». – Ростов-на-Дону, 2019 – С. 111-112.
5. Иванова, О.В. Криоконсервация гамет как способ сохранения репродуктивного потенциала человека / О.В. Иванова, О.В. Шурыгина, Д.Ю. Русаков, Т.В. Быкова, О.В. Кулакова // Материалы докладов научной конференции «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МОРФОЛОГИИ: ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ И РЕПАРАТИВНЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ, ФИЛОГИСТОГЕНЕЗ», посвященной 105-летию со дня рождения чл.-кор. АМН СССР проф. А. Г. Кнорре. – Санкт-Петербург, 2019 - Морфология. – 2019. – Т 156, №6. – С. 98.
6. Иванова, О.В. Витрификация ооцитов человека как инструмент продления репродуктивного потенциала / О.В. Иванова, О.О. Попова, А.Ю. Петрова // Материалы IV Международной морфологической научно-практической конкурса-конференции студентов и молодых ученых «МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ – ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ ОСНОВА МЕДИЦИНЫ», посвященной 80-летию со дня рождения профессора В.Д. Новикова – Новосибирск, 2019. – С. 94-97.

7. Попова, О.О. Эффективность применения среды с повышенным содержанием гиалуроновой кислоты для переноса эмбрионов человека / О.О. Попова, О.В. Иванова, А.А. Петрова, Д.Ю. Русаков // Материалы IV Международной морфологической научно-практической конкурса-конференции студентов и молодых ученых «МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ – ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ ОСНОВА МЕДИЦИНЫ», посвященной 80-летию со дня рождения профессора В.Д. Новикова – Новосибирск, 2019. – С. 210-212.

E-mail автора: pathologywinkie@gmail.com

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлёвская, 18, Казанский федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета КФУ 03.06 Аникиной Татьяне Андреевне, факс: (843)238-76-01, e-mail: tania57vg1@rambler.ru.