

О. В. Шурыгина<sup>1,3</sup>, В. К. Беляков<sup>3</sup>, Г. Б. Немковский<sup>3</sup>, А. Б. Кузнецов<sup>3</sup>, О. В. Иванова<sup>1</sup>,  
М. Т. Тугушев<sup>2</sup>, О. В. Кулакова<sup>1</sup>

## НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

<sup>1</sup> Кафедра гистологии и эмбриологии (зав. — проф. Г. Н. Суворова); <sup>2</sup> кафедра репродуктивной медицины, клинической эмбриологии и генетики (зав. — канд. мед. наук М. Т. Тугушев), ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; <sup>3</sup> НИЛ экспериментальной эмбриологии, НИИ трансляционной медицины (зав. — проф. В. К. Беляков), Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова

**Цель** — провести сравнительный анализ эффективности технологии непрерывного видеомониторинга и стандартного культивирования эмбрионов человека in vitro.

**Материал и методы.** Проведено исследование 465 развивающихся эмбрионов человека с использованием технологии непрерывного видеонаблюдения. Оценивали морфокинетические параметры (временные промежутки первых дроблений, наличие/отсутствие реверсивного дробления, прямого деления зиготы на три бластомера) и внутриклеточные изменения (мультиноклеация, фрагментация, вакуолизация и др.). Группу контроля составили 512 эмбрионов доимплантационного развития при стандартной методике культивирования. Критериями эффективности были приняты стандартные ключевые показатели развивающихся эмбрионов (уровень оплодотворения, дорастания до бластоцисты, замораживания, коэффициент утилизации, частота наступления клинической беременности).

**Результаты.** Ключевые показатели доимплантационного развития эмбрионов не демонстрируют значительной разницы в группе наблюдения и контрольной. Однако уровень дорастания до бластоцисты, замораживания, коэффициент утилизации эмбрионов в группе с видеомониторингом были несколько выше, так же как и частота наступления беременности — 42,6 против 38,5%.

**Выводы.** Технология непрерывного видеомониторинга позволяет снизить неблагоприятное воздействие факторов внешней среды, повышая условия культивирования in vitro. Регистрация ключевых морфодинамических событий и их анализ позволяют более объективно оценивать доимплантационное развитие эмбрионов человека и отбирать на перенос наиболее перспективный к имплантации эмбрион.

**Ключевые слова:** эмбрион, культивирование, видеомониторинг, человек

Культивирование эмбрионов человека in vitro в практике эмбриологических лабораторий в настоящее время является достаточно отработанной и стандартизированной методикой. Качество сред, расходных материалов, технические возможности инкубаторов, предназначенные для роста и развития эмбрионов, позволяют максимально приблизить условия in vitro к условиям женского организма. Тем не менее, проблемы стабильности культивирования, снижения неблагоприятного воздействия внешних факторов, выявления надежных предикторов развивающегося эмбриона, имеющего наиболее высокие шансы к имплантации, крайне актуальны. Особенно значимы эти аспекты в целях безопасной и эффективной реализации стратегии переноса одного эмбриона в полость матки для предотвращения развития многоплодной беременности, рождения недоношенных и маловесных детей. В этой связи

применение неинвазивных технологий в современной эмбриологической лаборатории чрезвычайно востребовано. Видеомониторинг развития эмбрионов позволяет зафиксировать основные морфодинамические события и морфокинетические параметры, а также определить наличие цитоплазматических и экстрацитоплазматических проявлений — мультиноклеации, фрагментации, вакуолизации и др. и оценить их вклад в раннее развитие эмбрионов.

По данным многочисленных публикаций, морфокинетические особенности развивающегося эмбриона определяют в ряде случаев его дальнейшую судьбу [3, 5, 6]. Так, например, наличие прямого деления зиготы на три бластомера является неблагоприятным маркером и свидетельствует о высоком уровне анеуплоидии таких эмбрионов, реверсивное дробление свидетельствует о возможном нарушении цитокинеза. Короткий проме-

### Сведения об авторах:

Шурыгина Оксана Викторовна (e-mail: oks-shurygina@yandex.ru), Беляков Владимир Константинович, Немковский Глеб Борисович, Кузнецов Александр Борисович, Иванова Ольга Викторовна, Тугушев Марат Талгатович, Кулакова Олеся Викторовна, кафедра гистологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443001, г. Самара, ул. Чапаевская, 227

жуток между вторым и третьим дроблением является прогностически благоприятным признаком развивающегося эмбриона и чаще всего демонстрирует высокий уровень дорастания до стадии бластоцисты. Морфокинетические параметры начала компактизации эмбрионов, формирования бластоцисты определяют имплантационный потенциал эмбрионов человека. Зафиксированные отклонения в развитии являются факторами ранжирования эмбрионов и их отбора на перенос и криоконсервацию. Технология непрерывного культивирования позволяет, снижая влияние человеческого фактора, неблагоприятных факторов внешней среды в момент оценки развития эмбриона вне инкубатора и повышая объективность оценки с регистрацией основных морфодинамических и морфокинетических событий, повысить частоту наступления беременности и количество рожденных детей [2].

Цель исследования состояла в проведении сравнительного анализа эффективности технологии непрерывного видеомониторинга и стандартного культивирования эмбрионов человека *in vitro*.

В лаборатории вспомогательных репродуктивных технологий Клинического госпиталя ИДК (группа компаний «Мать и дитя») для неинвазивного мониторинга доимплантационного развития эмбрионов человека использовали мультигазовый инкубатор с пониженной концентрацией кислорода (5%) с системой видеонаблюдения Эмбриовизор (Весттрейд, Россия). Данное оборудо-

дование позволяет, не доставая чашку с развивающимися эмбрионами, оценить первые клеточные деления, определить временные интервалы дробления эмбрионов, компактизации и формирования бластоцист, а также обнаруживает внутриклеточные изменения. Культивирование эмбрионов осуществляли индивидуально в специальных микролунках чашек WOW (Vitrolife, Швеция) с применением универсальной среды Continuous Single Culture (Irvine Scientific, USA). Разрешение на проведение клинического исследования получено от комитета по биоэтике при Самарском государственном медицинском университете (выписка из протокола № 115 от 5 сентября 2018 года).

В программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) с применением видеомониторинга было проанализировано 465 развивающихся эмбрионов (средний возраст пациентов 32,6 года). Для переноса в полость матки были отобраны эмбрионы с правильным характером деления, отсутствием реверсивного дробления и внутриклеточных изменений.

Представлен последний кадр развивающихся эмбрионов 5-х суток развития в инкубаторе Эмбриовизор, оснащенный системой видеомониторинга (рисунки).

В этом режиме отображаются последние кадры для каждой лунки, полученные в процессе съёмки. Цветные рамки вокруг каждой чашки содержат информацию об избранном на момент просмотра назначении эмбриона. Рамка зелёного цвета говорит о том, что эмбри-

The screenshot displays the Embriovizor software interface. On the left, there is a sidebar with patient information (ID, name, age, sex, etc.) and a 'Список циклов' (Cycle List) table. The main area shows a 3x3 grid of microscope images of embryos at different stages of development. On the right, a 'Курс лечения' (Treatment Course) panel provides detailed data for the current cycle.

№ пункции	Дата начала	Тип цикла	Число ооцитов	Оплодотворено	Эмбрионы перенесено	Эмбрионы заморожено
20	24.09.2019	ICSI+IVF	9	0	1	5
21	24.09.2019	ICSI+IVF	9	0	2	3
22	23.09.2019	ICSI+IVF	9	2	2	3

  

Курс лечения	
Дата начала	21.09.2019
Дата блокировки	
Группа стимуляции	Antagonist protocol
Пункция фолликулов	
№ пункции	25
Тип цикла	ICSI+IVF
Дата пункции	20.09.2019
Инсеминация ДТ	20.09.2019 13:30:00
Тип ооцитов	Свежие
Источник ооцитов	Собств
Число ооцитов	9
Резюме культивирования	
Ооц в культивирование	
Оплодотворено	0
Разделилось	0
Компактизировано	0
Кол-во бластоцист	0
Экспандировалось	0
Эмбрионов перенесено	1
Эмбрионов культивируется	1
Эмбрионов заморожено	7
Эмбрионов утилизировано	0
Результат цикла	
Дата переноса	
Дата HCG	
Уровень HCG	
Статус HCG	
Клиническая беременность	
К-во плодных мешков	
Исход беременности	
Дата родов	

Просмотр последнего кадра видеосъёмки эмбрионов человека, 5-е сутки преимплантационного развития

он помечен как подлежащий переносу. Синяя рамка говорит о заморозке, красная — об утилизации. Рамка желтого цвета показывает, что решение ещё не принято. Серым цветом кодируется пустая микролунка.

В группу контроля вошли 512 эмбрионов (средний возраст пациентов 32,9 года), развитие которых осуществлялось в стандартных условиях культивирования с пониженной концентрацией кислорода (5%) — инкубаторы СООК (Австралия) без применения системы непрерывного культивирования с видеомониторингом.

Для оценки качества развивающихся эмбрионов в обеих группах применяли стандартную систему ключевых показателей (процент оплодотворения, дробления, дорастания до бластоцисты, замораживания, коэффициент утилизации) в соответствии с данными Венского консенсуса (The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators, 2017).

При анализе показателей оплодотворения, дробления развивающихся эмбрионов не обнаружено разницы. Однако уровень дорастания до бластоцисты и замораживания эмбрионов отличного и хорошего качества в группе с видеомониторингом был несколько выше, так же как и коэффициент утилизации (количество эмбрионов, использованных на перенос и криоконсервированных). В группе исследования дорастание до бластоцисты — 56,9% (в контрольной — 52,3%), замораживание — 45,0% (в контрольной — 39,6%), коэффициент утилизации — 50% против 35,5%. Результаты проведенного исследования подтверждают ранее полученные данные в других клиниках репродуктивной медицины с помощью подобной технологии [1]. Однако использование time-lapse-технологии в рутинной практике до сих пор остается дискуссионным вопросом [4]. Вместе с тем, формирование списка надежных морфокинетических предикторов позволяет проводить объективное ранжирование эмбрионов, снижая влияние человеческого фактора и субъективность оценки эмбрионов.

В проведенном исследовании среднее количество эмбрионов на перенос составило 1,2 в группе исследования, 1,4 — в группе контроля, частота наступления беременности — 42,6% против 38,5%. Полученные данные демонстрируют тенденцию повышения одного из основных клинических показателей (частота наступления беременности) программ ВРТ при уменьшении количества перенесенных эмбрионов, что значительно снижает вероятность получения многоплодной беременности со всеми вытекающими

возможными рисками и осложнениями (рождение недоношенных и маловесных детей).

На основании полученных данных, можно сделать вывод, что технология непрерывного культивирования эмбрионов *in vitro* с применением видеомониторинга позволяет снизить неблагоприятное воздействие факторов внешней среды, повышая качество культивирования и, тем самым, способствуя формированию большего количества эмбрионов отличного и хорошего качества. Возможность фиксации основных морфодинамических событий и их анализ позволяют более комплексно подходить к оценке развивающихся эмбрионов, проводить их ранжирование, отбирая на перенос наиболее перспективный к имплантации эмбрион.

В настоящее время происходит интенсивное развитие данной технологии. Ее перспективы заключаются в возможном сочетании с протеомикой и метаболомикой, а также применением алгоритмов искусственного интеллекта.

#### **Вклад авторов:**

*Концепция и дизайн исследования:* О. В. Ш.

*Сбор и обработка материала:* М. Т. Т., О. В. И.

*Статистическая обработка данных:* Г. Б. Н.

*Анализ и интерпретация данных:* О. В. Ш., Г. Б. Н., А. Б. К., В. К. Б.

*Написание текста:* О. В. Ш., Г. Б. Н., О. В. К.

#### **Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.**

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Armstrong S., Bhide P., Jordan V., Pacey A., Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assisted reproduction // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018. № 5. CD011320. Published on-line 2018 May 25. doi: 10.1002/14651858.pub3. PMID:PMC6494546PMID:2980045
2. Fishel S., Campbell A., Montgomery S., Smith R., Nice L., Duffy S., Jenner L., Berrisford K., Kellam L., Smith R., Foad F., Beccles A. Time-lapse imaging algorithms rank human preimplantation embryos according to the probability of live birth // *Reprod. Biomed. Online.* 2018. Vol. 37, № 3. P. 304–313. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.05.016. Epub 2018 Jun 22
3. Meseguer M. Time-lapse: the remaining questions to be answered // *Fertility and Sterility.* 2016. Vol. 105, Is. 2. P. 295–296. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.12.126>
4. Racowsky C., Wellington M.P. Effectiveness and safety of time-lapse imaging for embryo culture and selection: it is still too early for any conclusion? // *Fertility and sterility.* 2017. Vol. 108, № 3. P. 450–452.
5. Rubio I., Galán A., Larreategui Z., Ayerdi F., Bellver J., Herrero J. et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope // *Fertil Steril.* 2014. Vol. 102, № 5. P. 1287–1294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.738>
6. Wang S.X. The past, present, and future of embryo selection in *in vitro* fertilization: *Frontiers in Reproduction Conference* //

Yale J. Biol. Med. 2011 Dec; 84 (4). P. 487–490. PMID: 22180687  
PMCID: PMC3238312.

Поступила в редакцию 09.07.2019  
Получена после доработки 28.11.2019

## THE NEW OPPORTUNITIES OF HUMAN EMBRYO CULTIVATING IN VITRO

*O. V. Shurygina*<sup>1,3</sup>, *V. K. Belyakov*<sup>3</sup>, *G. B. Nemkovskiy*<sup>3</sup>,  
*A. B. Kuznezov*<sup>3</sup>, *O. V. Ivanova*<sup>1</sup>, *M. T. Tugushev*<sup>2</sup>,  
*O. V. Kulakova*<sup>1</sup>

**Objective** — comparative analysis of the effectiveness of time-lapse technology and the standard cultivation of human embryos in vitro.

**Material and methods.** A study of 465 developing human embryos using time-lapse technology was conducted. Morphokinetic parameters (the time intervals of the first cleavage, the presence/absence of the reverse cleavage, the direct division of the zygote into three blastomeres) and intracellular changes (multinucleation, fragmentation, vacuolization, etc.) were evaluated. The control group consisted of 512 embryos of preimplantation development using a standard cultivation technique. Standard key indicators of developing embryos (fertilization,

growth to blastocysts, freezing, utilization rate, clinical pregnancy rate) were used as the criteria for assessing efficiency.

**Results.** The key indicators of pre-implantation development of embryos did not show a significant difference in the time-lapse monitored group and the control. However, the blastocyst development rate, the freezing rate, the embryo utilization rate in the time-lapse group were slightly higher, as well as the pregnancy clinical rate of 42,6 versus 38,5%.

**Conclusions.** The time-lapse technology allows to reduce the adverse effects of environmental factors, increasing the cultivation conditions in vitro. Registration of key morphodynamic events and their analysis make it possible to more objectively evaluate the pre-implantation development of human embryos and select the most promising embryo for implantation for transfer.

**Key words:** *embryo, cultivation, time-lapse monitoring, human*

<sup>1</sup> The Histology and Embryology Department, 227 Chapayevskaya St., Samara 443001, <sup>2</sup> The Reproductive Medicine, Clinical Embryology and Genetics Department, Samara State Medical University, 29 Entuziastov St., Samara 443079;

<sup>3</sup> Laboratory of Experimental Embryology, N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, 1 (bld. 9) Ostrovityanova St., Moscow 117997