Индукция синтеза эмбрионами растворимых селектинов в программе ЭКО/ИКСИ

Д.м.н., проф. В.А. БУРЛЕВ[1,2], н.с. Н.А. ИЛЬЯСОВА[1,2], д.м.н., проф. Л.Н. КУЗЬМИЧЕВ[1], асп. Н.С. ШЕТИНИНА[1]

[1]ФГУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова», Москва; [2]Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Уппсала, Швеция

Определение содержания селектинов в культуральной среде эмбрионов 3-го и 5-го дней развития может служить дополнительным диагностическим признаком жизнеспособности и функциональной активности эмбриона. Полученные результаты имеют общебиологическое значение для понимания процессов регуляции и контроля уровня селектинов в процессе культивирования и отбора жизнеспособных эмбрионов для повышения эффективности программы ЭКО/ИКСИ.

Ключевые слова: селектины, эмбрионы, ЭКО/ИКСИ.

Низкая эффективность лечения больных бесплодием с использованием методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) вызывает множество негативных суждений об этих методах, как у врачей, так и у пациентов. В данном вопросе существуют субъективные и объективные факторы [2, 3]. Проведенная нами в 2011 г. оценка эффективности программы ЭКО/ИКСИ в зависимости от дня переноса эмбрионов в полость матки и показатели контролируемой индукции овуляции позволила установить, что, несмотря на зрелость бластоцист, частота наступления беременности не превышает 55% [5]. Учитывая, что 50% вероятность составляет только случайное совпадение признаков, данная величина отражает необходимость разработки методов контроля всех технологических этапов ЭКО/ИКСИ. К их числу, прежде всего, следует отнести оценку состояния зрелости эмбрионов перед переносом их в полость матки.

Существующие морфологические оценочные классификации, в том числе классификация D. Gardner [9, 10, 12], недостаточно отражают зрелость эмбриона и позволяют только выделять когорту потенциальных эмбрионов для дальнейшей селекции. Следовательно, разработка неинвазивных, воспроизводимых, стандартизованных и объективных методов оценки зрелости эмбрионов на различных стадиях дифференцировки может иметь решающее значение для существенного повышения эффективности ЭКО/ИКСИ. Отсутствие таких методов не позволяет изменить существующую эффективность ЭКО/ИКСИ. В то же время попытки оптимизации некоторых параметров технологии ЭКО/ИКСИ являются субъективными и недоказанными, значительно варьируя от одного клинического случая к другому.

Некоторую надежду на получение новых результатов дало первое, проведенное В.А. Бурлевым и соавт. в 2012 г. [1] исследование по определению содержания селектинов в культуральной среде бластомеров 3-го дня развития. Показано, что эти данные могут служить дополнительным диагностическим признаком сохранности (жизнеспособности) и функциональной активности эмбриона. Полученные результаты позволили охарактеризовать среду культивирования эмбрионов не как инертную, а как источник дополнительной информации о состоянии эмбриона.

Установлено, что раннее развитие эмбриона обеспечивается за счет материнских мРНК, полученных с яйцеклеткой. Генетически аномальные эмбрионы также могут развиваться до стадии бластоцисты за счет материнских мРНК. Собственный геном эмбриона человека может быть активирован только после 5-го дня развития [13]. Следовательно, синтез селектинов *de novo* у бластомеров 3-го дня культивирования осуществляется только за счет материнских мРНК. Исходя из этих положений, нами впервые было показано [1] снижение содержания селектинов в культуральной среде эмбрионов 3-го дня развития в группе больных с бесплодием и наступившей беременностью. Это свидетельствовало о том, что растворимые селектины являются маркерами процессов внутриклеточного синтеза и накопления селектинов на поверхности эмбрионов. Именно эти «тихие» эмбрионы с низким уровнем выделения селектинов накапливают их на мембранах, используя материнские мРНК, и, следовательно, их уровень ниже, чем у эмбрионов без активации этого процесса. В то же время в культуральной среде бластомеров до 3-го дня инкубации в группе больных с бесплодием и ненаступившей беременностью содержание растворимых селектинов было больше, чем у эмбрионов в

e-mail: vbourlev@mail.ru

группе с наступившей беременностью. Следовательно, «активные» эмбрионы не накапливают на мембранах селектины, а продуцируют их в культуральную среду, и последующий перенос таких эмбрионов в полость матки не может быть сопряжен с нидацией и имплантацией.

Полученные результаты позволили нам выдвинуть гипотезу о том, что у «тихих» эмбрионов 3-го дня инкубации низкое содержание селектинов в культуральной среде и накопление их на поверхностных мембранах позволяет участвовать в процессах взаимодействия с лигандом поверхностного эпителия эндометрия и адгезии эмбриона. Погружение растущего и дифференцирующегося трофобласта в эндометрий сопровождается началом активных преобразований цитотрофобласта эктодермального происхождения в клетки крови и клетки сосудов.

Следовательно, низкие показатели содержания L-селектина в культуральной среде 3-го дня свидетельствуют о большей вероятности наступления беременности. Можно предположить, что эти «тихие» эмбрионы обладают более высокой биологической способностью к последующему развитию, а именно к нидации и имплантации. Учитывая одинаковую морфологическую характеристику изученных эмбрионов, следует отметить информативность определения растворимых селектинов в культуральной среде 3-го дня для оценки их качества.

Проведенное нами проспективное исследование явилось наукообразующим и потребовало дальнейших работ по изучению роли селектинов в культуральной среде эмбрионов 5-го дня развития и сопоставления этих показателей с результатами 3-го дня развития.

Цель исследования — провести сравнительный анализ содержания растворимых селектинов в среде 3-го и 5-го дня культивирования эмбрионов в программах ЭКО/ ИКСИ для повышения эффективности лечения бесплодия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 36 женщин репродуктивного возраста от 20 до 37 лет (31,7±3,4 года), страдающих бесплодием. После проведения ЭКО/ ИКСИ у 20 наступила беременность и у 16 не наступила беременность.

Критерии включения: женщины с нормальным менструальным циклом (28—32 дня), нормальным содержанием в сыворотке крови ЛГ, ФСГ, пролактина, E_2, прогестерона, тестостерона, наличием хотя бы 1 эмбриона для переноса, давшие информированное согласие на участие в исследовании после ознакомления со всеми аспектами лечения и необходимого обследования.

Критерии исключения: наличие синдрома поликистозных яичников (СПКЯ), патологии эндометрия, гидросальпинксов по данным УЗИ и гистеросальпингографии (ГСГ), астенотератозооспермии III и IV степени у мужа. Пациентки с неудовлетворительной морфологической оценкой эмбрионов также были исключены из дальнейшего наблюдения.

Дизайн исследования. Одномоментное исследование, стратифицированная рандомизация. Определение достаточности выборки осуществлялось исходя из необходимого и достигаемого в ходе исследования уровня достоверности ($p<0,05$).

Стимуляция овуляции. Всем женщинам проводилась стимуляция по длинному протоколу, как было описано ранее [1].

Оценка качества ооцитов, оплодотворение и культивирование эмбрионов. Полученные ооциты помещали в среду для отмывки, содержащую HEPES-буфер, а затем отмывали их в культуральной среде. Сразу после размещения ооцитов в среду для культивирования оценивали количество, качество и степень зрелости полученных комплексов oocyte—cumulus [4]. Оплодотворение ооцитов осуществлялось методами ЭКО или ИКСИ в стандартных условиях. Оценка оплодотворения проводилась по наличию мужского и женского пронуклеуса в ооците, как это было нами описано ранее [1]. Оплодотворение проходило в среде Fertilization medium (Sydney IVF), COOK, R-SIFM-20. На стадии пронуклеусов зиготы помещали в среду Cleavage medium (Sydney IVF) K-SICM-20. На 3-и сутки культивирования эмбрионы переносили в среду Blastocyst medium (Sydney IVF) K-SIFM-20, в которой они культивировались до стадии бластоцисты. Культивирование эмбрионов осуществлялось раздельно. Качество эмбрионов оценивали перед каждым переносом. Перенос осуществлялся на 3-й или 5-й день культивирования после трансвагинальной пункции яичников (ТВПЯ). При выборе дня переноса учитывалось общее состояние больной (симптомы гиперстимуляции яичников) и эмбриологические характеристики (количество эмбрионов на 3-и и 5-е сутки культивирования). Эмбрионами хорошего качества считались эмбрионы: на 2-е сутки развития, достигшие стадии 4 бластомеров и более (48 ч после трансвагинальной пункции), на 3-и сутки развития — 6 бластомеров и более. Дробящиеся эмбрионы хорошего качества имели не более 10% фрагментации. Эмбрионы, достигшие стадии бластоцисты, оценивались согласно классификации D. Gardner [9, 10, 12]. Эмбрионами удовлетворительной морфологической оценки считались 4AA, 4AB, 4BA, 5AA, 5AB, 5BA. Эмбрионы переносили в полость матки под контролем трансабдоминального ультразвука (Logic 200) с помощью катетеров Wallace («Smiths Medical International Ltd.», Объединенное Королевство) или Cook-K-Jet («Cook Ireland Ltd.», Ирландия).

Диагностика и наблюдение беременности. Биохимический тест на беременность (β-чХГ) проводили

на 14—16-й день, ультразвуковую диагностику беременности осуществляли на 21-й день после переноса эмбрионов, как было описано ранее [1].

Иммуноферментный анализ. Анализ содержания L-селектина (L-selectin, L-Sel, нг/мл), P-селектина (P-selectin, P-Sel, пг/мл), E-селектина (E-selectin, E-Sel, пг/мл) в культуральной среде Cleavage medium K-SICM-20 на 3-й день и в культуральной среде Blastocyst medium K-SIBM-20 на 5-й день после ТВПЯ проводили (В.А. Бурлев и Н.А. Ильясова) с помощью иммуноферментного анализа с применением стандартных наборов (R&D systems, США). Хранение образцов, постановка реакций и расчет результатов осуществляли в стандартных условиях и согласно рекомендациям производителя. После получения аликвоты исследуемого образца к ней добавлялся витализирующий реагент, разработанный совместно с Department of Women's and Children's Health, Uppsala University (Уппсала, Швеция), и только после этого проводился иммуноферментный анализ по стандартному протоколу. Расчет содержания селектинов в культуральной среде осуществлялся исходя из числа эмбрионов.

Статистический анализ. Анализ результатов выполняли с помощью статистической компьютерной программы PASW Statistics 18. Достоверность различий полученных результатов проверялась с использованием непараметрического анализа Манна—Уитни, критерия χ^2, ANOVA. Результаты исследования представлены как средние ± стандартное отклонение ($M \pm SD$). Различия между группами считались достоверными при $p<0,05$. Для оценки информационной ценности предикторов культивирования эмбриона использовали ROC-кривые и достоверность значения $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика обследованных больных. Все включенные в исследование больные ($n=36$) были разделены на две группы в зависимости от дня инкубирования эмбрионов: 3-й день (1-я группа) и 5-й день (2-я группа). В каждой из групп были выделены две подгруппы в зависимости от наступления беременности по данным биохимического теста на беременность и УЗИ: с наступившей беременностью — 20 больных (14 — в 1-й группе, 6 — во 2-й) и с ненаступившей беременностью — 16 больных (11 — в 1-й группе, 5 — во 2-й группе).

При анализе анамнестических данных показано, что средний возраст пациенток достоверно не различался и составил в 1-й группе 31,1± 4,6 года, во 2-й группе 32,8±3,6 года, длительность бесплодия была 6,6±5,0 и 8,6±4,6 года соответственно. С диагнозом бесплодия трубного происхождения в 1-й группе было 71,4% пациенток, во 2-й — 81,8%. Сочетание мужского и трубного факторов бесплодия имело место в 28,6 и 18,2% случаев соответственно в 1-й и 2-й группах. Отсутствовала беременность в анамнезе у 64,3% пациенток 1-й группы и у 54,5% пациенток 2-й группы. Больных с пролиферативными заболеваниями (полип эндометрия, гиперплазия эндометрия, эндометриоз, аденомиоз, миома) было соответственно 35,7 и 54,5%, с воспалительными гинекологическими заболеваниями — 50 и 72,7%.

Оплодотворение методом ЭКО в 1-й группе проведено у 44% пациенток, во 2-й группе — у 45,5% ($p>0,05$). ИКСИ использовано в 1-й группе в 56% случаев, во 2-й группе — в 54,5% ($p>0,05$). Показанием для ИКСИ в 1-й и 2-й группах в 53,4 и 21,3% случаев соответственно была патозооспермия ($p>0,05$). Количество ооцитов, полученных в ходе ТВПЯ, в 1-й группе достоверно не отличалось от их числа во 2-й группе.

Число переносимых в полость матки эмбрионов в 1-й и 2-й группах варьировало от 1 до 2 при толщине эндометрия 10,4±1,2 и 9,6±1,3 мм соответственно.

Анализ клинических данных показал отсутствие достоверных различий между группами по возрасту пациенток, особенностям репродуктивного анамнеза, фактору и длительности бесплодия, наличию в анамнезе беременностей, пролиферативных и воспалительных гинекологических заболеваний.

Содержание растворимых форм селектинов в культуральной среде эмбрионов 3-го и 5-го дней инкубирования при проведении ЭКО/ИКСИ

I этап. Результаты исследования содержания селектинов в культуральной среде бластомеров на 3-й и 5-й дни проведения ЭКО+ИКСИ в зависимости от наступления или ненаступления беременности представлены в **табл. 1**. На 3-й день инкубирования эмбрионов содержание всех изученных селектинов было достоверно снижено в подгруппе больных с наступившей беременностью. На 5-й день инкубирования содержание L-селектина было достоверно снижено у больных с ненаступившей беременностью и повышено у больных с наступившей беременностью. Для P- и E-селектинов изменения показателей 5-го дня инкубирования были недостоверны. Следовательно, при проведении ЭКО+ИКСИ содержание L, P и E-селектинов при инкубировании эмбрионов в течение 3 дней снижено у эмбрионов в подгруппе больных с наступившей беременностью, а на 5-й день этот показатель повышен только для L-селектина.

II этап. Результаты исследования содержания селектинов в культуральной среде эмбрионов на 3-й и 5-й дни проведения ЭКО в зависимости от наступления или ненаступления беременности представлены в **табл. 2**. При рандомизации всех результатов исследований по признаку проведения ЭКО показано, что на 3-й день инкубирования эмбрионов содержание L- и P-селектинов было достоверно снижено в подгруппе больных с наступившей беременностью. На

Таблица 1. **Содержание селектинов в культуральной среде эмбрионов на 3-й и 5-й дни проведения ЭКО+ИКСИ в зависимости от наступления (Б+) или ненаступления (Б–) беременности**

Селектин	1-я группа эмбрионы 3-го дня ЭКО+ИКСИ (*n*=25/38)		2-я группа эмбрионы 5-го дня ЭКО+ИКСИ (*n*=11/14)		Достоверность	
	1. Б+ (*n*=14/19)	2. Б– (*n*=11/19)	3. Б+ (*n*=6/8)	4. Б– (*n*=5/6)	p_{1-2}	p_{3-4}
L, нг/мл	17,05±3,3	21,9±5,6	12,6±4,9	8,85±1,5	0,01	0,048
P, пг/мл	2119,7±527,5	2370,2±551,5	1298,1±625,4	994,17±164,8	0,01	0,23
E, пг/мл	688,2±157,6	777,2±169,2	495,13±222,2	347,67±48,3	0,0004	0,1

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: Расчет достоверности различий осуществлялся по тесту Манна—Уитни; *n* —число пациенток/число эмбрионов; данные представлены в виде *M*±*SD*.

Таблица 2. **Содержание селектинов в культуральной среде эмбрионов на 3-й и 5-й дни проведения ЭКО в зависимости от наступления (Б+) или ненаступления (Б–) беременности**

Селектин	1-я группа эмбрионы 3-го дня ЭКО (*n*=11/20)		2-я группа эмбрионы 5-го дня ЭКО (*n*=5/7)		Достоверность	
	1. Б+ (*n*=2/4)	2. Б– (*n*=9/16)	3. Б+ (*n*=3/4)	4. Б– (*n*=2/3)	p_{1-2}	p_{3-4}
L, нг/мл	14,3±2,7	21,1±5,1	11,1±1,03	7,5±1,97	0,021	0,031
P, пг/мл	1596,8±348,8	2288,4±510,1	788,0±299,4	1076,3±198,8	0,038	0,18
E, пг/мл	623,8±103,7	772,1±165	326,5±129,5	374,3±38,7	0,098	0,52

Таблица 3. **Содержание селектинов в культуральной среде эмбрионов на 3-й и 5-й дни проведения ИКСИ в зависимости от наступления (Б+) или ненаступления (Б–) беременности**

Селектин	1-я группа эмбрионы 3-го дня ИКСИ (*n*=14/18)		2-я группа эмбрионы 5-го дня ИКСИ (*n*=6/7)		Достоверность	
	1. Б+ (*n*=12/15)	2. Б– (*n*=2/3)	3. Б+ (*n*=3/4)	4. Б– (*n*=3/3)	p_{1-2}	p_{3-4}
L, нг/мл	17,8±3,1	26,2±4,1	15,98±3,3	8,2±0,8	0,036	0,02
P, пг/мл	1941,8±347,9	2806,3±668,3	1808,3±359,4	912,0±90,4	0,066	0,017
E, пг/мл	592,6±69,2	804,7±228,6	663,8±150,2	321,0±46,9	0,051	0,013

5-й день инкубирования содержание L-селектина было достоверно выше в подгруппе с наступившей беременностью, а содержание P- и E-селектинов было недостоверным при сравнении подгрупп больных с наступившей и ненаступившей беременностью. Следовательно, при проведении ЭКО содержание L- и P-селектинов при инкубировании эмбрионов в течение 3 дней снижено у эмбрионов в подгруппе больных с наступившей беременностью, на 5-й день этот показатель достоверно выше для L-селектина и не изменен для P- и E-селектинов.

III этап. Результаты исследования содержания селектинов в культуральной среде эмбрионов на 3-й и 5-й дни проведения ИКСИ в зависимости от наступления или ненаступления беременности представлены в **табл. 3**. При рандомизации всех результатов исследований по признаку проведения ИКСИ показано, что на 3-й день инкубирования эмбрионов содержание L-селектина было достоверно снижено в подгруппе больных с наступившей беременностью. На 5-й день инкубирования содержание всех изученных селектинов было достоверно повышено у больных с наступившей беременностью. Следовательно, при проведении ИКСИ содержание L, P и E-селектинов при инкубировании эмбрионов в течение 3 дней снижено у эмбрионов в подгруппе с наступившей беременностью, а на 5-й день этот показатель достоверно повышен.

IV этап. ROC-анализ. В связи с получением достоверных различий в содержании селектинов при инкубировании эмбрионов в течение 3 и 5 дней был проведен ROC-анализ и получена цифровая оценка ROC-кривых. Площадь под ROC-кривой (AUC) при проведении ЭКО и ИКСИ на 3-й день инкубирования эмбрионов для L-селектина составила 0,7632±0,231 и 0,782±0,193 соответственно (p<0,05), что свидетельствует о хорошем качестве полученных моделей для прогнозирования наступления беременности в зависимости от уровня L-селектина. Сравнение показателей площадей под ROC-кривой (AUC) при проведении ИКСИ на 5-й день инкубирования эмбрионов для L, P и E-селектинов показало их однородность с максимальным значением 0,811±0,112 (p<0,05) для L-селектина, что свидетель-

ствовало об очень хорошем качестве полученной модели. Приведенные характеристики ROC-кривых доказывают важную прогностическую значимость для развития эмбриона уровня L-селектина в культуральной среде и могут быть использованы в дополнение к существующим шкалам оценки качества эмбрионов при проведении селективного переноса одного эмбриона в полость матки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что для обеспечения жизнеспособности эмбриона при культивировании *in vitro* существуют три ключевые детерминанты: температура, pH и осмолярность, которые обеспечиваются специальным оборудованием и составом культуральных сред [11]. Однако *in vivo* эти параметры выдерживаются в строго регламентированных и эволюционно приобретенных интервалах, а *in vitro* такие значения могут изменяться и не контролируются с высокой точностью. Следовательно, изменение одного или нескольких параметров может приводить к температурному стрессу, pH стрессу и осмолярному стрессу [10, 17]. Изменение газовой среды культивирования также может оказывать отрицательное воздействие на жизнеспособность эмбриона. Совокупность изменений ключевых факторов метаболических детерминант и газовой среды в конечном итоге влияет на транскрипцию фактора, индуцированного гипоксией (HIF), и активирует процессы свободнорадикального окисления, приводя к гибели эмбриона [6, 14].

В идеальных условиях все культуральные среды должны включать состав солей, обеспечивающий стабильность pH и осмолярности так, чтобы ооцит/эмбрион «видел», что минимальные изменения не влияют на его состояние. Достижение таких результатов невозможно без совершенствования оборудования, обеспечивающего постоянный мониторинг ключевых детерминант и газовой среды, и при необходимости их коррекции в режимах реального времени [15, 16]. Важным компонентом контроля жизнеспособности эмбриона является уровень метаболической активности. Так, на ранних этапах развития эмбрионов *in vitro* и *in vivo* существует одинаковый принцип метаболической активности, при этом потребление кислорода резко возрастает к стадии бластоцисты [21]. Эмбрионы с высокой морфологической оценкой характеризуются низким обменом аминокислот, а нормализованный аминокислотный профиль эмбриона позволяет повысить результативность программы ЭКО [7].

Эти данные подтверждают результаты исследований C. Vergouw и соавт. [23], которые показали взаимосвязь метаболического профиля культуральной среды и жизнеспособности эмбриона. Так, E. Seli и соавт. [18—20] рассматривают метаболические или метаболомные тест-системы оценки жизнеспособности эмбриона как многообещающие и свидетельствующие о том, что метаболическая активность может действовать как соответствующий маркер жизнеспособности эмбриона [22].

Начиная с 2002 г. получила развитие гипотеза «тихого» эмбриона, разработанная H. Leese [14], гласящая, что чем ниже метаболическая активность эмбриона ранней стадии развития, тем выше его жизнеспособность. К настоящему времени эта гипотеза получила дальнейшее развитие. Показано, что эмбрионы с более высоким уровнем повреждения генома, транскриптома и протеома имеют большую потребность в питательных веществах, и поэтому они метаболически более активны [6]. Одни из белков протеома — селектины играют значительную роль в процессах нидации эмбриона и дальнейшего его развития.

Полученные результаты исследования представлены на схеме и подтверждают ранее выдвинутую нами гипотезу о том, что «тихие» эмбрионы 3-го дня инкубации с низким содержанием селектинов в культуральной среде и накоплением их на поверхностных мембранах позволяют эмбриону участвовать в процессах взаимодействия с лигандом поверхностного эпителия эндометрия, его адгезии и нидации [1]. «Тихие» эмбрионы обладают более высокой биологической способностью к последующему развитию (вариант 1), а при отсутствии наступления беременности отсутствует и достоверное снижение содержания селектинов (вариант 2). Эти опубликованные нами научные данные [1] дополнены в проведенном исследовании результатами о содержании селектинов в культуральной среде эмбрионов 5-го дня развития. В подгруппе больных с наступившей беременностью уровень изученных селектинов на 5-й день культивирования был достоверно выше (вариант 3), чем у больных с ненаступившей беременностью (вариант 4). Следовательно, с 5-го дня культивирования за счет активации собственного генома эмбрионов наблюдается синтез селектинов *de novo*. Необходимо отметить, что если на 3-й день культивирования у больных с наступившей беременностью снижен уровень селектинов (вариант 1), то на 5-й день культивирования у больных с наступившей беременностью отмечается его повышение (вариант 3). Наличие такого своеобразного «перекреста» в концентрации селектинов культуральной среды объясняется экспрессией селектинов до 3-го дня культивирования от мРНК матери и активацией синтеза селектинов с 5-го дня культивирования за счет собственного генома. Эти результаты дополняют данные литературы [8, 24] об изменении pH, содержания молочной и пировиноградной кислот, газовой среды и ряда других показателей культуральной среды эмбрионов 3-го и 5-го дня.

Полученные результаты позволили выделить четыре варианта содержания растворимых селектинов

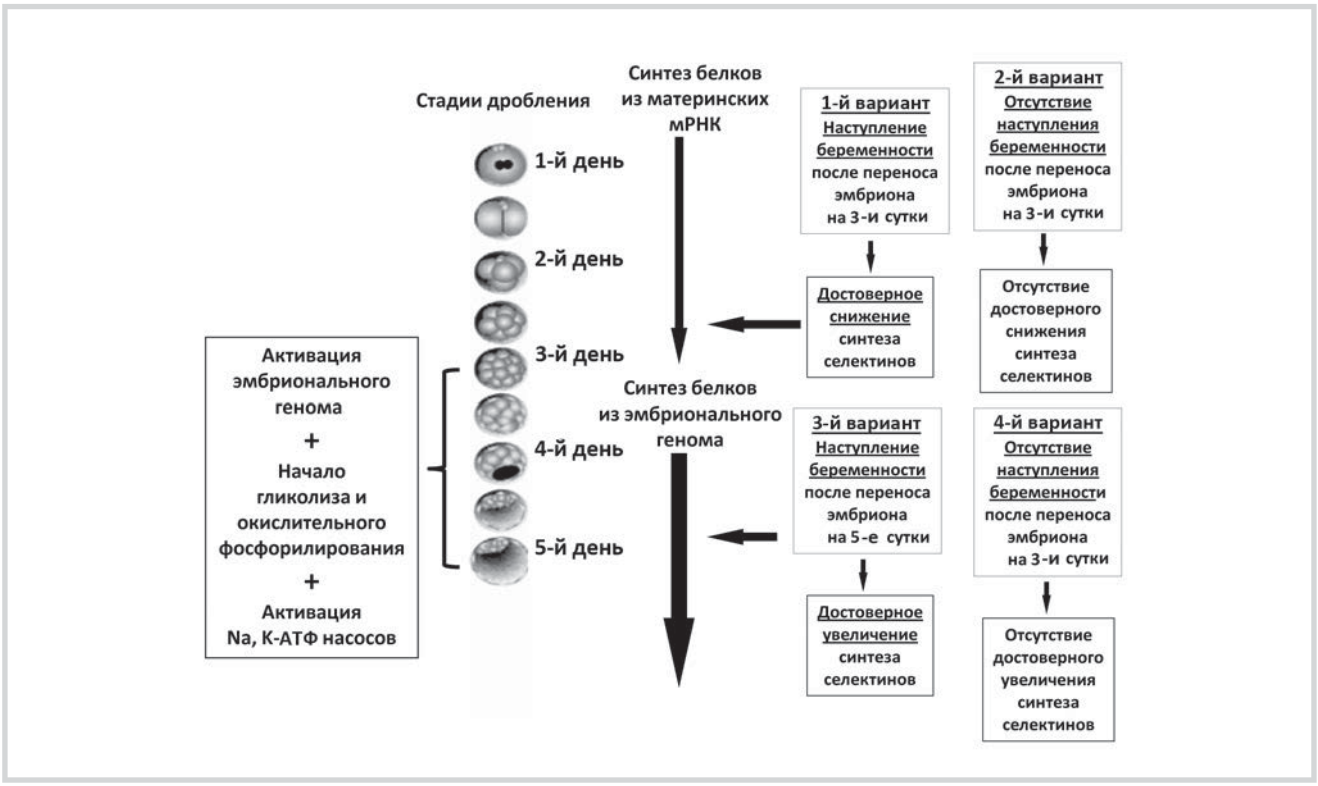

***Схема*. Варианты содержания растворимых селектинов в культуральной среде эмбрионов в программе ЭКО/ИКСИ.**

в культуральной среде эмбрионов и показать принципиальную возможность использования культуральной среды эмбрионов 3-го и 5-го дней инкубирования для определения в ней растворимых L, P и E-селектинов методом твердофазного иммуноферментного анализа. Максимальная концентрация среди изученных селектинов установлена для L-селектина и минимальная для P- и E-селектинов. Распределение данных по способу индукции оплодотворения (ЭКО или ИКСИ) показало, что для всех групп сохраняются достоверные различия между показателями L-селектина. При этом в случаях наступления беременности содержание L-селектина всегда достоверно ниже у эмбрионов 3-го дня культивирования и достоверно выше у эмбрионов 5-го дня культивирования. Эти данные имеют общебиологическое значение для понимания процессов регуляции и контроля уровня селектинов в процессе культивирования эмбрионов для отбора жизнеспособных эмбрионов и повышения эффективности программы ЭКО/ИКСИ **(см. схему)**.

Таким образом, первое сравнительное исследование по определению содержания селектинов в культуральной среде эмбрионов 3-го и 5-го дней культивирования показало, что эти данные могут служить дополнительными диагностическими признаками их жизнеспособности и функциональной активности. Полученные результаты позволяют охарактеризовать среду культивирования эмбрионов на 3-й и 5-й дни развития как источник дополнительной информации о состоянии эмбриона. Возможность дозированного включения в состав среды культивирования бластомеров и бластоцист синтетических, рекомбинантных, природных или химерных селектинов является новым направлением в создании системы контролируемого развития эмбрионов перед переносом их в полость матки. Дальнейшие исследования в этом направлении, несомненно, принесут не только новые знания, но и новые технологии для повышения клинической эффективности метода ЭКО/ИКСИ.

Благодарности. Выражаем благодарность professor Matts Olovsson и сотрудникам Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Uppsala, Sweden за участие в обсуждениях и поддержку. Финансовая, научная, правовая и политическая помощь осуществлялась Шведской Королевской Академией наук, Шведским медицинским исследовательским советом (проект №8683), Университетом Уппсалы, Швеция, Российской академией медицинских наук, ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бурлев В.А., Ильясова Н.А., Кузьмичев Л.Н., Щетинина Н.С.* Растворимые селектины культуральной среды в программе ЭКО/ИКСИ: индукция имплантации и ангиогенеза. Пробл репрод 2012; 3: 60—67.
2. *Бурлев В.А., Кузьмичев Л.Н., Щетинина Н.С., Ильясова Н.А., Онищенко А.С.* Состояние молекулярного имплантационного окна: роль в исходах ЭКО (обзор литературы). Пробл репрод 2009; 6: 24—28.
3. *Бурлев В.А., Кузьмичев Л.Н., Онищенко А.С., Ильясова Н.А., Щетинина Н.С.* Функциональная активность эндометрия влияет на результаты ЭКО и перенос эмбрионов: молекулярные механизмы регуляции фертильности. Пробл репрод 2010; 2: 41—52.
4. *Кулаков В.И., Леонов Б.В., Кузьмичев Л.Н.* Лечение женского и мужского бесплодия. М 2005; 784.
5. *Щетинина Н.С., Кузьмичев Л.Н., Бурлев В.А., Онищенко А.С., Ильясова Н.А.* Оценка эффективности программы ЭКО: день переноса эмбрионов в полость матки и показатели контролируемой индукции овуляции. Пробл репрод 2011; 3: 56—62.
6. *Baumann C.G., Morris D.G., Sreenan J.M., Leese H.J.* The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. Mol Reprod Devel 2007; 74: 1345—1353.
7. *Brison D.R., Houghton F.D., Falconer D., Roberts S.A., Hawkhead J., Humpherson P.G., Lieberman B.A., Leese H.J.* Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. Hum Reprod 2004; 19: 10: 2319—2324.
8. *Fujimoto V.Y., Browne R.W., Bloom M.S., Sakkas D., Alikani M.* Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. Fertil Steril 2011; 95: 4: 1197—1204.
9. *Gardner D.K., Lane M.* Embryo culture systems. In: Handbook of In Vitro Fertilization, 2nd edn. Eds. A.O. Trounson, D.K. Gardner. Boca Raton: CRC Press 1999; 205—264.
10. *Gardner D.K., Lane M., Schoolcraft W.B.* Physiology and culture of the human blastocyst. J Reprod Immunol 2002; 55: 85—100.
11. *Gardner D.K., Leese H.J.* The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. Development 1988; 104: 423—429.
12. *Gardner D.K., Schoolcraft W.B.* In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, ed. Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond. Carnforth: Parthenon 1999; 378—388.
13. *Guzeloglu-Kayisli O., Basar M., Arici A.* Basic aspects of implantation. Reprod BioMed 2007; 15: 6: 728—739.
14. *Leese H.J.* Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. Bioessays 2002; 24: 9: 845—849.
15. *Patrizio P., Fragouli E., Bianchi V., Borini A., Wells D.* Molecular methods for selecting the ideal oocyte. Reprod Biomed Online 2007; 15: 346—353.
16. *Patrizio P., Sakkas D.* From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization. Fertil Steril 2009; 91: 4: 1061—1066.
17. *Reddy U.M., Wapner R.J., Rebar R.W., Tasca R.J.* Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes. Obstet Gynecol 2007; 109: 967—977.
18. *Seli E., Botros L., Sakkas D., Burns D.H.* Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril 2008; 90: 6: 2183—2189.
19. *Seli E., Sakkas D., Scott R., Kwok Sh.C., Rosendahl S.M., Burns D.H.* Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril 2007; 88: 5: 1351—1357.
20. *Seli E., Vergouw C.G., Morita H., Botros L., Roos P., Lambalk C.B., Yamashita N., Kato O., Sakkas D.* Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. Fertil Steril 2010; 94: 2: 535—542.
21. *Sturmey R.G., Leese H.J.* Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. Reproduction 2003; 126: 2: 197—204.
22. *Sturmey R.G., Hawkhead J.A., Barker E.A., Leese H.J.* DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. Human Reprod 2009; 24: 1: 81—91.
23. *Vergouw C.G., Botros L.L., Roos P., Lens J.W., Schats R., Hompes P.G., Burns D.H., Lambalk C.B.* Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. Hum Reprod 2008; 23: 7: 1499—1504.
24. *Watson A.J., Natale D.R., Barcroft L.C.* Molecular regulation of blastocyst formation. Animal Reprod Sci 2004; 82—83: 583—592.