

## РАЗДЕЛ – ОБЗОРНЫЕ И ОБЩЕТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ PART - REVIEWS AND THEORETICAL PAPERS

### ИСТОРИЯ, ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕХНОЛОГИЙ ПОКАДРОВОЙ СЪЕМКИ В ИЗУЧЕНИИ РАННЕГО ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

**<sup>1</sup>Шурыгина О.В., <sup>1</sup>Василенко О.Ю., <sup>2</sup>Юхимец С.Н., <sup>3</sup>Шипулин Н.А.**

<sup>1</sup>Самарский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Медицинский университет РЕАВИЗ, Самара; <sup>3</sup>Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия, e-mail: oks-shurigina@yandex.ru

### THE HISTORY, OPPORTUNITIES AND PROSPECTS OF TIME-LAPSE TECHNOLOGIES IN THE STUDY OF EARLY HUMAN EMBRYONIC DEVELOPMENT

**<sup>1</sup>Shurygina OV, <sup>1</sup>Vasilenko OYu, <sup>2</sup>Yukhimets SN, <sup>3</sup>Shipulin NA**

<sup>1</sup>Samara State Medical University, <sup>2</sup>Private Medical University REAVIZ, Samara; <sup>3</sup>Bashkir State Medical University, Ufa, Russia, e-mail: e-mail: oks-shurigina@yandex.ru

#### *Для цитирования:*

*Шурыгина О.В., Василенко О.Ю., Юхимец С.Н., Шипулин Н.А. История, возможности и перспективы технологий покадровой съемки в изучении раннего эмбрионального развития человека// Морфологические ведомости.- 2021.- Том 29.- № 1.- С. 9-19. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29\(1\):9-19](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29(1):9-19)*

#### *For the citation:*

*Shurygina OV, Vasilenko OYu, Yukhimets SN, Shipulin NA. The history, opportunities and prospects of time-lapse technologies in the study of early human embryonic development. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter. 2021;29(1):9-19. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29\(1\):9-19](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29(1):9-19)*

**Резюме.** Несмотря на достижения вспомогательных репродуктивных технологий, ключевой проблемой отрасли по-прежнему остается высокий процент неудач осуществляемых протоколов стимуляции. Одной из ведущих причин этого являются ограниченные возможности оценки биологического потенциала эмбриона и его шансов на имплантацию. За последние десять лет в репродуктивных технологиях фокус внимания ощутимо сместился от пациентки к эмбриону, поскольку потребность в повышении их результативности стимулирует необходимость понимания глубинных процессов раннего развития зародыша. С целью повышения результативности процедур экстракорпорального оплодотворения в клинической эмбриологии внедряются и совершенствуются высокотехнологичные способы культивирования и оценки эмбрионов. Цель обзора – продемонстрировать историю, возможности и перспективы в изучении раннего эмбрионального развития человека технологии покадровой (цейтрафферной) съемки. Активное изучение и использование возможностей технологии покадровой замедленной съемки позволило не только расширить понимание процессов раннего развития зародыша, но и на текущий момент позволяет оценивать его потенциал с точки зрения, как биологических, так и клинических перспектив. Основными преимуществами этого метода являются возможность морфологической оценки в процессе непрерывного культивирования эмбрионов в инкубаторах закрытого типа без их извлечения, а также определение точных временных интервалов ключевых событий этапов развития зародыша с особым вниманием на те моменты, которые при традиционном культивировании недоступны для наблюдения и фиксации в условиях клинической практики. Главной точкой роста для развития технологии замедленной покадровой съемки стало создание и валидация так называемых морфокинетических критериев и алгоритмов оценки качества развивающихся эмбрионов. Ключевая перспектива метода – использование ее в комбинации с элементами искусственного интеллекта с целью прогностического определения наиболее потенциального для переноса в полость матки зародыша. Современные направления исследований с применением метода покадровой съемки - это продолжение разработки морфокинетических алгоритмов и их эффективных критериев, внедрение технологии самообучающихся компьютерных программ и адаптация этих инструментов в клинической практике, поиск и оценка возможных факторов влияния на морфокинетическую эмбрионов, контроль качества работы эмбриологических лабораторий. Будущее развитие таких технологий представляется в сочетании не только с возможностями искусственного интеллекта, но и в комбинации с использованием неинвазивного генетического скрининга, оценки метаболизма и протеомики развивающихся эмбрионов.

**Ключевые слова:** *эмбриология человека, биология репродукции, технология замедленной покадровой съемки, вспомогательные репродуктивные технологии*

**Summary.** Despite advances in assisted reproductive technologies, the high failure rate of existing stimulation protocols remains a key industry challenge. One of the leading reasons for this is the limited ability to assess the biological potential of the embryo and its chances of implantation. Over the past ten years, the focus of attention in reproductive technologies has significantly shifted from the patient to the embryo, since the need to improve their effectiveness stimulates the need to understand the deep processes of early development of the embryo. In order to increase the effectiveness of in vitro fertilization procedures in clinical embryology, high-tech methods of culturing and

evaluating embryos are being introduced and improved. The purpose of the review is to demonstrate the history, possibilities and prospects in the study of early human embryonic development of time-lapse imaging technology. The active study and use of the capabilities of the time-lapse slow-motion technology allowed not only to expand the understanding of the processes of early development of the embryo, but also at the current moment allows us to assess its potential from the point of view of both biological and clinical perspectives. The main advantages of this method are the possibility of morphological assessment during the continuous cultivation of embryos in closed-type incubators without their extraction, as well as the determination of the exact time intervals of key events of the stages of embryo development with special attention to those moments that are not available for observation and fixation under conditions of traditional cultivation. clinical practice. The main point of growth for the development of time-lapse imaging technology was the creation and validation of the so-called morphokinetic criteria and algorithms for assessing the quality of developing embryos. The key perspective of the method is its use in combination with elements of artificial intelligence in order to predict the most potential embryo for transfer into the uterine cavity. Modern directions of research using the method of time-lapse shooting are the continuation of the development of morphokinetic algorithms and their effective criteria, the introduction of the technology of self-learning computer programs and the adaptation of these tools in clinical practice, the search and assessment of possible factors influencing the morphokinetics of embryos, quality control of the work of embryological laboratories. The future development of such technologies is presented in combination not only with the capabilities of artificial intelligence, but also in combination with the use of non-invasive genetic screening, the assessment of metabolomics and proteomics of developing embryos.

**Key words:** *human embryology, reproductive biology, time-lapse technology, assisted reproductive technologies*

Изучение эмбрионального развития человека является приоритетной задачей фундаментальной и практической медицины. Начиная со времен Карла Бэра, интерес к доимплантационному развитию эмбрионов остается крайне высоким. Особого подъема клиническая эмбриология достигла в 70 - 90-е годы прошлого века. Ее несомненным успехом стало рождение первого ребенка «из пробирки» Луизы Браун в 1978 году. До этого времени в общей сложности было сделано около 600 переносов, прежде чем 8-ми клеточный эмбрион развился в плодное яйцо в полости матки. На сегодня по данным мировых регистров вспомогательных репродуктивных технологий (далее - ВРТ) количество детей, рожденных с помощью этих технологий достигает 10 миллионов [1]. Современная эмбриология человека имеет огромный потенциал развития и во многом определяет успешный исход программ ВРТ.

Эмбриология, как наука, сформировалась задолго до появления экстракорпорального оплодотворения (далее - ЭКО). Еще в древнегреческих трактатах школы Гиппократов «О семени» и «История животных» впервые были зафиксированы идеи наблюдательной и сравнительной эмбриологии [2]. Широкие возможности исследования гамет возникли благодаря созданию микроскопа. В 1677 году под авторством Антони Ван-Левенгука и Иогана Хэма вышла публикация с описанием и зарисовками сперматозоидов. Через 150 лет Карл Бэр описал ооциты млекопитающих, а в 1828 году в своем труде «История развития животных» он сформулировал закон зародышевого сходства, что по праву считается отправной точкой развития эмбриологии как науки [3].

В конце 20-го и начале 21 века произошел значительный прорыв в накоплении медицинской информации. Термин «доказательная медицина» существует уже более ста лет, однако именно за последние два десятилетия объем и доступ к научным медицинским данным возросли многократно [4]. Еще в 2011 году американский ученый Densen опубликовал статью, в которой описал время удвоения объема медицинских знаний: в 1950 году этот интервал составлял 50 лет, в 1980 году 7 лет, в 2010 году 3,5 года. В 2020 году данный показатель прогнозировался на уровне всего 73 дня [5]. Ситуация, связанная с пандемией SARS-CoV-19, вероятнее всего, еще больше ускорит взаимобмен информацией. Поэтому любые инновации в современной медицине с одной стороны требуют серьезной проверки, с другой - мгновенно подхватываются обществом в силу потребности в немедленном внедрении.

Несмотря на достижения ВРТ, ключевой проблемой по-прежнему остается высокий процент неудач проводимых протоколов стимуляции. Одной из ведущих причин этого являются ограниченные возможности оценки биологического потенциала эмбриона и его шансов на имплантацию. За последние десять лет в ВРТ фокус внимания ощути-

сместился от пациентки к эмбриону, поскольку потребность в повышении результативности технологии ЭКО стимулирует необходимость понимания глубинных процессов раннего развития зародыша. Новая эпоха в клинической эмбриологии настала спустя почти сто семьдесят лет с момента публикаций Карла Бэра с приходом технологии замедленной покадровой съемки (time-lapse technology, далее - TLT). Этот метод был известен еще с начала 20 века и в 1950-х годах стал использоваться в биологии для исследования живых объектов. Впервые запись раннего развития человеческих эмбрионов с использованием TLT была описана в 1997 году Payne и соавторами [6]. Ооцит, оплодотворенный методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (далее - ИКСИ), помещали в чашку Петри в инкубационную камеру Perspex со встроенным инвертированным микроскопом. Запись начиналась в течение 30 минут после инъекции сперматозоида, осуществлялась на видеокассету в условиях пониженной освещенности (лампа микроскопа включалась только на 5 секунд каждую минуту) и повторялось таким образом в течение 17-20 часового периода наблюдения [6]. С момента первого эксперимента был предпринят ряд серьезных исследований по безопасности культивирования эмбрионов в условиях инкубаторов, совмещенных с системой видеонаблюдения. Nakahara в 2010 году провел проспективное рандомизированное исследование по оценке влияния света от встроенного оптического микроскопа и безопасности системы покадровой записи в результате которого был сделан вывод об отсутствии негативного влияния такой технологии на эмбрионы при сравнении с традиционным культивированием по таким показателям как частота оплодотворения, частота дробления и процент эмбрионов хорошего качества [7].

С течением времени и накоплением данных по TLT стало очевидным, что традиционная оценка морфологии эмбриона, предложенная еще в 1999 году Gardner и в дальнейшем многократно модифицированная, не позволяет в полной мере прогнозировать потенциал его развития. В ряде публикаций были предложены временные интервалы этапов клеточного деления, которые по мнению авторов были связаны с потенциальной жизнеспособностью эмбриона. Lemmen отмечал, что раннее исчезновение пронуклеусов и раннее начало первого клеточного деления коррелировали с более высоким количеством бластомеров на 2-й день после извлечения яйцеклетки, в то время как синхронность появления ядер после первого клеточного деления достоверно ассоциировалась с более высокой частотой развивающейся беременности [8]. В 2011 году было сформулировано современное понятие морфокинетики эмбриона как сочетание морфологии, динамики и временных параметров его развития. Утверждалось, что значительные отклонения показателей морфокинетики являются предикторами аномального развития эмбриона [9].

С появлением коммерчески доступных аппаратов TLT начался новый виток в развитии клинической эмбриологии. В 2012 году проведя ретроспективное мультицентровое когортное исследование с применением первой в своем роде коммерческой системы TLT Embryo Scope (Unisense Fertilitich) Meseguer с соавторами наблюдали увеличение частоты наступления клинической беременности примерно на 20% по сравнению со стандартной инкубацией (OR=1,201; p=0,0043). Столь впечатляющие результаты исследователи авторы объясняли значительно более стабильными условиями культивирования при непрерывном наблюдении и использованием морфокинетических переменных для выбора самого потенциального эмбриона [10].

Перед исследователями встал вопрос о прогностических алгоритмах, использующих показатели TLT. Ранее были созданы подобные модели для традиционного метода культивирования и его оценки. Nolte с соавторами в 2007 году в ходе анализа показателей 2266 эмбрионов, полученных методом ЭКО/ИКСИ, пришли к выводу, что число бластомеров, вариация размера бластомеров, симметрия деления и моноклеарность в бластомерах являются достоверными прогностическими критериями для имплантации. Авторами был разработан алгоритм и критерии 10-ти балльной морфологической оценки эмбриона [11]. Однако в силу разницы условий культивирования в разных лабораториях этот и подобные ему алгоритмы не нашли широкого применения в клинической практике.

В случае с замедленной покадровой съемкой статистический анализ в исследовательских работах заметно усложнился в силу большего количества входящих данных и фокусных конечных точек. Первый алгоритм был предложен Wong и соавторами, этими исследователями была предпринята попытка связать временные интервалы развития эмбрионов с прогнозом развития бластоцисты и профилями экспрессии генов [12]. Позднее в качестве ключевого ориентира был выбран показатель частоты имплантации (далее - ЧИ) эмбриона и сформулирована система критериев оценки, которую назвали KID-score (known implantation data score – шкала данных успешной имплантации). Таким образом, морфокинетические параметры оценивались с точки зрения ожидаемого положительного «+KID» или отрицательного «-KID» результата имплантации и эмбрионы классифицировались по шкале от А до Е в зависимости от определенного потенциала [9]. В 2014 году был подробно описан клеточный цикл с момента оплодотворения с использованием TLT съемки с применением шкалы KID-score. В 2-х летнем когортном ретроспективном исследовании авторы сравнили интервалы ключевых событий, таких как выделение второго полярного тельца, появление первого и второго пронуклеусов, сближение и исчезновение ядер у имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов. Были проанализированы 1448 перенесенных эмбрионов, полученных путем оплодотворения методом ИКСИ донорских ооцитов с известным показателем ЧИ. Статистически достоверным выше показатель ЧИ эмбрионов был тогда, когда временные интервалы выделения второго полярного тельца соответствовали 3,3–10,6 часам, исчезновение пронуклеусов 22,2–25,9 часам, период от появления до исчезновения пронуклеусов составлял 5,7–13,8 часов. Другие параметры не продемонстрировали статистическую значимость [13]. Позднее группой авторов под руководством Basile и Meseguer алгоритм KID-score был верифицирован на большей выборке эмбрионов и была подтверждена его прогностическая ценность. Серьезным преимуществом данного исследования был его мультицентровой характер, в работе принимали участие 4 центра системы клиник «IVI» (Испания). В исследовании были выявлены достоверные различия по ЧИ между разными категориями эмбрионов: «А» - 32%, «В» - 28%, «С» - 26%, «D» - 20%, «Е» - 17% ( $p < 0,001$ ). Были определены три переменные наиболее тесно связанные с ЧИ: время появления третьего бластомера у эмбриона  $t_3$  (оптимум 34-40 часов), продолжительность второго клеточного цикла  $cc_2$  (оптимум 9-12 часов) и время деления на 5 клеток  $t_5$  (оптимум 45-55 часов) [14]. Следует отметить, что при разработке алгоритма учитывались данные переноса только одного эмбриона, поскольку именно в этом случае было возможно без дополнительного применения методов генетического тестирования сопоставить показатели эмбриона и данные его имплантации. На сегодня созданы несколько морфокинетических алгоритмов. Принципиально все они базируются на ключевых временных интервалах развития эмбриона, описанных Ciray в 2014 году и позднее обобщенных в «Рекомендациях по эффективной практике использования TLT» [15-16]. В сокращенной форме приводим их в таблице 1.

Технология замедленной покадровой съемки в сравнении с традиционной оценкой морфологии, во-первых, точно фиксирует ключевые временные интервалы развития эмбриона, что невозможно осуществить без круглосуточного наблюдения. Во-вторых, она фиксирует такие редко уловимые явления, как позднее появление пронуклеусов, асинхронное исчезновение пронуклеусов, изменение локализации фрагментации, рассеивание фрагментов, нарушение дробления, обратное слияние бластомеров, многоядерность и другие. По данным исследования Meseguer 19,4% эмбрионов демонстрировали те или иные отклонения развития [9]. По мнению ряда авторов, такие явления, как прямое деление от зиготы на три бластомера, не равный размер бластомеров на двухклеточной стадии с разницей, более чем в 25% и многоядерность на стадии четырех клеток достоверно снижают ЧИ и являются маркерами исключения эмбриона [9, 14, 17]. Включением этих трех критериев был модифицирован морфокинетический алгоритм шкалы KID-score.

Другой алгоритм был представлен в 2013 году Conaghan и соавторами, которые в многоцентровом проспективном когортном исследовании разработали и верифицировали алгоритм прогнозирования формирования бластоцисты по показателям эмбриона третьего дня развития. Исследователи использовали программное обеспечение Eeva (Мерк, Германия), базируясь на временных интервалах между 1-м и 2-м цитокинезом и цитокинезом 2 и 3. Результаты показали, что определение морфокинетики к третьему дню развития эмбриона с использованием системы Eeva достоверно повышает вероятность отбора потенциальных к развитию до стадии бластоцисты эмбрионов в случае, если указанные интервалы находились в определенных пределах: время между цитокинезом 1 и 2 составляло 9,33–11,45 часов, время между цитокинезом 2 и 3 0–1,73 часа, соответственно. При этом среди участвовавших в исследовании эмбриологов была отмечена высокая вариабельность результатов отбора в контрольной группе, в которой оценку проводили только по морфологии эмбриона [18].

Таблица 1

Критерии морфокинетических алгоритмов TLT-технологии [15-16]

Наименование интервала	Описание
tPB2	Время выделения второго полярного тельца
tPNa	Появление пронуклеусов; tPN1a, tPN2a, tPN3a, ...
tPNf	Время исчезновения пронуклеусов; tPN1f; tPN2f...
tZ	Время оценки PN (последний кадр до исчезновения пронуклеусов, перед tPNf)
tn	Время до образования каждого следующего бластомера n количества бластомеров (т.е. t2, t3, t4)
tTM	Прямое деление клетки на три бластомера (трихотомный митоз) на разных стадиях
tSC	Первое подтверждение компактизации
tM	Завершение компактизации
tSB	Начало бластуляции (появление видимого бластоцеля)
tB	Формирование полной бластоцисты
tE or tEB	Начало экспансии бластоцисты (называемая также TEyB, «у»-морфология внутренней клеточной массы, «z» – морфология клеток трофобластодермы)
tHN	Начало хетчинга (вылупления) бластоцисты (называемая также tHNyz)
tHD or tHB	Полностью вылупившаяся бластоциста (называемая также tHDyz)
Psyn	Сингамия, время от исчезновения пронуклеусов до первого цитокинеза
ECC1	Продолжительность первого клеточного цикла (t2-tPB2)
cc2	Клеточный цикл бластомеров: продолжительность второго клеточного цикла (a=t3-t2, b=t4-t2)
cc3	Клеточный цикл бластомеров: продолжительность третьего клеточного цикла (a=t5-t4, b=t6-t4, c=t7-t4, d=t8-t4)
ECC2	Второй клеточный цикл эмбриона (t4-t2)
ECC3	Третий клеточный цикл эмбриона (t8-t4)
Blastocyst contraction	Уменьшение объема бластоцеля
s2	Время между делением на три клетки и последующим делением на четыре клетки
s3	Время между делением до пяти клеток и последующим делением до восьми клеток
tRE	Время начала повторной экспансии (первый кадр, в котором бластоцель реформируется или увеличивается в размерах)
tCRE	Время завершения повторной экспансии (первый кадр, когда бластоциста занимает все перивителлиновое пространство)

В настоящее время во многих эмбриологических лабораториях начинается активное внедрение технологии замедленной покадровой съемки. Это актуализирует научно-исследовательскую деятельность развивая ее в нескольких направлениях. Безусловным приоритетным является разработка алгоритмов оценки, которые в идеале смогли бы прогнозировать оптимальную селекцию эмбриона с точки зрения повышения частоты наступления беременности и родов здоровым плодом. Однако сегодня важно понимать, что разработанные алгоритмы требуют серьезной адаптации в каждой конкретной клинике.

Подобная необходимость обусловлена существующей разницей в условиях культивирования эмбрионов, таких как различия культуральной среды, парциального давления инкубационного газа, опыта специалистов.

Не менее актуальным становится соотнесение морфокинетических параметров с генетикой эмбриона. Ряд медицинских, законодательных, этических и социально-экономических факторов по-прежнему не позволяют широко применять в клинической практике методы преимплантационного генетического тестирования. В связи с этим особый фокус внимания ученых сконцентрирован на попытках не инвазивного определения ploидности. В 2013 году вышла работа Campbell и соавторов по моделированию риска анеуплоидии у эмбрионов человека с использованием морфокинетики. Используя программное обеспечение Embryo-Viewer с предустановленным 20-минутным интервалом визуализации (19 изображений за 6 часов) и методы сравнительной геномной гибридизации исследователям удалось создать прогностический алгоритм на основании двух ключевых показателей: времени начала бластуляции (tSB) и времени формирования полной бластоцисты (tB). С использованием метода рекурсивного (быстрого и частого) разбиения были определены следующие интервалы, связанные с риском анеуплоидии. Низкий риск -  $tB < 122,9$  часов после ИКСИ и время начала бластуляции  $tSB < 96,2$  часов после ИКСИ; средний риск -  $tB < 122,9$  часов после ИКСИ и  $tSB \geq 96,2$  часов после ИКСИ; высокий риск -  $tB \geq 122,9$  часов после ИКСИ [19]. В том же году под руководством Campbell было опубликовано развитие этой идеи, воплотившееся в анализе корреляции морфокинетических данных и частоты наступления беременности и рождения ребенка. Базируясь на модифицированном алгоритме KID-score (в который были добавлены известные показатели клинической беременности и родов) авторы пришли к любопытным результатам: перенос эмбрионов с показателями  $t2 > 30$  часов и  $cc2 < 2$  часов реже приводил к наступлению положительных клинических исходов. И несмотря на то, что выборка была небольшой (310 эмбрионов 3-го дня развития) они обосновали четкую прогностическую значимость предложенного алгоритма [20].

В унисон с работами Campbell в 2018 году вышла работа Desai в которой были подтверждены предиктивные возможности морфокинетики связанные с показателями развития бластоцисты и дисморфизмами в отношении определения eupлоидности эмбрионов. В исследовании из 767 биопсированных бластоцист 41,6% были диагностированы как eupлоидные. Хромосомный анализ проводили с использованием методов сравнительной геномной гибридизации и секвенирования следующего поколения. По мнению авторов, отдельные дисморфизмы, такие как многоядерность, обратное слияние бластомеров, нерегулярное хаотическое деление или прямое деление на три бластомера не были напрямую связаны с анеуплоидией. Последние два, однако демонстрировали более низкий потенциал эмбриона к развитию. Наличие двух и более дисморфизмов было достоверно связано с низким уровнем eupлоидии (27,6%). При этом хромосомный статус коррелировал со временем начала бластуляции (tSB), временем начала экспансии бластоцисты (tEB) и интервалом между этими двумя показателями (tEB-tSB). Более низкая частота eupлоидии в 36,6% наблюдалась при  $tSB \geq 96,2$  часа, по сравнению с 48,2% при  $tSB < 96,2$  часа. Снижение частоты eupлоидии до 30% наблюдалось у бластоцист с отсроченной экспансией при показателе tEB  $> 116$  часов. Доля eupлоидных бластоцист была выше, когда интервал tEB-tSB был равен 13 часам или был меньшим [21].

Наиболее полно данные по корреляции морфокинетики и хромосомного статуса описаны в систематическом обзоре Reignier и соавторов [22]. В работу были взяты 11 ретроспективных и 2 проспективных исследования, которые были охарактеризованы как достаточно разнородные: биопсия и генетическое тестирование проводилось на разных этапах развития зародыша, во многих публикациях отсутствовали данные по парциальному давлению инкубационного газа, были приведены не все морфокинетические интервалы, использовались разные методы статистической обработки данных. Таким образом, вследствие значительной гетерогенности приведенных исследований авторами не было выявлено каких-то определенных уникальных параметров, по которым возможно было бы

определить генетический потенциал эмбрионов с достаточной степенью чувствительности и специфичности. Однако при этом наметились показатели, которые на этапе доимплантационного развития значимо коррелировали с эуплоидностью, поэтому требуются дальнейшие рандомизированные исследования, которые помогут подтвердить или опровергнуть предложенные корреляции. В настоящее время среди исследователей пока нет единого мнения о том, что является первоочередным в формировании анеуплоидии. Возможно, что видоизмененные процессы деления провоцируют неполноценное расхождение хромосом или генетическая детерминация анеуплоидии в конкретной паре «ооцит-сперматозоид» приводит к нарушению идеальной картины клеточного цикла.

Интересно также отметить тот факт, что специфических морфокинетических характеристик, по которым можно было бы определить пол эмбриона, пока не установлено. Существуют публикации, в которых отмечено, что временные параметры развития эмбриона мужского пола вплоть до стадии восьми клеток короче, чем у эмбриона женского пола. По последним данным время до образования 3-х, 4-х, 5-ти бластомеров эмбрионов мужского пола были статистически значимо короче, чем у эмбрионов женского пола ( $p < 0,05$ ), также, как и продолжительность второго клеточного цикла cc2 ( $p = 0,002$ ). Авторы сообщили, что, при использовании многомерной логистической регрессии показатель времени до образования трех бластомеров менее 14 часов был наиболее релевантным параметром, связанным с полом (OR=2,452, 95% CI=1,071–5,612,  $p = 0,03$ ) [23].

В современной медицине, в том числе и в области ВРТ, практикуется персонализированный подход в терапии бесплодия пары. С этой точки зрения исследователями предпринимаются попытки проведения корреляции TLT-параметров, генетического потенциала эмбриона и клинических исходов в селективных группах пациенток. Например, авторским коллективом под руководством Rienzi было высказано сомнение в возможности прогнозирования анеуплоидии эмбрионов по 16 ключевым морфокинетическим параметрам у пациенток с неблагоприятным прогнозом (факторы неблагоприятного прогноза по отдельности или в сочетании: старший репродуктивный возраст более 36 лет, многократные неудачные попытки экстракорпорального оплодотворения, спонтанные аборт в анамнезе) [24]. Группой российских исследователей у пациенток с благоприятным прогнозом и хорошим овариальным резервом отмечена любопытная особенность: как проведение elective переноса эмбриона на пятые сутки культивирования, так и выбор эмбриона на основании показателей замедленной покадровой съемки вне зависимости от того, был ли перенос elective или не elective, оказались благоприятными факторами и повышали шанс на роды ( $p = 0,01$ ) [25]. Однако до сих пор вопрос персонализации оценки морфокинетических параметров в селективных группах пациенток остается не до конца изученным.

В 2017 году на фоне активного развития интереса к TLT Pribenszky и соавторы опубликовали мета-анализ, обобщивший данные пяти рандомизированных контролируемых исследований сравнения TLT и традиционного культивирования/выбора эмбриона. Авторы сделали заключение, что применение методики замедленной покадровой съемки и непрерывной инкубации достоверно повышает частоту развивающейся беременности (OR=1,54, 95% CI=1,21–1,97), снижает показатель раннего прерывания беременности (OR=0,66, 95% CI=0,47–0,94), и повышает частоту родов (OR=1,67, 95% CI=1,13–2,46) [26].

В 2019 году был опубликован мета-анализ Cochrane, обобщивший данные девяти рандомизированных контролируемых исследований по эффективности применения сочетания TLT и программного обеспечения для отбора эмбрионов в сравнении с традиционной инкубацией и морфологической оценкой и эффективности сочетания TLT и программного обеспечения для отбора эмбрионов по сравнению с TLT без программного обеспечения для отбора эмбрионов. По ключевым клиническим показателям различия между оцениваемыми методиками была не достоверна. Основными ограничениями мета-анализа были указаны значительная гетерогенность вмешательств и отсутствие ослепления

(маскирования вмешательства) у участников и исследователей, из-за чего, вероятнее всего, не удалось достигнуть значимых отличий по результатам. Однако было отмечено, что TLT и программное обеспечение выбора эмбриона может снизить частоту выкидышей в сравнении с применением традиционной оценки по морфологии (OR=0,63, 95% CI=0,45-0,89, N=1617) [27].

Исследование морфокинетики развивается также в направлении выявления и оценки факторов, потенциально влияющих на эмбрион, таких как показатели овариального резерва, тип протокола стимуляции, сопутствующие заболевания. В работе Muñoz и соавторами в 2013 году была выявлена интересная закономерность в связи с применяемым типом протокола стимуляции: в циклах с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона и триггером агонистом гонадотропин-рилизинг гормона (n=2101) эмбрионы на ранних этапах делились быстрее, чем те, которые были получены в протоколах с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона и триггером хорионическим гонадотропином человека (n=716). Эти различия были статистически значимы только на начальных стадиях развития зародыша t2 - t5 [28]. В отношении сопутствующих заболеваний исследователи отмечают, что, например, эндометриоз преимущественно влияет на длительность ранних морфокинетических событий, таких как tPB2, tPNa, ECC1 и S2 [29]. Эмбрионы у пациенток с поликистозом яичников на ранних этапах t3 и t4 демонстрируют замедленное деление, однако tSC и tM статистически значимо короче, чем у пациенток без этого сопутствующего заболевания [30]. В отношении маркеров овариального резерва, таких как уровень антимюллерова гормона и как возраст, не было получено значимых морфокинетических отличий, однако это направление продолжает изучаться [31-32]. Интересная работа была опубликована авторским коллективом под руководством Kahraman в 2017 году, в своем исследовании они оценивали влияние синхронности роста пула фолликулов на морфокинетические характеристики развивающихся эмбрионов. На момент пункции ооцитов присутствие фолликулов разных размеров в сопоставимых количествах от крупных (>20 мм) до промежуточных (17-20 мм) и мелких (<17 мм) считали гомогенным развитием, преобладание крупных (>20 мм) и мелких (<17 мм) фолликулов считали гетерогенным развитием. Было установлено, что показатели оплодотворения, образования blastocyst хорошего и очень хорошего качества были достоверно выше у эмбрионов, полученных из гомогенной группы фолликулов крупного диаметра. Эмбрионы, полученные из мелких фолликулов гетерогенной группы, имели достоверно большую частоту прямых делений, развивались быстрее по всем интервалам деления, чем эмбрионы, происходящие из крупных фолликулов. При сравнении медианных значений время достижения полной blastocyst для мелкого фолликула было на 1,4 часа быстрее, чем для крупного фолликула, при этом эмбрионы, происходящие из мелких фолликулов, имели более высокую частоту остановки развития. Многофакторный анализ показал, что гомогенность фолликулярного пула (то есть наличие фолликулов разного диаметра в сопоставимых количествах) и размер фолликулов оказывают в дальнейшем значительное влияние на развитие и качество blastocyst [33].

В «Рекомендациях по эффективной практике использования TLT», опубликованных в 2020 году, аккumulированы изученные варианты морфокинетических параметров, имеющих биологическое и(или) клиническое значение [16]. В 2021 году вышла публикация Reignier и соавторов [34], освещающая взаимосвязь TLT и таких инновационных клинических показателей, как общего кумулятивного показателя живорождения - доли пар, достигших живорождения на протяжении всех проведенных попыток ВРТ, включая все попытки ИКСИ, и времени до живорождения - интервала в днях от первой контролируемой стимуляции яичников до даты живорождения. По данным авторов общий кумулятивный показатель живорождения при применении TLT был статистически достоверно выше на 10,5%, чем при традиционной инкубации (p=0,02). Медианные значения времени до живорождения были достоверно короче при применении TLT (464 дня при TLT против 596 дней при традиционной инкубации, p=0,01).



Одним из последних и наиболее перспективных направлений в эмбриологии является комбинация TLT и возможностей так называемого искусственного интеллекта. С учетом того, что при использовании технологии покадровой съемки происходит накопление большого количества графической информации, она требует для адекватной обработки мощного программного обеспечения для анализа целого спектра динамичных переменных и их комбинаций. Первые работы по применению технологий такого анализа с элементами программного самообучения были опубликованы в 2019 году. Около 50000 изображений, полученных с помощью TLT (Vitrolife, Швеция), и клинических данных по 2182 эмбрионам были положены в основу создания дерева решений, интегрирующего показатели качества эмбриона, возраста пациентки и способного прогнозировать шансы на наступление беременности [35]. В ближайшее время ожидается появление коммерчески доступных «обученных» систем искусственного интеллекта, позволяющих оценивать и прогнозировать шансы на имплантацию и роды каждого эмбриона с учетом имеющихся переменных параметров.

За прошедшие 20 лет технология покадровой съемки в эмбриологии шагнула далеко вперед, поддерживая тем самым вектор развития ВРТ в целом: повышение эффективности ЭКО путем не инвазивных методов отбора наиболее потенциальных к имплантации эмбрионов, снижения влияния факторов внешней среды на развитие эмбрионов вне инкубатора. Современные направления исследований с применением метода TLT – это продолжение разработки морфокинетических алгоритмов и их эффективных критериев, внедрение технологий искусственного интеллекта, адаптация этих инструментов в клинической практике, поиск и оценка возможных факторов влияния на морфокинетику эмбрионов, контроль качества работы эмбриологических лабораторий. Будущее развитие этой технологии представляется в сочетании не только с возможностями искусственного интеллекта, но и комбинации с перспективой использования не инвазивного генетического скрининга, оценки метабономики и протеомики развивающихся эмбрионов.

**Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования.**

## Литература References

1. Yovich JL. Founding pioneers of IVF update: Innovative researchers generating livebirths by 1982. *Reproductive Biology*. 2020;20(1):111-113. DOI: 10.1016/j.repbio.2019.12.008
2. Nidhjem Dzhozef. *Istorija jembriologii*. М.: Gos. izd-vo inostr. lit., 1947. 342s.
3. Rajkov B.E. *Karl Ber, ego zhizn' i trudy*. М., L.: Izd-vo AN SSSR, 1961. 524s.
4. Alper BS, Hand JA, Elliott SG et al. How much effort is needed to keep up with the literature relevant for primary care? *Journal of the Medical Library association*. 2004;92(4):429.
5. Densen P. Challenges and opportunities facing medical education. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2011;122:48.
6. Payne D, Flaherty SP, Barry MF & Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human reproduction*. 1997;12(3):532-541. DOI: 10.1093/humrep/12.3.532.
7. Nakahara T, Iwase A, Goto M et al. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2014;27(2-3):93-96. DOI: 10.1007/s10815-010-9385-8.
8. Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive biomedicine online*. 2008;17(3):385-391. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60222-2.
9. Meseguer M, Herrero J, Tejera A et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human reproduction*. 2011;26(10):2658-2671. DOI: 10.1093/humrep/der256.

10. Meseguer M, Rubio I, Cruz M et al. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertility and sterility*. 2012;98(6):1481-1489. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.016.
11. Holte J, Berglund L, Milton K et al. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Human Reproduction*. 2007;22(2):548-557. DOI: 10.1093/humrep/del403.
12. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature biotechnology*. 2010;28(10):1115. DOI: 10.1038/nbt.1686.
13. Aguilar J, Motato Y, Escribá MJ et al. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reproductive biomedicine online*. 2014;28(4):475-484. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.11.014.
14. Basile N, Vime P, Florensa M et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Human Reproduction*. 2015;30(2):276-283. DOI: 10.1093/humrep/deu331.
15. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Human reproduction*. 2014;29(12):2650-2660. DOI: 10.1093/humrep/deu278.
16. Apter S, Ebner T, Freour T et al. ESHRE Working group on Time-lapse technology et al. Good practice recommendations for the use of time-lapse technology. *Human Reproduction Open*. 2020;2020(2):hoaa008. DOI: 10.1093/hropen/hoaa008.
17. Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertility and sterility*. 2012;98(6):1458-1463. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.1135.
18. Conaghan J, Chen AA, Willman SP et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertility and sterility*. 2013;100(2):412-419. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.021.
19. Campbell A, Fishel S, Bowman N et al. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reproductive biomedicine online*. 2013;26(5):477-485. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.02.006.
20. Campbell AJ, Fishel SB, Duffy S, Montgomery S. Embryo selection model defined using morphokinetic data from human embryos to predict implantation and live birth. *Fertility and Sterility*. 2013;100(3):S502. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.306
21. Desai N, Goldberg JM, Austin C & Falcone T. Are cleavage anomalies, multinucleation, or specific cell cycle kinetics observed with time-lapse imaging predictive of embryo developmental capacity or ploidy? *Fertility and sterility*. 2018;109(4):665-674. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.12.025
22. Reignier A, Lammers J, Barriere P, Freour T. Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018;36(4):380-387. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.01.001.
23. Huang B, Ren X, Zhu L et al. Is differences in embryo morphokinetic development significantly associated with human embryo sex? *Biology of reproduction*. 2019;100(3):618-623. DOI: 10.1093/biolre/i0y229.
24. Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M et al. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reproductive biomedicine online*. 2015;30(1):57-66. DOI: 10.1016/j.rbmo.2014.09.012.
25. Saraeva NV, Spiridonova NV, Tugushev et al. Optimizacija perenosa odnogo jembriona u pacientok s horoshim ovariial'nyim rezervom. *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2020;2:43. DOI: 10.24075/brsmu.2020.021.
26. Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2017;35(5):511-520. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.06.022.
27. Armstrong S, Bhide P, Jordan V et al. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019;5. DOI: 0.1002/14651858.CD011320.
28. Muñoz M, Cruz M, Humaidan P et al. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *European Journal of*

- Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2013;168(2):167-172. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.12.038>
29. Boynukalin FK, Serdarogullari M, Gultomruk M et al. The impact of endometriosis on early embryo morphokinetics: a case-control study. *Systems biology in reproductive medicine*. 2019;65(3):250-257. DOI: <https://doi.org/10.1080/19396368.2019.1573275>
30. Aono N, Obata R, Maekawa S et al. The morphokinetic characteristics of embryos derived from pcos patients. *Fertility and Sterility*. 2016;106(3):e33. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.107
31. Kotlyar A, Flyckt R, Desai N. Normal versus low AMH in patients with advanced maternal age: IVF outcomes and morphokinetic parameters. *Fertility and Sterility*. 2016;105(2):e27-e28. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.12.082
32. Warshaviak M, Kalma Y, Carmon A et al. The effect of advanced maternal age on embryo morphokinetics. *Frontiers in endocrinology*. 2019;10:686. DOI: 10.3389/fendo.2019.00686.
33. Kahraman S, Cetinkaya CP, Cetinkaya M et al. The effect of follicle size and homogeneity of follicular development on the morphokinetics of human embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2017;34(7):895-903. DOI: 10.1007/s10815-017-0935-1.
34. Reignier A, Lefebvre T, Loubersac S et al. Time-lapse technology improves total cumulative live birth rate and shortens time to live birth as compared to conventional incubation system in couples undergoing ICSI. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021:1-7. DOI: 10.1007/s10815-021-02099-z
35. Khosravi P, Kazemi E, Zhan Q et al. Deep learning enables robust assessment and selection of human blastocysts after in vitro fertilization. *NPJ digital medicine*. 2019;2(1):1-9. DOI: 10.1038/s41746-019-0096-y.

#### Авторская справка

**Шурыгина Оксана Викторовна**, доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии и эмбриологии и кафедры репродуктивной медицины, клинической эмбриологии и генетики, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; **e-mail: oks-shurygina@yandex.ru**

**Василенко Ольга Юрьевна**, соискатель кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; **e-mail: guttapercha@mail.ru**

**Юхимец Сергей Николаевич**, кандидат медицинских наук, доцент, кафедра морфологии и патологии, Медицинский университет РЕАВИЗ, Самара, Росси; **e-mail: y\_s\_n@reaviz.com**

**Шипулин Никита Александрович**, ординатор кафедры репродуктивного здоровья Института дополнительного профессионального образования с курсом иммунологии, Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия; **e-mail: nicki091096@gmail.com**