

РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЙНИХ ТА НАУКОВО-ДОСЛІДНИХ РОБІТ RESULTS THESIS AND SCIENTIFIC-RESEARCH

УДК : 618.177-089.888.11:618.179:615.357
DOI: 10.24061/2413-4260.XII.3.45.2022.2

**В.О. Юзько^{1,2}, О. М. Юзько^{1,2},
Т.А. Юзько, І.В. Чемьоркіна²,
О.А. Андрієць¹**

**ЕМБРІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ
ТА ЧАСТОТА НАСТАННЯ ВАГІТНОСТІ
У ЖІНОК ІЗ БЕЗПЛІДДЯМ В ПРОГРАМАХ
ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ
ТЕХНОЛОГІЙ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ
МЕЛАТОНІНУ**

Буковинський державний медичний університет¹
МОЗ України,
КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя»²
(м. Чернівці, Україна)

Резюме

Вступ. Технологія інтрацитоплазматичного введення сперматозоїда в яйцеклітину (ICSI) посіла основне місце серед допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) при лікуванні безпліддя. Підвищення ефективності ДРТ залишається складною медичною проблемою. У великій мірі успіх ICSI залежить від якості яйцеклітин, яка, в свою чергу, залежить від кількості фолікулів, що обумовлено овуляторним резервом (ОВ) та ефективною підготовкою пацієнток до ДРТ. Маркери ОВ добре відомі, а на мелатонін як можливий прогностичний чинник ефективності ДРТ та ОВ, увагу звернули в останні десять років. Не вивчені показники вмісту мелатоніну в фолікулярній рідині стимульованих яєчників. У той же час оцінка ембріологічних показників запліднення при застосуванні препарату мелатоніну для підготовки пацієнток та результативність програм ДРТ в цілому може бути корисною для подальшої розробки алгоритмів лікування пацієнток із безпліддям.

Мета дослідження. Оцінка ембріологічних показників, результативності програм ICSI та частоти настання вагітності у жінок із безпліддям при підготовці їх препаратом мелатоніну.

Матеріал та методи. У проспективному дослідженні брало участь 67 жінок із різними факторами безпліддя. Всі пацієнтки готувались до проведення контрольованої стимуляції яєчників (КСЯ), а в подальшому до пункції фолікулів, забору яйцеклітин та їх запліднення шляхом ICSI. Всі отримані бластоцисти були кріоконсервовані, зберігались в рідкому азоті та розморожувались за необхідності проведення ембріотрансферу. Оцінювались ембріологічні показники, кількість трансферів та ефективність настання вагітності. Згідно мети та завдання пацієнтки були розподілені на дві групи методом парних-непарних чисел: група 1 – 29 пацієнток із безпліддям, які впродовж місяця до пункції фолікулів отримували препарат «Віта-мелатонін» по 3 мг всередину на ніч, група 2 – 38 пацієнток із безпліддям, які не отримували даний препарат. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням ліцензійних програм «Microsoft Excel» і «Statistica».

Дизайн дослідження та всі методики, які були нами використані в даному проспективному дослідженні, розглянуті та схвалені комісією з біоетики закладу вищої освіти «Буковинський державний медичний університет» (протокол № 7 від 21.04.2022). НДР «Збереження та відновлення репродуктивного здоров'я жінок та дівчат при акушерській та гінекологічній патології» (державний реєстраційний номер 0121U110020. Термін виконання – 01.2021-12.2025 рр.).

Результати дослідження. Настання вагітності після розморожування бластоцист та ембріотрансферів в цілому у жінок, які отримували мелатонін, було вірогідно ($p < 0,05$) вищим в порівнянні з жінками, які не отримували мелатонін, відповідно, $86,2 \pm 6,41\%$ та $76,3 \pm 6,95\%$. На всі проведені ембріотрансфери частота настання вагітності склала, відповідно, $56,8 \pm 8,24\%$ та $52,8 \pm 7,62\%$ ($p > 0,05$), на перший ембріотрансфер $58,1 \pm 8,85\%$ та $55,3 \pm 8,15\%$ ($p > 0,05$), на другий – $43,5 \pm 16,53\%$ та $33,3 \pm 21,14\%$ ($p > 0,05$), на третій – $100,0 \pm 7,00\%$ та $80,0 \pm 17,95\%$ ($p > 0,05$).

При оцінці ембріологічних показників констатували, що у жінок, які отримували мелатонін, зрілих яйцеклітин було $83,4 \pm 6,94\%$, а в жінок, які не отримували мелатонін, $81,5 \pm 6,36\%$, але вірогідної ($p > 0,05$) різниці не було. Із зрілих яйцеклітин в процесі інкубації після технології ICSI утворилось, відповідно, $49,5 \pm 9,54\%$ та $47,2 \pm 8,72\%$ ($p > 0,05$) бластоцист, а з них бластоцист класу I – $48,6 \pm 9,36\%$ та $46,4 \pm 8,17\%$ ($p > 0,05$), класу II – $36,8 \pm 8,94\%$ та $44,4 \pm 8,13\%$ ($p > 0,05$), класу III – $14,6 \pm 6,67\%$ та $9,3 \pm 4,78\%$ ($p > 0,05$).

Висновок. Використання мелатоніну при підготовці жінок із безпліддям до застосування допоміжних репродуктивних технологій показало свою ефективність щодо настання вагітності.

Ключові слова: безпліддя; допоміжні репродуктивні технології; мелатонін; вагітність.

Вступ

В Україні щорічно реєструється понад 50 тис. випадків безплідних пар [1]. Основним методом лікування у них є допоміжні репродуктивні технології (ДРТ), зокрема запліднення шляхом ін-

трацитоплазматичного введення сперматозоїдів (ICSI) [2]. Для підвищення ефективності ДРТ актуальним залишається питання підготовки безплідних пар [3]. У той же час, успіх запліднення яйцеклітин залежить від їх якості, яка оцінюва-

лась по ефективності додаткової терапії [4]. Від кількості та якості отриманих яйцеклітин напряму залежить ефективність запліднення при процедурі ICSI, а культивування бластоцист від задовільних умов та оптимального складу хімічного середовища. Слід враховувати максимальне зменшення дії непередбачуваних негативних чинників [2].

Надмірна активація антиоксидантної системи організму, фолікулів та яйцеклітин може негативно впливати на ефективність запліднення та розвиток ембріонів. Дані літератури свідчать про позитивну роль збалансованої антиоксидантної дії в середовищах для культивування яйцеклітин та бластоцист [5].

Науковий пошук позитивної дії тих чи інших гормонів організму, зокрема мелатоніну, на процес запліднення яйцеклітин *in vitro* та розвиток бластоцист спочатку проводився на тваринах. У той же час слід зазначити, що рівень мелатоніну в цих середовищах суттєво відрізняється серед тих чи інших видів тварин [6, 7, 8, 9]. Як результат наукових пошуків було доведено, що мелатонін викazuje суттєвий вплив на дозрівання фолікулів, стан яйцеклітини та, власне, процес овуляції. В деяких роботах підкреслювали, що вміст цього гормону в фолікулярній рідині перевищує його рівень в крові. Тобто, був зроблений висновок, що сам фолікул яєчника синтезує його для себе або поглинає з крові господаря в більшій кількості [16] та відіграє важливу фізіологічну роль у дозріванні фолікулів та яйцеклітин, процесі овуляції та запліднення, розвитку бластоцист та ембріонів на ранніх стадіях [10, 11, 12, 13].

Результати застосування препаратів мелатоніну були опубліковані після проведеного подвійного сліпого рандомізованого плацебо-контрольованого дослідження. Жінки з безпліддям отримували мелатонін в дозі від 7 до 16 мг на добу, а в подальшому було проаналізовано кількість отриманих яйцеклітин, їх якість та частота настання вагітності. Паралельно досліджували концентрацію мелатоніну в сироватці крові та показники оксидантного стресу. Настання вагітності в групах з використанням мелатоніну була вищою. Інші дослідники показали, що рівень мелатоніну в сироватці крові в жінок із безпліддям, які в процесі підготовки до пункції яєчників після їх контрольованої стимуляції був вірогідно вищим в порівнянні з контрольною групою, а в фолікулярній рідині був вдвічі меншим. Зроблений висновок, що фолікул та яйцеклітини активно поглинають екзогенний мелатонін.

Мелатонін синтезується з амінокислоти триптофану та є похідним біологічного аміну серотоніну в шишкоподібній залозі. Синтез відбувається переважно ввечері та вночі. У той же час відомо, що мелатонін може синтезуватись і в інших органах людини: яєчниках та яєчках, шлунково-кишковому тракту, тимусі та сполучній тканині. Мелатонін є антиоксидантом та блокаторм вільних радикалів, іномодулятором [14]. Даний гормон має суттєвий вплив на становлення репродуктивної системи та менструальної функції [15, 16]. Механізм дії гормону мелатоніну на молекулярному рівні недостатньо вивчений. Вважають, що саме через гіпофізарні рецептори він регулює

синтез гормонів гіпофіза та репродуктивну систему [17, 18, 19].

Враховуючи велику зацікавленість науковців у вивченні ролі мелатоніну в репродуктивній медицині, достатньо багато питань недостатньо висвітлені та досліджені, зокрема застосування препаратів мелатоніну для підвищення ефективності лікування безпліддя в жінок в програмах ДРТ [3].

Метою даної роботи була оцінка ембріологічних показників, результативності програм інтрацитоплазматичного введення сперматозоїдів у яйцеклітини та частоти настання вагітності у жінок із безпліддям при підготовці їх мелатоніном.

Матеріал і методи дослідження

У проспективному дослідженні, яке виконувалось на базі КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя» (м. Чернівці), брало участь 67 жінок із різними формами безпліддя. Згідно мети і завдання пацієнтки були розподілені на дві групи методом парних-непарних чисел: група 1 – 29 пацієнток із безпліддям, які впродовж одного місяця до пункції фолікулів отримували препарат «Вітамелатонін» по 3 мг всередину на ніч, група 2 – 38 пацієнток із безпліддям, які не отримували даний препарат. Середній вік пацієнток в групі 1 був $31,4 \pm 1,3$ року, а в групі 2 – $32,3 \pm 1,1$ року. Серед пацієнток не було жінок, які працювали вночі.

Стимуляцію яєчників проводили в протоколі з використанням антагоністів гонадотропін-рилізінг-гормону з 2-3-го дня менструального циклу з використанням рекомбінантних та/або сечових гонадотропінів у добовій дозі 150-300 МО. Овуляцію ініціювали введенням рекомбінантного хоріонічного гонадотропіну в дозі 6500 МО. Ооцити отримували в результаті трансвагінальної пункції фолікулів під контролем ультразвукового дослідження через 34-36 годин після введення овуляторної дози тригера овуляції. Пункцію фолікулів виконували під внутрішньовенним наркозом.

Рухливі сперматозоїди відбирали шляхом обробки в 2-ступінчастому градієнті щільності в середовищі Sil-Selectpeus («Ferti Pro», Бельгія), після чого для відбору сперматозоїдів використовували метод «swim up».

Для запліднення ооцитів застосовували процедуру ICSI. Клітини кумулюса видаляли м'яким піпетуванням (Flexipet Cook) через 3-4 год. після забору ооцитів, використовуючи розчин гіалуронідази (Hyaluronidase in Fercult Fluhing Medium, Бельгія). Процедура ICSI виконувалась через 1-2 години після денудації на інвертованому мікроскопі Nicon Eclipse Ti («Wild Leitz GmbH», Німеччина) з використанням системи хоффманівського модуляційного контрасту та комплекту мікроманіпуляторів Narishige («Narishige», Японія).

Культивування ембріонів здійснювали в CO₂-інкубаторі при температурі 37°C у зволоженій атмосфері з 5,8% CO₂. Ембріони-сібси культивували в середовищі Global («LifeGlobal Group», Бельгія). Ембріони культивували індивідуально у мікрокраплях під шаром мінеральної олії. На 3 добу після запліднення проводили заміну середовища на аналогічне свіже. Оцінювали частоту розвитку ембріонів до 4-8 клітинної стадії, ком-

пактизації та формування бластоцист у період з 2-го по 6-й день ембріонального розвитку. Зиготи та ембріони індивідуально оцінювали під мікроскопом через 18, 45, 72 та 96 год. після запліднення для оцінки їх розвитку та якості. На 5-6-ту добу розвитку проводили оцінку якості бластоцист, що сформувалися, за D. Gardner [20].

Кріоконсервування ембріонів у всіх порівнюваних групах проводили з використанням набору для вітрифікації Vitriification Media (Kitazato Corporation, Японія), а розморожування з використанням набору Thawing Media (Kitazato Corporation, Японія). Процедури виконували згідно з протоколами фірми-виробника.

Розморожування кріоконсервованих ембріонів проводили безпосередньо в день перенесення ембріона (ПЕ). Клінічну вагітність визначали при ультразвуковому дослідженні на 5-му тижні після ПЕ за наявності плідного яйця в порожнині матки, куприкотімному розміру плода 2-4 мм та реєстрації серцебиття.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням ліцензійних програм «Microsoft Excel» і «Statistica».

Дизайн дослідження та всі методики, які були нами використані в даному проспективному дослідженні, розглянуті та схвалені комісією з біоетики закладу вищої освіти «Буковинський державний медичний університет» (протокол № 7 від 21.04.2022). Дослідження відповідає вимогам

Хельсінкської декларації.

Результати дослідження та їх обговорення

Відомо, що підвищення результативності циклів запліднення при ДРТ в лікуванні безпліддя є складним медичним завданням та забезпечується цілим комплексом складових: чинниками безпліддя [2], оваріальним резервом, якістю та кількістю яйцеклітин, ембріонів [21].

Продовжується пошук схем для підвищення ефективності програм ДРТ [3]. Увагу вчених привернув мелатонін. Вважають, що він є медіатором, який передає екологічні стимули ооцитів і забезпечує взаємодії між факторами навколишнього середовища і епігенетичною системою спадковості [9, 12].

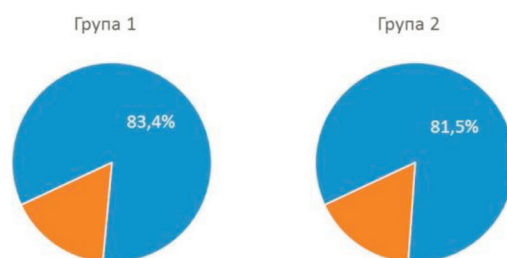


Рис.1. Зрілість отриманих яйцеклітин

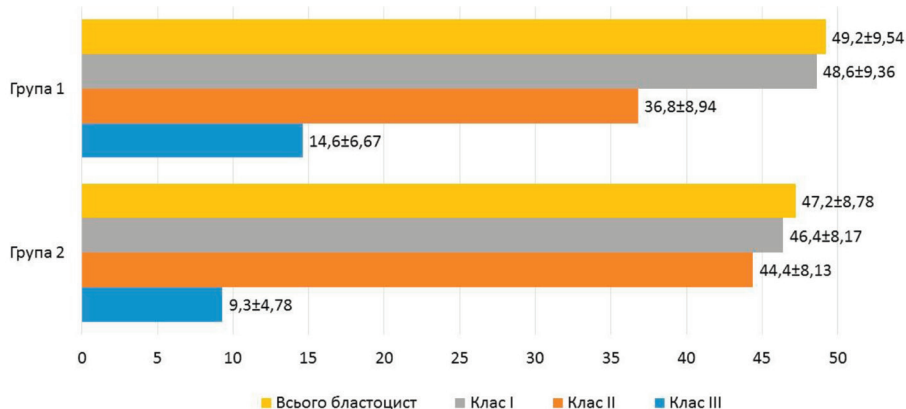


Рис. 2. Кількість та якість отриманих бластоцист

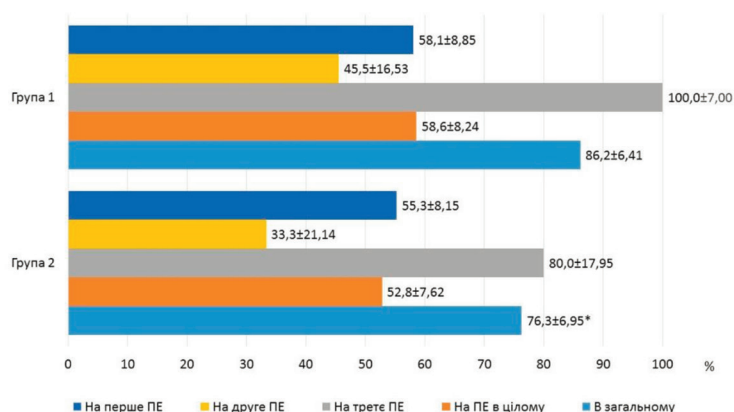


Рис. 3. Частота настання вагітності на перенесення ембріонів (ПЕ) по їх послідовності та в цілому, а також вагітність в загальному

Примітка: * - вірогідна різниця, $p < 0,05$.

Після пункції фолікулів у пацієнок першої групи ми отримали 451 яйцеклітину, а в другій групі – 616 яйцеклітин. Результати дослідження їх зрілості наведені на рис.1. Як свідчать отримані дані, у пацієнок першої групи зрілих яйцеклітин було $83,4 \pm 6,9\%$ від усіх отриманих, а в пацієнок другої групи – $81,5 \pm 6,3\%$, що дещо менше, але вірогідної різниці ми не знайшли ($p > 0,05$). На рис. 2 представлені результати дослідження отриманих зрілих яйцеклітин. Так, в процесі інкубації у пацієнок першої групи всього утворилось 185 бластоцист, що склало $49,2 \pm 9,5\%$, а в пацієнок другої групи – 237 ($47,2 \pm 8,7\%$), що дещо менше в порівнянні з першою групою, але достовірної різниці нами не виявлено ($p > 0,05$). Якщо розглянути якість отриманих бластоцист від всіх зрілих яйцеклітин по класам, картина наступна: клас I в пацієнок першої групи склав $48,6 \pm 9,3\%$, а в пацієнок другої групи – $46,4 \pm 8,1\%$, тобто дещо менше, але вірогідної різниці не було ($p > 0,05$), відповідно, клас II – $36,8 \pm 8,9\%$ та $44,4 \pm 8,1\%$, клас III – $14,6 \pm 6,6\%$ та $9,3 \pm 4,7\%$. Тобто у пацієнок першої групи утворилось дещо менше бластоцист класу II, але більше класу III у порівнянні з пацієнками другої групи, але різниця була не достовірною ($p > 0,05$).

Результати дослідження по частоті настання вагітності наведені на рис. 3. Так, частота настання вагітності на перше перенесення ембріонів у пацієнок першої групи була $56,1 \pm 8,85\%$, що дещо більше порівняно з даним показником у пацієнок другої групи ($55,3 \pm 8,15\%$), але різниця була не достовірною ($p > 0,05$). Аналогічна ситуація спостерігалась з частотою настання вагітності на друге перенесення ембріонів (відповідно, $45,5 \pm 16,53\%$ та $33,3 \pm 21,14\%$) та третє – $100,0 \pm 7,00\%$ та $80,0 \pm 17,95\%$, хоча при всіх трьох перенесеннях ембріонів ми не змогли відмітити вірогідність різниці по групам ($p > 0,05$). Частота настання вагітності на всі перенесення ембріонів у цілому в першій групі була $56,8 \pm 8,24\%$, а в другій – $52,8 \pm 7,62\%$, що дещо менше, але без вірогідної різниці ($p > 0,05$). Що стосується загальної частоти настання вагітності, то в першій групі вона склала $86,2 \pm 6,41\%$, що вірогідно ($p < 0,05$) більше в порівнянні з даним показником у другій групі ($76,3 \pm 6,95\%$).

Таким чином, за результатами проведеного нами дослідження по кількості зрілих яйцеклітин та отриманих з них якісних бластоцист слід визнати, що застосування мелатоніну може бути корисним для покращення ембріологічних показників в програмах ДРТ при лікуванні безпліддя. Дозрівання яйцеклітин у фолікулярній рідині супроводжується активацією окислювальних процесів, а при індукції супероуляції перекисне окислення ліпідів і білків збільшується в десятки разів. Сам окислювальний стрес (ОС) має руйнівну цитоток-

сичну дію та активує апоптоз [22].

Природні антиоксиданти традиційно з успіхом застосовуються в медицині [23]. Мелатонін (від лат. melas – чорний) – локальний антиоксидант, який синтезується в мітохондріях. По суті, це гормон фотоперіодичності, що виробляється переважно вночі. Мелатонін є потужним ендогенним адаптогеном, що має імуномодулюючу та мембраностабілізуючу дію, нормалізує проникність стінки судин, покращує мікроциркуляцію ендотелію, нормалізує гемодинамічні процеси [24, 25].

В останні десятиліття активно вивчається роль мелатоніну як прямого інгібітору вільних радикалів у репродуктивній фізіології. Повідомлялось, що під час проведення стимуляції супероуляції вміст мелатоніну у фолікулярній рідині в декілька разів перевищує його рівень у сироватці крові. Тобто, мова йде про протекторний вплив на зріючу яйцеклітину за рахунок зменшення ОС напевно, за рахунок нейтралізації вільних радикалів [11], оскільки антиоксидантні властивості гормону перевершують інші антиокислювачі, такі як глутатіон, манітол і вітамін Е. Мелатонін є ефективним нейтралізатором вільних радикалів токсичних реагентів на основі кисню, гідроксильних радикалів та азотистих сполук, збільшує ефективність переходу електронів між мітохондріальними дихальними комплексами, які є основними продуцентами вільних радикалів. Мелатонін має непряму дію за рахунок стимуляції утворення антиоксидантних ферментів і глутатіону як важливого інтрацелюлярного антиокислювача. Кілька метаболітів мелатоніну, які утворюються в процесі нейтралізації ушкоджуючих агентів, самі є акцепторами вільних радикалів [10, 26].

І хоча доказова база ефективності застосування мелатоніну тільки формується, позитивні результати захисту яйцеклітин від вільних радикалів для збереження їх якості відомі [27, 28, 29]. Аналіз частоти настання вагітності у пацієнок, які отримували мелатонін, також засвідчив, що вона була вищою. Це корелює з результатами досліджень інших авторів [3, 30].

Висновок

Використання мелатоніну при підготовці жінок із безпліддям до застосування допоміжних репродуктивних технологій показало свою ефективність щодо настання вагітності.

Перспектива подальших досліджень

У подальшому планується продовжувати з'ясувати місце і роль мелатоніну в сучасній репродукції людини.

Конфлікт інтересів: відсутній

Джерела фінансування: самофінансування.

Література:

1. Юзько ОМ, Юзько ТА, Руденко НГ. Допоміжні репродуктивні технології в Україні. Жіночий лікар. 2021;3(95):22-26.
2. Li MC, Mínguez-Alarcón L, Arvizu M, Chiu YH, Ford JB, Williams PL, et al. Waist circumference in relation to outcomes of infertility treatment with assisted reproductive technologies. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 2019[cited 2021 Dec 17];220(6):578. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6545132/pdf/nihms-1521268.pdf> doi: 10.1016/j.ajog.2019.02.013
3. Tamura H, Jozaki M, Tanabe M, Shirafuta Y, Mihara Y, Shinagawa M, et al. Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and Ovarian Aging. Int J Mol Sci [Internet]. 2020[cited 2021 Dec 12];21(3):1135. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7036809/pdf/ijms-21-01135.pdf> doi: 10.3390/ijms21031135

4. Wei D, Zhang C, Xie J, Song X, Yin B, Liu Q, Hu L, Hao H, Geng J, Wang P. Supplementation with low concentrations of melatonin improves nuclear maturation of human oocytes in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2013;30:933-938. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0021-2>
5. Lin X, Dai Y, Tong X, Xu W, Huang Q, Jin X, et al. Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility. *Redox Biol* [Internet]. 2020[cited 2022 Feb 14];30:101431. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231719314995> doi: 10.1016/j.redox.2020.101431
6. Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, Amemiya A, Itoh M. The effect of melatonin on in vitro fertilisation and embryo development in mice. *Journal of Pineal Research*. 2000;28:48-51. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2000.280107.x>
7. Papis K, Poleszczuk O, Wenta-Muchalska E, Modlinski J. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. *Journal of Pineal Research*. 2007;43:321-326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00479.x>
8. Rodriguez-Osorio N, Kim I, Wang H, Kaya A, Memili E. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. *Journal of Pineal Research*. 2007;43:283-288. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00475.x>
9. Yong W, Ma H, Na M, Gao T, Zhang Y, Hao L, et al. Roles of melatonin in the field of reproductive medicine. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021[cited 2022 Jan 17];144:112001. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221007848?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.biopha.2021.112001
10. Bhattacharya K, Sengupta P, Dutta S. Role of melatonin in male reproduction. *Asian Pac J Reprod*. 2019;8:211-9. doi: 10.4103/2305-0500.268142
11. Espino J, Macedo M, Lozano G, Ortiz Á, Rodríguez C, Rodríguez AB, et al. Impact of Melatonin Supplementation in Women with Unexplained Infertility Undergoing Fertility Treatment. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2019[cited 2022 Jan 17];8(9):338. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6769719/pdf/antioxidants-08-00338.pdf> doi: 10.3390/antiox8090338
12. Genario R, Morello E, Bueno AA, Santos HO. The usefulness of melatonin in the field of obstetrics and gynecology. *Pharmacol Res* [Internet]. 2019[cited 2022 Feb 3];147:104337. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661819302889> doi: 10.1016/j.phrs.2019.104337
13. Ivanov D, Mazzoccoli G, Anderson G, Linkova N, Dyatlova A, Mironova E, et al. Melatonin, Its Beneficial Effects on Embryogenesis from Mitigating Oxidative Stress to Regulating Gene Expression. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021[cited 2022 Feb 28];22(11):5885. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8198864/pdf/ijms-22-05885.pdf> doi: 10.3390/ijms22115885
14. Cruz MH, Leal CL, Cruz JF, Tan DX, Reiter RJ. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology*. 2014;82(7): 925-32. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.011.
15. Tamura H, Kawamoto M, Sato S, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Aasada H, Takaki E, Reiter RJ, Sugino N. Long-term melatonin treatment delays ovarian aging. *J. Pineal. Res.* 2017;62(2):e12381. doi: 10.1111/jpi.12381.
16. Seko LM, Moroni RM, Leitao VM, Teixeira DM, Nastri CO, Martins WP. Melatonin supplementation during controlled ovarian stimulation for women undergoing assisted reproductive technology: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*. 2014;101:154-61; doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.09.036.
17. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr. J.* 2013;60(1):1-13. doi: 10.1507/endocrj.ej12-0263
18. Qing He, Lifang Gu, Qingyin Lin, Yi Ma, Chunlian Liu, Xiuying Pei, P Andy Li, Yanzhou Yang. The Imp21 Mutation Causes Ovarian Aging Through ROS-Wnt/ β -Catenin-Estrogen Pathway: Preventive Effect of Melatonin. *Endocrinology*. 2020;161(9):bqaa119. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa119>.
19. Jamilian M, Foroozanfar F, Mirhosseini N, Kavossian, E. Effects of melatonin supplementation on hormonal, inflammatory, genetic, and oxidative stress parameters in women with polycystic ovary syndrome. *Front Endocrinol*. 2019;10:273. doi: 10.3389/fendo.2019.00273.
20. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*. 2000;73(6):1155-1158. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00518-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00518-5)
21. Ballesta-Castillejos A, Gomez-Salgado J, Rodriguez-Almagro J, Ortiz-Esquinas I, Hernández-Martínez A. Obstetric and perinatal complications associated with assisted reproductive treatment in Spain. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(12):2435-45. doi: 10.1007/s10815-019-01631-6
22. Yang L, Xu H, Chen Y, Miao C, Zhao Y, Xing Y, et al. Melatonin: Multi-Target Mechanism Against Diminished Ovarian Reserve Based on Network Pharmacology. *Front Endocrinol* [Internet]. 2021[cited 2022 Feb 11];12:630504. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8095380/pdf/fendo-12-630504.pdf> doi: 10.3389/fendo.2021.630504
23. Turner KA, Rambhatla A, Schon S, Agarwal A, Krawetz SA, Dupree JM, et al. Male Infertility is a Women's Health Issue-Research and Clinical Evaluation of Male Infertility Is Needed. *Cells* [Internet]. 2020[cited 2021 Dec 28];9(4):990. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7226946/pdf/cells-09-00990.pdf> doi: 10.3390/cells9040990
24. Fernando S, Biggs SN, Horne RSC, Vollenhoven B, Lolatgis N, Hope N, Wong M, et al. The impact of melatonin on the sleep patterns of women undergoing IVF: a double blind RCT. *Hum Reprod Open* [Internet]. 2018[cited 2022 Feb 17];2017(4):hox027. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6276665/pdf/hox027.pdf> doi: 10.1093/hropen/hox027
25. Fernando S, Wallace EM, Vollenhoven B, Lolatgis N, Hope N, Wong M, et al. Melatonin in Assisted Reproductive Technology: A Pilot Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *Front Endocrinol* [Internet]. 2018[cited 2022 Jan 5];9:545. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6157331/pdf/fendo-09-00545.pdf> doi: 10.3389/fendo.2018.00545
26. Da Broi MG, Jordão AA Jr, Ferriani RA, Navarro PA. Oocyte oxidative DNA damage may be involved in minimal/mild endometriosis-related infertility. *Mol Reprod Dev*. 2018;85(2):128-36. doi: 10.1002/mrd.22943
27. Christianson MS, Bellver J. Innovations in assisted reproductive technologies: impact on contemporary donor egg practice and future advances. *Fertil Steril*. 2018;110(6):994-1002. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.09.020
28. La Rosa VL, Barra F, Chiofalo B, Platania A, Di Guardo F, Conway F, et al. An overview on the relationship between endometriosis and infertility: the impact on sexuality and psychological well-being. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 2020;41(2):93-7. doi: 10.1080/0167482X.2019.1659775
29. Levi-Setti PE, Cirillo F, Scolari V, Morengi E, Heilbron F, Girardello D, et al. Appraisal of clinical complications after 23,827 oocyte retrievals in a large assisted reproductive technology program. *Fertil Steril*. 2018;109(6):1038-43. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.02.002
30. Suslikova LV, Kaminskyi VV, Chayka KV, Kaminskyi AV, Serbeniuk AV, Zhykharskyi RV, et al. Effect of endometrial injection scratching in cycles of treatment by assisted reproductive technology methods. *Репродуктивна ендокринологія*. 2020;3:49-54. doi: 10.18370/2309-4117.2020.53.49-54

EMBRYOLOGICAL INDICATORS AND INCIDENCE OF PREGNANCY IN WOMEN WITH INFERTILITY UNDERGOING ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY PROGRAMS WITH THE USE OF MELATONIN

V.O. Yuzko^{1,2}, O. M. Yuzko^{1,2}, T.A. Yuzko², I.V. Chemiorkina², O.A. Andriets¹

**Bukovinian State Medical University¹, Medical Center of Infertility Treatment²
(Chernivtsi, Ukraine)**

Summary

Introduction. The technology of intracytoplasmic sperm injection into the egg cell (ICSI) has taken the main place among assisted reproductive technologies (ART) in the treatment of infertility. Improving the effectiveness of ART remains a complex medical problem. To a large extent, the success of ICSI depends on the quality of the oocytes, which, in its turn, depends on the number of follicles, which is determined by the ovulatory = ovarian reserve (OV) and effective preparation of patients for ART. The markers of OV are well known, and attention has been drawn to melatonin as a possible prognostic factor for the effectiveness of ART and OV in the last ten years. The indicators of melatonin content in the follicular fluid of stimulated ovaries have not been studied. At the same time, the assessment of embryological indicators of fertilization when using the medication melatonin for the preparation of patients and the effectiveness of ART programs in general can be useful for the further development of treatment algorithms for patients with infertility.

The objective of the study. Evaluation of embryological indicators, the effectiveness of ICSI programs and the incidence of pregnancy in women with infertility during their preparation with melatonin.

Materials and methods. 67 women with various infertility factors participated in the prospective study. All patients were prepared for controlled ovarian stimulation (COS), and subsequently for follicular puncture, oocyte retrieval and fertilization by ICSI. All obtained blastocysts were cryopreserved, stored in liquid Nitrogen and thawed when embryo transfer was necessary. Embryological indicators, the number of transfers and the effectiveness of pregnancy incidence were evaluated. According to the purpose of the task, the patients were divided into two groups by the method of even-odd numbers: group 1 – 29 patients with infertility, who received the preparation "Vita-melatonin" 3 mg orally before bedtime, during one month before the follicles puncture, group 2 – 38 patients with infertility, who did not receive this medicine. Statistical processing of the obtained results was carried out using the licensed programs "Microsoft Excel" and "Statistica".

The research design and all the methods we used in this prospective study were reviewed and approved by the bioethics commission of the higher education institution "Bukovinian State Medical University" (protocol No. 7 dated 04/21/2022). SRW "Preservation and restoration of reproductive health of women and girls with obstetric and gynecological pathology" (state registration number 0121U110020. Implementation period – 01.2021-12.2025).

Results of the research. The incidence of pregnancy after thawing of blastocysts and embryo transfers in general in women who received melatonin was significantly ($p < 0.05$) higher compared to women who did not receive melatonin, respectively, $86.2 \pm 6.41\%$ and $76.3 \pm 6.95\%$. For all performed embryo transfers, the incidence of pregnancy was $56.8 \pm 8.24\%$ and $52.8 \pm 7.62\%$ ($p > 0.05$), respectively, for the first embryo transfer $58.1 \pm 8.85\%$ and $55.3 \pm 8.15\%$ ($p > 0.05$), for the second - $43.5 \pm 16.53\%$ and $33.3 \pm 21.14\%$ ($p > 0.05$), for the third – $100.0 \pm 7.00\%$ and $80.0 \pm 17.95\%$ ($p > 0.05$).

When assessing embryological indicators, it was found that in women who received melatonin, the number of mature oocytes was $83.4 \pm 6.94\%$, and in women who did not receive melatonin, $81.5 \pm 6.36\%$, but there was no significant ($p > 0.05$) difference. Out of mature oocytes in the process of incubation after the ICSI technology, $49.5 \pm 9.54\%$ and $47.2 \pm 8.72\%$ ($p > 0.05$) blastocysts were formed, respectively, and from them blastocysts of class I – $48.6 \pm 9.36\%$ and $46.4 \pm 8.17\%$ ($p > 0.05$), class II – $36.8 \pm 8.94\%$ and $44.4 \pm 8.13\%$ ($p > 0.05$), class III – $14.6 \pm 6.67\%$ and $9.3 \pm 4.78\%$ ($p > 0.05$).

Conclusion. The use of melatonin in the preparation of women with infertility for the use of assisted reproductive technologies has shown its effectiveness in terms of pregnancy incidence.

Key words: Infertility; Assisted Reproductive Technologies; Melatonin; Pregnancy.

Contact Information:

Юзько Вікторія Олександрівна – аспірант Буковинського державного медичного університету, лікар акушер-гінеколог КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя», м. Чернівці, Україна
e-mail: yuzkoviktorii@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2793-8851>
Researcher ID: GLN-7855-2022
Scopus Authors ID: 57219529058

Юзько Олександр Михайлович – д.мед.н., професор, завідувач кафедри акушерства та гінекології Буковинського державного медичного університету, медичний директор КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя», м. Чернівці, Україна
e-mail: prof.yuzko@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1270-9095>
Researcher ID: D-8126-2017
Scopus Authors ID: 42962929800

Юзько Тамара Анатоліївна – к.мед.н., доцент, лікар акушер-гінеколог, директор КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя», м. Чернівці, Україна
e-mail: reprod.cv@gmail.com
Researcher ID: GPX-5721-2022

Чемьоркіна Ірина Василівна – ембріолог КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя», м. Чернівці, Україна
e-mail: chemerkina.irina@gmail.com
Researcher ID: GPX-6560-2022

Андрієць Оксана Анатоліївна – д.мед.н., професор кафедри акушерства та гінекології, в.о. ректора закладу вищої освіти «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна
e-mail: oandriiets@bsmu.edu.ua
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9103-8546>
Researcher ID: AAP-9746-2021
Scopus Author ID: 57221797595

© В.О. Юзько, О. М. Юзько, Т.А.Юзько,
 І.В. Чемьоркіна, О.А. Андрієць, 2022

**Контактна інформація:**

Victoria Yuzko – postgraduate student of Bukovinian State Medical University, obstetrician-gynecologist of the Medical Center of Infertility Treatment, Chernivtsi, Ukraine
yuzkoviktorii@gmail.com, +38951299075
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2793-8851>
Researcher ID: GLN-7855-2022
Scopus Authors ID: 57219529058

Olexandr Yuzko – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology of Bukovinian State Medical University, Medical Director of the Medical Center of Infertility Treatment, Chernivtsi, Ukraine, prof.yuzko@gmail.com, +380506752334
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1270-9095>
Researcher ID: D-8126-2017
Scopus Authors ID: 42962929800

Tamara Yuzko – Candidate of Medical Sciences, associate professor, obstetrician-gynecologist, director of the Medical Center for the Treatment of Infertility, Chernivtsi, Ukraine
reprod.cv@gmail.com, +380505613722
Researcher ID: GPX-5721-2022

Iryna Chemiorkina – embryologist of the Medical Center for Infertility Treatment, Chernivtsi, Ukraine
chemerkina.irina@gmail.com, +380503071325
Researcher ID: GPX-6560-2022

Oksana Andriiets - Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, acting rector of Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine
oandriiets@bsmu.edu.ua, +38505116333
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9103-8546>
Researcher ID: AAP-9746-2021
Scopus Author ID: 57221797595

© V.O. Yuzko, O. M. Yuzko, T.A. Yuzko,
 I.V. Chemiorkina, O.A. Andriets, 2022

Надійшло до редакції 10.06.2022 р.
 Підписано до друку 20.08.2022 р.