

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
федеральное государственное бюджетное учреждение  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ  
И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

*На правах рукописи*

БЕЙК  
Екатерина Павловна

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММ  
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ  
У ПАЦИЕНТОК ПОЗДНЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА  
НА ОСНОВАНИИ ПРОВЕДЕНИЯ  
ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА

**14.01.01- акушерство и гинекология**

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент Долгушина Н.В.

Москва 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	4
<b>ГЛАВА 1. Современные методы лечения бесплодия у пациенток позднего репродуктивного возраста (обзор литературы)</b>	
1.1. Актуальность проблемы бесплодия у женщин позднего репродуктивного возраста.....	11
1.2. Причины снижения фертильности у женщин позднего репродуктивного возраста.....	12
1.3. Влияние возраста на качество ооцитов, хромосомные аномалии ооцитов и анеуплоидию эмбрионов.....	16
1.4. Преимплантационный генетический скрининг.....	21
1.5. Преимплантационный генетический скрининг у пациенток позднего репродуктивного возраста.....	26
<b>ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования</b>	
2.1. Дизайн исследования.....	30
2.2. Критерии включения и исключения.....	33
2.3. Объем выборки.....	34
2.4. Методы исследования.....	35
2.4.1. Общеклинические методы обследования.....	37
2.4.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза.....	37
2.4.3. Гормональное исследование.....	38
2.4.4. Исследование эякулята.....	38
2.4.5. Стимуляция суперовуляции и трансвагинальная пункция фолликулов.....	39
2.4.6. Морфологическая оценка ооцитов и оплодотворение.....	40
2.4.7. Морфологическая оценка эмбрионов.....	41
2.4.8. Преимплантационный генетический скрининг.....	42
2.4.9. Подготовка эндометрия в криоцикле.....	44

2.4.10. Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода.....	45
<b>2.5. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ.....</b>	<b>45</b>
<b>ГЛАВА 3. Характеристика пациенток, включенных в исследование</b>	
3.1. Клинико-анамнестические данные пациенток .....	47
3.2 Лабораторные данные пациенток .....	51
3.3. Особенности протоколов стимуляции суперовуляции.....	52
3.4. Характеристика сперматогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза.....	53
<b>ГЛАВА 4. Исходы программ ВРТ в зависимости от назначения ПГС у пациенток позднего репродуктивного возраста</b>	
4.1. Исходы программ ВРТ.....	57
4.2. Многофакторный анализ эффективности программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста.....	60
4.3. Частота и структура анеуплоидий эмбрионов.....	66
4.4. Пороговый возраст пациенток по развитию анеуплоидии эмбрионов ...	71
4.5. Пороговый возраст эффективности программ ВРТ с применением ПГС.....	73
4.6. Эффективность программ ВРТ с ПГС у пациенток позднего репродуктивного возраста в зависимости от овариального резерва.....	76
4.7. Эффективность программ ВРТ при назначении различных видов ПГС у пациенток позднего репродуктивного возраста.....	77
4.8. Клинико-экономическая эффективность ЭКО с ПГС у пациенток позднего репродуктивного возраста.....	78
<b>ГЛАВА 5. Обсуждение полученных результатов.....</b>	<b>84</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>95</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>98</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>100</b>
<b>СПИСОК</b>	
<b>ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>Ошибка!</b>
<b>Закладка не определена.</b>	

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Репродуктивным (фертильным) возрастом женщины называется период, в течение которого она способна к вынашиванию и рождению ребёнка, в котором отдельно выделяется поздний репродуктивный возраст (ПРВ) (после 35 лет) [1]. За последние годы доля первородящих женщин ПРВ значительно возросла. На сегодняшний день средний возраст рождения первого ребенка для женщин на 3,5 года больше, чем три десятилетия назад [2], [3].

Пациентки ПРВ имеют ряд особенностей, усложняющих реализацию репродуктивной функции, по сравнению с пациентками раннего репродуктивного возраста (РРВ). У женщин старше 35 лет происходит постепенное снижение овариального резерва [3]. После 40 лет скорость атрезии фолликулов увеличивается вдвое [3], [4]. И даже при сохранным овариальном резерве у пациенток старше 35 лет увеличивается риск анеуплоидии ооцитов и, как следствие, эмбрионов, что также снижает вероятность наступления беременности. Кроме того, женщины ПРВ имеют более высокую соматическую и гинекологическую заболеваемость [5]. Все это снижает шансы наступления как спонтанной беременности, так и беременности, полученной в результате вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [3].

Некоторые исследователи считают, что возраст женщины старше 40 лет является однозначным показанием для лечения бесплодия с помощью методов ВРТ [7]. Однако в группе пациенток ПРВ эффективность программ ВРТ не превышает 10%, а вероятность наступления беременности снижается на 4,7% из расчета на каждый год жизни женщины старше 30 лет [3], [7].

Преимплантационный генетический скрининг (ПГС) является методом, предотвращающим перенос эмбрионов с аномальным числом хромосом [8]. Благодаря этому методу диагностики возможно производить отбор эуплоидных эмбрионов, что, в свою очередь, ведет к увеличению частоты наступления беременности, уменьшению репродуктивных потерь и снижению риска рождения детей с генетическими нарушениями [10], [11].

В качестве методов исследования для ПГС в настоящее время используют флуоресцентную гибридизацию *in situ* (от англ. - fluorescent *in situ* hybridization, FISH), метод сравнительной геномной гибридизации (от англ. - comparative genomic hybridization, CGH) и секвенирование нового поколения (от англ. – next-generation sequencing, NGS) [3]. Каждый из этих методов имеет ряд преимуществ и недостатков [9], [10]. При этом, в настоящее время окончательно не определена роль ПГС в эффективности программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста.

### **Степень разработанности темы исследования**

ПГС является высоко технологичным методом, повышающим эффективность программ ВРТ. При этом риск развития анеуплоидии эмбрионов и эффективность программ ВРТ с применением ПГС в различных возрастных группах пациенток точно не известны. Остается дискутируемым вопрос о числе эмбрионов, которое необходимо получить для проведения ПГС у пациенток различного возраста, для увеличения частоты наступления беременности и живорождения. Не до конца изучена эффективность различных методик ПГС в реализации программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста.

## **Цель исследования**

Изучение роли преимплантационного генетического скрининга в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста.

## **Задачи исследования**

1. Провести анализ исходов программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста с учетом параметров оогенеза, раннего эмбриогенеза и клинико-лабораторных данных пациенток.
2. Определить частоту и типы анеуплоидии эмбрионов у пациенток позднего репродуктивного возраста.
3. Определить пороговый возраст пациенток, при котором вероятность развития анеуплоидии эмбрионов является максимальной.
4. Оценить эффективность программ ВРТ при назначении различных видов ПГС (FISH на 3-е сутки, аCGH на 5-е сутки) у пациенток позднего репродуктивного возраста.
5. Провести анализ клинико-экономической эффективности ЭКО с ПГС у пациенток позднего репродуктивного возраста.

## **Научная новизна**

Выявлены клинико-анамнестические и лабораторные факторы риска неудач программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста с созданием модели прогноза наступления беременности в зависимости от клинико-лабораторных факторов.

Выявлен пороговый возраст пациенток позднего репродуктивного возраста, при котором вероятность получения эмбрионов с анеуплоидией

максимально возрастает, и определен риск развития анеуплоидии эмбрионов в зависимости от возраста пациенток.

Выявлен пороговый возраст эффективности программ ВРТ и рассчитано необходимое число зигот и бластоцист, которое необходимо получить для получения хотя бы одного эуплоидного эмбриона, в различных возрастных группах пациенток.

Изучена эффективность экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с различными видами преимплантационного генетического скрининга в реализации программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста.

### **Практическая значимость**

В результате проведенного исследования выделены группы риска низкой эффективности программ ВРТ среди пациенток позднего репродуктивного возраста с учетом выявленных клинико-лабораторных предикторов.

Создана модель прогноза эффективности программ ВРТ на основании выявленных клинико-лабораторных факторов, которые могут быть использованы в качестве прогностических критериев эффективности программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста.

Определены показания для одномоментного проведения ПГС или накопления эмбрионов для проведения ПГС на основании рассчитанного необходимого числа зигот и бластоцист в различных возрастных группах пациенток.

Проведен анализ эффективности, в том числе клинико-экономической эффективности, экстракорпорального оплодотворения с различными видами преимплантационного генетического скрининга у пациенток позднего репродуктивного возраста, что послужило обоснованием его применения в изучаемой группе пациентов.

## **Методология и методы исследования**

Проведено ретроспективное и проспективное обследование супружеских пар в программах ВРТ, которые были стратифицированы на группы в зависимости от возраста пациенток и проведения ПГС. Пациенты были обследованы в соответствие с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. ПГС проводили методом FISH на 3-е сутки культивирования эмбрионов путем биопсии бластомера или методом микроматричной CGH (aCGH) на 5-е сутки культивирования эмбрионов путем биопсии ТФЭ.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Пациентки позднего репродуктивного возраста (старше 35 лет) относятся к группе риска неэффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий (шансы наступления беременности в 2,2 раза ниже, шансы живорождения – в 2,0 раза ниже по сравнению с пациентками раннего репродуктивного возраста), что связано с меньшим числом полученных эмбрионов. Возраст, выше которого шансы наступления беременности и живорождения в программах ВРТ максимально снижаются (в 2,6 раз), составляет 37 лет.

2. Низкая эффективность программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста может быть связана с высоким риском развития анеуплоидии эмбрионов (в 1,9 раз выше по сравнению с пациентками раннего репродуктивного возраста). Пороговым возрастом, при котором и выше которого вероятность получения эмбрионов с анеуплоидией максимально возрастает (в 2,8 раз), является 40 лет. Структура хромосомной патологии эмбрионов при проведении ПГС на 3-и и 5-е сутки существенно различается, что может быть связано с высокой долей мозаичизма при ПГС на 3-и сутки, а также вероятностью способности эмбриона к самокоррекции

хромосомных нарушений в период с 3-и по 5-е сутки эмбрионального развития.

3. Преимплантационный генетический скрининг у пациенток старше 35 лет увеличивает частоту наступления беременности и живорождения в 2 раза, однако наибольшая эффективность ЭКО с ПГС отмечается в возрастной группе от 36 до 39 лет. Наиболее эффективным методом ПГС для пациенток позднего репродуктивного возраста является аCGH на 5-е сутки культивирования эмбрионов с исследованием трофэктомдермы бластоцисты, которое увеличивает частоту наступления беременности и живорождения в 3,1 раза, а в группе пациенток 36-39 лет является также клинико-экономически выгодной стратегией, что позволяет произвести экономию 70 209,5 рублей для достижения одного дополнительного процента живорождения в программах ВРТ.

### **Личный вклад автора**

Автор участвовал в выборе темы научной работы, разработке цели и задач исследования, в проведении и интерпретации результатов лабораторных, в том числе генетических исследований, в обобщении и статистической обработке полученных данных. Автором лично осуществлялось обследование и ведение супружеских пар на всех этапах лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов (ЭКО/ПЭ).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

## **Апробация результатов**

Основные положения работы были доложены на заседании аprobационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 05 марта 2018 года.

## **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия (заведующий д.м.н., доцент Калинина Е.А.), отделе клинической и молекулярной генетики (заведующий д.б.н., профессор РАН Трофимов Д.Ю.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН Сухих Г.Т.). Материалы и результаты исследования включены в лекции и практические занятия для клинических ординаторов и аспирантов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Результаты исследования изложены в 5 печатных работах, из которых 4 напечатаны в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК: журналах «Акушерство и гинекология» (импакт-фактор 0,860), «Гинекология» (импакт-фактор 0,699).

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа представлена на 112 страницах, иллюстрирована 13 рисунками и 32 таблицами. Библиографический указатель включает 22 работы на русском и 76 - на английском языках.

# ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ У ПАЦИЕНТОК ПОЗДНЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Актуальность проблемы бесплодия у женщин позднего репродуктивного возраста

В настоящее время проблема восстановления fertильности у женщин позднего репродуктивного возраста находится в эпицентре внимания врачей во всем мире [3]. Бесплодие является широко распространенной проблемой, с которой ежегодно сталкивается около 5 миллионов американских пар, из которых 1,3 миллиона находятся в поиске эффективных методов лечения [3]. Бесплодием называют нарушение функции репродуктивной системы, клинически проявляющееся неспособностью супружеской пары добиться беременности в течение как минимум одного года половой жизни, без использования контрацепции [12]. Для женщин с возрастом 35 лет и старше бесплодием называют неспособность забеременеть после 6 месяцев половой жизни, без использования контрацепции [3].

Репродуктивным (фertильным) возрастом женщины называется период, в течение которого она способна к вынашиванию и рождению ребёнка (от 15 до 49 лет), в котором отдельно выделяется поздний репродуктивный возраст (после 35-37 лет) [1]. За последние годы доля первородящих женщин ПРВ значительно возросла. Так, в Канаде доля первородящих женщин в возрасте старше 30 увеличилась с 11% в 1987 г. до 26% в 2005 г., а доля первородящих женщин в возрасте старше 35 лет увеличилась с 4% в 1987 г. до 11% в 2005 г., и, соответственно, уменьшилась доля молодых первородящих женщин. Такая тенденция наблюдается по всему миру [2]. На сегодняшний день средний возраст рождения первого ребенка для женщин на 3,5 года больше, чем три десятилетия назад [3]. Причины имеющегося тренда могут быть связаны с легко доступными способами контрацепции, а также с изменением

социальной роли женщины в современном мире [3]. Кроме того, определенную роль играет низкая осведомленность женщин о медицинских аспектах бесплодия, ассоциированного с возрастом.

Возраст играет важную роль в способности пары к зачатию. Фертильность снижается с возрастом как у женщин, так и у мужчин. Для женщины в возрасте 40 лет шансы наступления беременности не превышают 5%, при этом риск потери беременности на ранних сроках составляет от 34 до 52% [3], [13]. Бесплодие, связанное с возрастом, обусловлено различными причинами. Женщины ПРВ имеют более высокую соматическую и гинекологическую заболеваемость, более высокий риск наличия хромосомных аномалий ооцитов, а, значит, и эмбрионов, тенденцию к снижению овариального резерва, что в целом снижает шансы наступления как спонтанной беременности, так и беременности, полученной в результате ВРТ [3], [14].

## **1.2. Причины снижения фертильности у женщин позднего репродуктивного возраста**

Функциональная активность репродуктивной системы женщины прогрессивно снижается с возрастом, при этом вначале утрачивается способность к зачатию, а затем гормон продуцирующая функция яичников [3]. В основе снижения активности репродуктивной системы лежат различные процессы, в том числе снижение пула фолликулов, нарушения фолликулогенеза, а также усиление апоптоза и атрезии фолликулов [3].

Для оценки фолликулярного пула и качества ооцитов используется термин «овариальный резерв» [3]. Овариальный резерв - это способность яичников адекватно отвечать на овариальную стимуляцию ростом полноценных фолликулов, содержащих полноценные ооциты [15]. К физиологическим факторам, влияющим на овариальный резерв, относят количество примордиальных фолликулов в яичнике девочки на момент

менархе (в норме 270 000 – 470 000 фолликулов) [16] и частоту элиминаций примордиальных фолликулов [3]. Уменьшение фолликулярного пула в яичниках клинически проявляется бесплодием, снижением продолжительности менструального цикла и олигоменореей, и, в итоге, менопаузой [3], [17]. Средний возраст наступления менопаузы составляет от 40 лет до 60 лет в различных популяциях, и основным фактором является генетический компонент [18], [19]. У 1% женщин менопауза наступает до 40 лет, что свидетельствует о преждевременной недостаточности яичников [20].

Принято считать, что способность к деторождению нарушается за 10 лет до менопаузы, и этот период не зависит от возраста наступления менопаузы [3], [21]. Нерегулярные менструации обычно возникают за 6 или 7 лет до менопаузы вне зависимости от момента ее наступления, число примордиальных фолликулов на этот момент составляет около 10 000 [3].

По мере того, как фолликулы вступают в фазу роста, и потом формируют доминантный фолликул или же подвергаются атрезии, происходит постепенное уменьшение фолликулярного пула [3]. В результате уменьшения фолликулярной когорты снижается выброс ингибина В, который продуцируется клетками гранулезы антральных фолликулов в раннюю фолликулярную фазу [3]. Физиологически ингибин В подавляет секрецию фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), поэтому снижение синтеза ингибина В приводит к повышению базального уровня ФСГ [3]. Подъем ФСГ в раннюю фолликулярную фазу может являться одним из ранних признаков старения яичников [22]. Этот начальный этап может никак не проявляться клинически, поскольку сохраняется регулярный менструальный цикл и овуляции [3].

Первыми клиническими признаками старения яичников может быть снижение продолжительности менструального цикла за счет укорочения фолликулярной фазы [3]. Повышение ФСГ в фолликулярную фазу приводит к более быстрому развитию доминантного фолликула и ранней овуляции. На этапе, когда женщина замечает клинические признаки снижения функции

яичников, такие как укорочение цикла и нерегулярные менструации, ее fertильность значительно снижена [2], [3]. Группа ученых из Нидерландов продемонстрировали, что женщины, которые были бесплодными после 35 лет, демонстрировали низкую fertильность и в возрасте до 30 лет [23]. Маркеры овариального резерва могут быть полезны для прогнозирования ранней менопаузы, в первую очередь для женщин из группы риска, имеющих снижение fertильности при отсутствии клинических симптомов снижения овариальной функции [3].

Помимо физиологических факторов, на овариальный резерв могут оказывать влияние различные патологические факторы. К таким факторам относят: перенесенные соматические и гинекологические заболевания, интоксикации, различные оперативные вмешательства, цитотоксическая терапия и радиационное поражение органов малого таза в анамнезе, факторы внешней среды [3], [14].

Женщины ПРВ, как правило, имеют более отягощенный акушерский и гинекологический анамнез, по сравнению с молодыми пациентками, а также большее количество перенесенных соматических заболеваний и операций.

У женщин ПРВ выше распространенность пролиферативных гинекологических заболеваний. Распространенный наружный генитальный эндометриоз может являться непосредственной причиной снижения овариального резерва [3], [24]. Одним из методов определения овариального резерва считается оценка антимюллерова гормона (АМГ), который выделяется клетками преандрального фолликула [23]. Концентрация этого гормона не зависит от стадии цикла, что дает возможность проводить исследование в любой период. Shebl O. et al. (2009) было доказано снижение концентрация АМГ гормона у пациенток ПРВ с эндометриозом [25]. Вместе с уменьшением овариального резерва у женщин ПРВ с эндометриозом параллельно снижается и качество ооцитов [23].

Кроме того, женщины ПРВ чаще имеют в анамнезе оперативные вмешательства на органах малого таза, которые могут оказывать негативное

воздействие на овариальный резерв вследствие нарушения кровоснабжения в органах малого таза [3], [26]. Одной из причин, приводящих к снижению овариального резерва, является резекция яичников по поводу синдрома поликистозных яичников (СПКЯ), эндометриоидных и других кист яичников [27]. Данные вмешательства проводятся достаточно широко, при этом дальнейший репродуктивный потенциал женщины часто не учитывается [27]. Nargund G. et al. (1996) получили данные о том, что степень уменьшения овариального ответа при стимуляции суперовуляции в случае удаления эндометриоидной кисты яичника выше, чем при удалении фолликулярной кисты [28]. Другим фактором, приводящим к снижению овариального резерва, является удаление маточных труб. При этом, в литературе нет данных о том, что данный фактор отрицательно влияет на эффективность программ ЭКО [28].

Известно, что с возрастом увеличивается риск развития онкологических заболеваний, таких как рак матки, рак молочной железы, рак толстой кишки и др. [29]. Лучевая и химиотерапия различных онкологических заболеваний имеет отрицательное воздействие на репродуктивную функцию женщины. При лучевой терапии негативное влияние на яичники зависит от дозы радиации, полученной органами малого таза, от выбранных полей облучения и от возраста пациентки [3], [15], [31]. Было доказано, что доза от 5 до 10,5 Грэй вызывает необратимую менопаузу у 97% женщин старше 40 лет [30]. Действие химиотерапии также влияет на овариальный резерв и зависит от возраста пациентки [3]. При лечении лимфогранулематоза у пациенток старше 35 лет химиотерапия была причиной стойких изменений менструальной функции [31], [33], [34].

Курение также может приводить к уменьшению фолликулярного пула и к ранней менопаудре [3], [21]. Sharara F. et al. (1994) обследовали женщин, которые лечились по поводу бесплодия методом ЭКО. В результате были получены данные о том, что снижение овариального резерва у курящих

женщин происходит в 3 раза чаще, чем у некурящих женщин (12,8% и 4,3% соответственно) [14], [35].

### **1.3. Влияние возраста на качество ооцитов, хромосомные аномалии ооцитов и анеуплоидию эмбрионов**

Несмотря на постоянное развитие методов вспомогательной репродукции, качество ооцитов является одним из основных факторов, лимитирующих вероятность наступления беременности и рождения здорового ребенка, особенно у женщин позднего репродуктивного возраста [3].

Программа ЭКО является наиболее эффективным методом преодоления бесплодия в современном мире. Тем не менее, эффективность ЭКО снижается на 4,7% из расчета на каждый год жизни женщины после 30 лет [7]. Многие исследователи во всем мире продемонстрировали увеличение риска генетической патологии у плодов в данной группе женщин [3]. Цитогенетический анализ полярных тел ооцитов указывает на то, что возраст женщины имеет прямую положительную корреляцию с долей ооцитов с аномальным хромосомным набором [36].

Анеуплоидии являются самым распространенным вариантами хромосомных аномалий у человека и основой генетической причиной потерь беременности и рождения детей с врожденными дефектами, как при естественном зачатии, так и при применении ВРТ [10], [34]. Доля ооцитов с различными видами анеуплоидии прогрессивно увеличивается с возрастом и может достигать 100% у женщин старше 45 лет [35], [38].

Несмотря на то, что беременности с анеуплоидными эмбрионами прерываются на ранних сроках, трисомии 13,18,21 и половых хромосом совместимы с жизнью эмбриона [10]. Беременности анеуплоидными эмбрионами приводят к рождению детей с врожденными аномалиями и

умственной отсталостью, что в большинстве случаев приводит к их ранней смерти [10], [34], [39].

Таким образом, возраст является важнейшим фактором, который влияет успех лечения бесплодия методом ЭКО. Большинство авторов отмечают повышенный риск генетической патологии у плодов и новорожденных у женщин ПРВ [14], [40]. При этом окончательно не была выявлена частота и типы анеуплоидии эмбрионов в данной группе женщин.

Анеуплоидиями называют отклонение от кратного гаплоидному числу хромосом в клетке. Доказано, что анеуплоидии являются первичной причиной врожденных пороков развития как при спонтанной беременности, так и при беременности с использованием ВРТ [36]. При исследовании кариотипа abortусов при самопроизвольных выкидышиах было выявлено, что 70% из них имели хромосомные аномалии [41]. Беременности с анеуплоидными эмбрионами приводят к рождению детей с врожденными аномалиями развития [10]. В недавних исследованиях продемонстрировано, что 43,8/100000 случаев родов происходит с хромосомной патологией [9].

Известно, что анеуплоидии чаще встречаются в ооцитах, чем в сперматозоидах. При этом, в отличие от женщин, с увеличением возраста у мужчин не происходит увеличение частоты анеуплоидий [42]. Анализ женских гамет может быть осуществлен путем прямой оценки состояния хромосом ооцита или, косвенно, при исследовании полярных тел – побочных продуктов мейотического деления. Благодаря различным исследованиям, было показано, что от 15 до 20% ооцитов имеют хромосомные аномалии [43].

Исследование полярных тел (методом CGH) 77 зигот пациенток с привычным выкидышем, средний возраст которых был 39 лет, показало, что доля зигот с анеуплоидиями составляет 65,5% [44]. При этом более высокий уровень анеуплоидий, достигающий 72%, был зарегистрирован у женщин ПРВ, средний возраст которых составил 40 лет [45].

В основе мейоза лежит репликация ДНК в клетке, после которой происходит 2 деления ядра и клетки – первое деление мейоза (мейоз I) и второе деление мейоза (мейоз II), результатом которых становится образование гаплоидных гамет [10], [46]. В профазе первого деления мейоза происходит выстраивание в ряд гомологичных хромосом, образование хиазмы (точки перекреста) и кроссинговер, целью которого является образование новых генных комбинаций. В профазу первого деления происходит дезинтеграция ядрышек, ядренных оболочек клетки и возникновение нитей веретена деления. После этого, в метафазу I происходит выстраивание хромосом у экватора и прикрепление с помощью центромер (точки соединения хромосом) к нитям веретена деления. На следующем этапе происходит сокращение микротрубочек, результатом становится расхождение гомологичных хромосом к противоположным полюсам веретена деления [10]. Таким образом, хромосомы разделяются на два гаплоидных набора [10]. Результатом мейоза I становится расхождение гомологичных хромосом к противоположным полюсам веретена деления. Число хромосом уменьшается вдвое, при этом каждая из хромосом состоит из двух хроматид. Хроматиды не идентичны в результате кроссинговера. На этапе второго деления мейоза, сходное с митотическим делением, происходит образование гаплоидных дочерних клеток [10].

В литературе существует несколько объяснений механизма патологического расхождения хромосом в оогенезе [10]. Во-первых, это может быть связано с ошибками при кроссинговере в течение профазы I мейоза, неправильное расположение хиазм (относительно центромер), а также нарушения в процессе образования веретена деления и потери белков, которые регулируют связь между сестринскими хроматидами. Во-вторых, причина может быть связана с нарушениями, происходящими в анафазе I мейоза, когда одна из хромосом запаздывает и не расходится, как другие хромосомы. Эти запаздывающие хромосомы не попадают в дочерние клетки и разрушаются в цитоплазме клетки [10]. Третьей причиной может быть

гонадный мозаицизм [10]. Мозаицизм может сохраняться на высоком уровне на всех этапах преимплантационного развития. Клиническое значение мозаицизма пока что остается не установленным, однако существует гипотеза, что диплоидные мозаичные эмбрионы с высокой долей диплоидных клеток могут привести к рождению здорового ребенка [47]. Уменьшение количества мозаицизма в стадии бластоцисты может происходить в результате способности эмбрионов компенсировать эти ошибки [48], [49].

Преимплантационное развитие эмбриона начинается после оплодотворения ооцита сперматозоидом (День 0), с образованием двух пронуклеусов (2PN), материнского и отцовского происхождения.

После этого, в течение трёх дней происходят этапы дробления эмбриона с образованием от шести до десяти взаимозаменяемых бластомеров. В течение этого периода возникает эмбриональная активация генома. На четвёртый день образуется морула. На стадии морулы, клетки зародыша начинают дифференцироваться в два различных клеточных клона. На пятый и шестой день, после многочисленных клеточных делений, эмбрион достигает стадии бластоцисты. Особенностью бластоцисты являются полость, заполненная жидкостью (полость бластоцисты), и внутриклеточная масса (эмбриобласт), которая окружена трофобластом (трофэктомидермой). Из эмбриобlasta в будущем будет развиваться эмбрион, а из трофобласта будет формироваться плацента [50]. Имплантация происходит примерно на 6-7 день после оплодотворения [51].

Аномалии числа хромосом на преимплантационной стадии развития эмбриона очень распространены, при этом до 90% эмбрионов с анеуплоидиями, выявленных на стадии дробления, не выживают до конца первого триместра беременности [52]. Эмбриональные анеуплоидии могут быть результатом ошибки мейоза, возникающей в процессе гаметогенеза, и ошибок митоза, возникающих во время первых эмбриональных дроблений, приводящих к мозаицизму. Высокая частота хромосомных аномалий,

происходящих в результате ошибок мейоза и митоза, возникает и в нормально и ненормально развивающихся эмбрионах. При анализе всех клеток на этапе дробления эмбриона, было выявлено, что 25% из них имеют анеуплоидии [53].

Как правило, эмбрионы чаще имеют моносомии, чем трисомии. Существуют также различия в частоте поражения различных хромосом. Так, 22, 16, 21 и 15 хромосомы поражаются чаще всего, а 14, X, Y и 6 - реже всего. Данные результаты были получены Munné S. et al. при использовании метода FISH в исследовании 14 хромосом в более чем 2000 эмбрионах [54].

Анеуплоидии в эмбрионах могут сохраняться до стадии бластоцисты, при этом более 50% бластоцист являются анеуплоидными [55]. Трисомии, так же, как и моносомии (моносомии для X и 21 хромосомы), которые, как известно, встречаются в первом триместре беременности, были обнаружены на стадии бластоцисты. Помимо анеуплодии целых хромосом, возникающих при ошибках мейоза или митоза, структурные аномалии присутствуют на ранних преимплантационных этапах эмбриона. Эти сегментарные различия были обнаружены в различной доле (от 7 до 23%) эмбрионов, исследуемых методом CGH.

Происхождение анеуплоидий, также, как и этап, на котором они возникают, варьируются между хромосомами. Трисомия по 16 хромосоме, которая приводит к спонтанным абортам, может возникнуть только по причине нарушений, возникающих в результате ошибок мейоза первого деления материнского происхождения [56]. Также 95% случаев трисомии 21 хромосомы, приводящей к развитию синдрома Дауна, вызваны ошибками материнского мейоза [57]. Большинство материнских ошибок мейоза происходят в течение мейоза первого деления, в то время как нерасхождения при отцовских ошибках происходят чаще при втором делении мейоза [58]. Более 96% случаев трисомии по 22 хромосоме имеют материнское происхождение в результате ошибок мейоза первого деления [59]. Кроме того, в 67% случаях синдром Патау (трисомия 13) также является

следствием материнских ошибок мейоза первого деления. При этом, синдром Эдвардса (трисомия 18) чаще всего возникает при ошибках материнского мейоза второго деления [60].

#### **1.4. Преимплантационный генетический скрининг**

С целью профилактики рождения детей с врожденными аномалиями и наследственными заболеваниями используется преимплантационный генетический скрининг [10]. ПГС проводится с целью профилактики у потомства врожденных аномалий, не связанных с носительством известных мутаций [3], [14]. Благодаря этому методу возможно производить отбор эуплоидных эмбрионов, что, в свою очередь, приводит к увеличению частоты наступления беременности, уменьшению репродуктивных потерь и снижению риска рождения детей с генетическими нарушениями [10]. Использование ПГС является ключевым этапом при планировании беременности у женщин ПРВ. Именно поэтому оценка эффективности ПГС в исходах программ ВРТ у женщин ПРВ является весьма актуальным направлением. В отличие от преимплантационной генетической диагностики (ПГД), которая показана парам с высоким риском врожденных аномалий у потомства, преимплантационный генетический скрининг показан парам с целью профилактики у потомства врожденных аномалий, не связанных с носительством известных мутаций [14], [10]. ПГС показан парам, у которых возраст матери превышает 37 лет, имеющих привычное невынашивание беременности, отсутствие имплантации при переносе эмбрионов, либо неудовлетворительное качество эмбрионов, имеющих 3 и более неудачных попытки в программах ЭКО и, наконец, парам с бесплодием по мужскому фактору, например, в случае необструктивной или обструктивной азоосперии с нормальным кариотипом [10]. Данная группа пациентов с бесплодием имеет высокую частоту хромосомных аномалий эмбрионов.

### 1.4.1. Методы биопсии при ПГС

Преимплантационная генетическая диагностика и преимплантационный генетический скрининг проводятся после процедуры ЭКО и биопсии ооцита или эмбриона. Благодаря генетическому анализу полярных тел или отдельных бластомеров возможно выявить эмбрионы, имеющие хромосомные аномалии, и, таким образом, переносить в матку только здоровые эмбрионы. Незадействованные эмбрионы хорошего качества могут быть криоконсервированы и перенесены в последующем цикле. Биопсия криоконсервированных эмбрионов никак не влияет на их способность к имплантации и потенциал развития [61]. Не так давно был разработан новый метод криоконсервации, называемый витрификацией, который по сравнению с медленным замораживанием показывает значительно более высокую выживаемость эмбрионов и эффективность криоциклов [62].

Для взятия материала для генетического исследования производят биопсию ооцита или эмбриона. На сегодняшний день существует три типа биопсии, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. К ним относятся: биопсия первого и второго полярных тел ооцитов, одного или нескольких бластомеров эмбриона 3-х суток культивирования, или клеток трофоэктодермы (ТФЭ) эмбриона на стадии бластоцисты [10], [63].

Биопсию первого и второго полярного тел ооцита можно проводить последовательно [64] или одновременно [65]. Полярные тела ооцита, являющиеся побочными продуктами мейоза, не нужны для оплодотворения и дальнейшего развития эмбриона. Впервые биопсия полярных тел была проведена для определения недостаточности альфа-1-антитрипсина у пары, в которой женщина была носителем этого заболевания. Биопсия полярного тела может быть выполнена после разрушения зоны пеллюцида [65]. Биопсию первого и/или второго полярного тел используют для обнаружения анеуплоидии материнского происхождения и анализа ошибок мейоза I и II.

Основным недостатком этого метода является то, что, анализируя ооцит не напрямую, через полярное тело, возможно пропустить хромосомные нарушения отцовского и постзиготного происхождения [66]. Преимуществом данного метода является то, что не происходит инвазии в клеточную массу развивающегося эмбриона, так как изучению подвергаются продукты мейоза [10].

Другим методом является биопсия дробящегося эмбриона: для этого используют 1 или 2 бластомера эмбриона 3 дня культивирования, так как на этой стадии эмбрион состоит из 6-10 клеток, которые считаютсяtotипотентными, и процесс компактизации еще не начался. Через небольшое отверстие, созданное в зоне пеллюцида, производят аспирацию бластомеров. При биопсии одного бластомера на стадии дробления не может быть исключен мозаицизм и, следовательно, не может быть правильно представлен хромосомный статус всего эмбриона. В мозаичном эмбрионе, биопсия диплоидного бластомера, может привести к переносу эмбриона с более высокой долей анеуплоидных клеток [66]. Кроме того, при исследовании одного бластомера нельзя исключить способность эмбрионов к самокоррекции [49].

Крупное проспективное исследование, которое изучало здоровье детей, родившихся после ПГД с биопсией бластомеров, показало, что оно не оказывает каких-либо рисков в отношении осложнений и дальнейшего развития этих детей [67]. В соответствие с ретроспективными данными, забор двух бластомеров вместо одного никак не влияет ни на процесс имплантации, ни на исход беременности. После взятия бластомеров, эмбрионы продолжают культивировать *in vitro* до стадии бластоцисты, а отбор бластоцист для переноса в полость матки осуществляется на основании как морфологической оценки эмбриона, так и результатов генетической диагностики [34], [10]. Кроме того, при исследовании бластомеров возможно провести перенос эмбриона в полость матки в исследуемом цикле.

В исследовании Fragouli E. et al. при сравнении результатов ПГС с помощью биопсии полярного тела и бластроцисты, была показана более высокая частота наступления беременности после биопсии бластроцисты (69,2%), чем после биопсии полярного тела (21,4%) в группе пациентов с повторными неудачами ЭКО [44].

Биопсию клеток ТФЭ на стадии бластроцисты проводят на пятый или шестой день развития эмбриона. Отверстие в зоне пеллюцида эмбриона производят за один или два дня до проведения биопсии. Отверстие выполняется в зоне противоположной стороне, на которой располагается внутриклеточная масса (эмбриобласт). Анализ клеток ТФЭ позволяет повысить частоту наступления беременности за счет снижения мозаичности клеток эмбриона [68]. Кроме того, при биопсии бластроцисты снижается травматизация эмбриона. С другой стороны, при данном типе биопсии требуется сепарация цикла ЭКО: проведение криоконсервации или витрификации исследуемых эмбрионов и в дальнейшем осуществление криопереноса в последующих циклах после получения данных диагностики [10]. Таким образом, при данном методе биопсии происходит увеличение финансовых затрат на проведение ЭКО [10].

#### **1.4.2. Методы преимплантационного генетического скрининга**

В качестве методов исследования для преимплантационного генетического скрининга в настоящее время используют флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) и метод сравнительной геномной гибридизации (CGH) [10]. Каждый из этих методов имеет ряд преимуществ и недостатков.

FISH используется для определения пола эмбриона и для диагностики хромосомной патологии ДНК в интерфазных ядрах, однако недостатком этого метода является возможность исследования ограниченного количества хромосом (максимум 12) [3], [14]. Кроме того, ошибки могут возникнуть при наложении сигнала каждой из хромосом, окрашенной в собственный

флуоресцирующий краситель - флюорохром, при исследовании большого количества хромосом. В основном исследуются хромосомы, которые чаще всего обнаруживаются при спонтанных потерях беременности (13, 15, 18, 21, 22, X и Y). Следовательно, методом FISH нельзя выявить аномалии строения хромосом, которые не подвергались изначальному исследованию.

Альтернативой FISH является метод CGH, благодаря которому можно анализировать одновременно 24 хромосомы [3] [14]. Благодаря данному методу возможно диагностировать не только анеуплоидии, но и микроструктурные аномалии (делеции, дупликации, сбалансированные транслокации) одномоментно во всех хромосомах. Единственным существенным ограничением CGH считается его высокая стоимость.

Существует несколько техник выполнения CGH для выполнения ПГС по различным целям. Метод метафазной CGH (от англ. - metaphase Comparative Genomic Hybridization, mCGH) основан на исследовании количественных результатов двух образцов ДНК исследуемой и контрольной, которые предварительно помечаются каждый своим красителем – флюорохромом. Далее после обработки специальной компьютерной программы, которая оценивает соотношение флуоресцентных сигналов, создается профиль гибридизации.

Микроматричная сравнительная геномная гибридизация (от англ. - array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) является методом, позволяющим произвести точную количественную оценку микроделеций и микродупликаций одновременно во всем геноме [3], [14]. Изначально, данный метод создавался для исследований в области онкологии [69]. При этом aCGH является более автоматизированным и простым методом в сравнении с mCGH, что делает его более удобным в использовании при ПГС. Однако одним из основных недостатков aCGH является то, что с помощью данного метода нельзя обнаружить сбалансированные транслокации и инверсии, а также полногеномные моно- или полиплоидии, такие как 69, XXX [70].

В недавнем рандомизированном исследовании был проанализирован исход беременностей при переносе бластоцитов после отбора эмбрионов методом аCGH и морфологического анализа хромосом различными видами кариотипирования. Результаты показали значительный более высокий процент успешных беременностей у пар, которым проводили аCGH [71].

### **1.5. Преимплантационный генетический скрининг у пациенток позднего репродуктивного возраста**

На настоящий момент данные о влиянии ПГС на эффективность программ ЭКО противоречивы [10]. В работе T. Hardarson et al. (2008) были получены доказательства в пользу отсутствия увеличения частоты наступления беременности у женщин ПРВ при проведении ПГС [72]. Схожие данные получили Mersereau J. et al. (2008), которые проанализировали клинико-экономическую эффективность ПГС среди женщин 38-40 и >40 лет, подвергшимся процедуре ЭКО с ПГС и без ПГС [73]. Противоположные результаты приводят Hsiao-Ling Lee H. et al. (2014), которые сравнивали влияние ПГС на вероятность имплантации, вынашивания и процент живорождения у пациенток 40-43 лет [74]. Согласно полученным данным, частота живорождения на каждый перенесенный эмбрион после криоконсервации с использованием ПГС (45,5%) был значительно выше, чем у группы пациенток, которым проводили перенос после криоконсервации без ПГС (19,0%) и проводили ЭКО в естественном цикле без ПГС (15,8 %).

Многочисленные исследования указывают на то, что проведение ПГС для выявления анеуплоидии оказывает благоприятное влияние на исходы ЭКО у женщин позднего репродуктивного возраста [75]. В недавнем рандомизированном контролльном исследовании, Yang Z. et al. было показано, что скрининг 24 хромосом на анеуплоидии для отбора эмбрионов для переноса, значительно улучшает результаты, избегая переноса анеуплоидных эмбрионов [71]. В свою очередь, это увеличивает шансы

имплантации и уменьшает риск потери беременности вследствие хромосомных аномалий эмбрионов. Возможность выбора эуплоидного эмбриона, который имеет более высокий имплантационный потенциал, позволяет ограничить количество переносимых эмбрионов за один цикл, тем самым уменьшая вероятность развития многоплодной беременности.

В литературе активно обсуждается связь между возрастом матери и шансами имплантации после проведения ПГС. Ряд авторов в своих исследованиях показали, что вероятность имплантации эуплоидных эмбрионов после ПГС не зависит от возраста матери [76]. В ретроспективном исследовании Cobo AC. et al. (2010) были проанализированы исходы беременности у женщин 38-44 лет, проходивших программу ЭКО с использованием ПГС и без ПГС [77]. Среди пациенток в возрасте 38 и 39 лет без применения ПГС был отмечен более высокий процент наступления беременности в сравнении с этой же возрастной группой с ПГС. При этом у пациенток 41-44 лет в группе с ПГС наблюдался больший процент наступления беременности, чем среди тех, кому ПГС не проводился. Результаты данного исследования показали, что несмотря на то, что ПГС не приносит пользы пациенткам в возрасте меньше 40 лет, шансы наступления беременности возрастают более чем в два раза у пациенток старше 40 лет. Данное исследование подчеркивает необходимость дальнейшего изучения целесообразности применения ПГС у женщин ПРВ.

Полученные различия в эффективности ПГС у женщин разных возрастных подгрупп можно объяснить несколькими факторами. С одной стороны, при биопсии бластомера на 3-й день культивирования и исследовании методом FISH 9-12 хромосом может быть недооценено общее количество нормальных эмбрионов. Полиморфизмы, кросс гибридизация, расщепления сигналов могут быть выявлены при исследовании методом FISH в ядрах хорошего качества, что может привести за собой ошибочный диагноз в ядрах не очень хорошего качества. В исследовании Colls P. et al. было проанализировано более 30 000 эмбрионов [78]. Однако у 7,5%

исследуемых клеток, взятых от данных эмбрионов, не удалось выявить точный диагноз для одной или более из 9 анализируемых хромосом (X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21 и 22), что не позволило отнести эмбрионы к нормальным. По причине отсутствия точного диагноза данные эмбрионы рассматриваются, как неинформативные. С одной стороны, данные эмбрионы могут быть хорошего качества, но с другой, их перенос несет риск неудачного исхода. В другом исследовании Magli M. et al. (2010) было описано, что процент анеуплоидий для 1 и 4 хромосом (обычно не включаемых в панель исследования методом FISH) был сравним с исследуемыми 15, 16, 21 и 22 хромосомами, что могло быть причиной неудачи ЭКО [79]. Есть вероятность того, что процент нетестируемых (методом FISH) хромосом может быть выше в подгруппе пациенток 38-40 лет. Дальнейшие исследования с использованием метода aCGH позволят получить ценную информацию по этой гипотезе.

Женщины ПРВ не только имеют больший процент анеуплоидных эмбрионов, но и меньшее число самих эмбрионов, как прямое следствие «бедного» овариального ответа, а также снижение качества ооцитов. Согласно данным различных исследователей, пациентки с большим числом полученных ооцитов и эмбрионов будут иметь больше пользы от использования ПГС, в связи с увеличением возможности получения эуплоидных эмбрионов и, следовательно, увеличения шансов достижения клинической беременности [80], [81]. Кроме того, в ретроспективном исследовании было показано, что необходимо минимум 6-8 ооцитов для получения одного эуплоидного эмбриона для переноса среди группы пациенток позднего репродуктивного возраста. И даже несмотря на наличие эуплоидного эмбриона потенциал для имплантации ооцита у пациентки 37-43 лет существенно ниже в сравнении с пациентками других возрастных групп. По данным литературы, каждый эуплоидный эмбрион, без отклонений в морфологии, от пациентки позднего репродуктивного возраста после скрининга имеет шансы имплантации 11%. При этом вероятность

имплантации у пациенток возраста старше 43 лет еще меньше [81]. К другим преимуществам ПГС относятся уменьшение частоты ранних репродуктивных потерь и снижения риска рождения детей с врожденной патологией [10].

Таким образом, возраст является одним из основных факторов, влияющих на эффективность лечения бесплодия, в том числе с применением методов ВРТ [3]. Женщины ПРВ, с одной стороны, более социально благополучны, имеют хорошее образование и состоявшуюся карьеру, но с другой стороны, существует медицинский фактор, который указывает на то, что такие женщины предрасположены к рождению детей с различными заболеваниями [3]. Применение ПГС поможет увеличить частоту наступления беременности у данной группы пациенток, а также снизить риск рождения детей с генетическими нарушениями. Оценка клинико-экономической эффективности ПГС важна для выбора тактики ведения пациенток ПРВ в программах ВРТ [3].

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор - академик РАН Г.Т. Сухих). Набор пациентов осуществлялся в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия (заведующий - д.м.н., доцент Е.А. Калинина). Лабораторные исследования проводились в отделе клинической и молекулярной генетики (заведующий - д.б.н., профессор РАН Д.Ю. Трофимов).

Включенные в исследование 323 супружеские пары подписали добровольное информированное согласие. Все включенные в исследование супружеские пары были обследованы согласно приказу Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению" [78]. Показаниями для проведения ПГС у пациенток РРВ было наличие неудачных попыток ЭКО и потерю беременности в анамнезе.

### 2.1. Дизайн исследования

Для решения поставленных задач было проведено ретроспективное (по архивным материалам) и проспективное (на основании анализа собственных данных) когортное исследование (Рисунок 1).

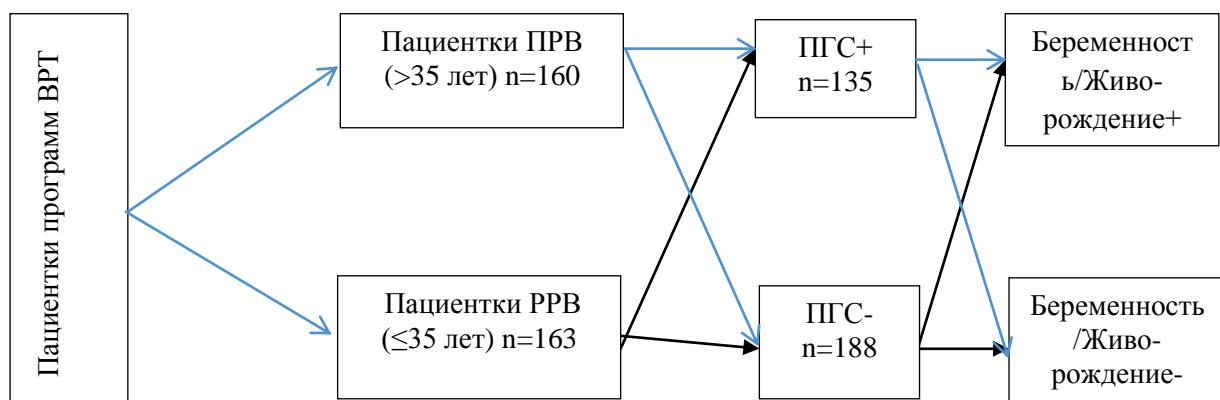


Рисунок 1. Дизайн исследования.

**Для решения задачи №1** (анализа исходов программ ВРТ с учетом параметров оогенеза, раннего эмбриогенеза и клинико-лабораторных данных) были выделены две группы пациентов:

- группа 1 - пациентки ПРВ ( $>35$  лет);
- группа 2 - пациентки РРВ ( $\leq 35$  лет).

Критерием включения в исследование для данной задачи было отсутствие ПГС в данном протоколе ЭКО.

В качестве основного предиктора негативных исходов ЭКО (отсутствие беременности и живорождения) рассматривался возраст. В качестве других воздействующих факторов (конфаундеров) учитывались: индекс массы тела (ИМТ) пациенток, наличие у пациенток вредных привычек, гинекологическая и соматическая заболеваемость, гравидарность и паритет, гормональные характеристики (уровни лютеинизирующего гормона (ЛГ), ФСГ, АМГ, тиреотропного гормона (ТТГ), тестостерона (T), эстрадиола (E2) и свободного тироксина ( $T4_{cb}$ )), суммарная доза экзогенных гонадотропинов (ГТ), длительность стимуляции функции яичников, вид триггера овуляции.

Доли полученных зигот и бластоцист, в том числе бластоцист отличного качества, биохимической и клинической беременности, потерь беременности и живорождений рассчитывались на один проведенный цикл ЭКО/ИКСИ.

Была проведена оценка следующих параметров сперматогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза:

- частота патоспермии: астенозооспермии (АЗС) и тератозооспермии (ТЗС);
- число полученных ооцитов;
- наличие ооцитов с дисморфизмами: цитоплазматическими (цД) и экстрацитоплазматическими (эцД);
- число зигот и бластоцист отличного качества по Гарднеру.

Оценивались следующие исходы программ ВРТ:

- частота биохимической беременности (на основании определения сывороточной концентрации  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина ( $\beta$ -ХГ) при уровне  $\beta$ -ХГ более 20 МЕ/л);
- частота клинической беременности (на основании повышения уровня  $\beta$ -ХГ и визуализации плодного яйца при ультразвуковом исследовании (УЗИ) через 21 день после ПЭ);
- частота потери беременности до 22 недель гестации;
- частота живорождения.

За первичную конечную точку на данном этапе исследования было взято ОШ<sub>кор</sub> наступления клинической беременности и живорождения в зависимости от возраста пациенток.

**Для решения задачи №2-3** (определения частоты и типов анеуплоидии эмбрионов) были выделены две основные группы пациентов:

- группа 3 - пациентки ПРВ с ПГС;
- группа 4 – пациентки РРВ с ПГС.

Первичной конечной точкой №1 для данной части исследования было ОШ<sub>кор</sub> и структура анеуплоидии эмбрионов у пациенток ПРВ.

Первичной конечной точкой №2 для данной части исследования был пороговый возраст пациенток, при котором вероятность развития анеуплоидии эмбрионов является максимальной.

**Для решения задач №4-5** (оценки эффективности ПГС в исходах программ ВРТ у пациенток ПРВ) были выделены две основные группы пациентов:

- группа 1 - пациентки ПРВ без ПГС;
- группа 3 - пациентки ПРВ с ПГС.

Также анализ был проведен в подгруппах пациентов с различными видами ПГС (FISH на 3-е сутки, аCGH на 5-е сутки).

Первичной конечной точкой для данной части исследования было ОШ<sub>кор</sub> наступления беременности и живорождения у пациенток ПРВ в зависимости от проведения ПГС.

## **2.2. Критерии включения в исследование**

Критерии включения в исследование:

- трубно-перитонеальное бесплодие;
- фертильная/субфертильная сперма супруга;
- нормальный кариотип супружов;
- ИМТ пациенток от 19 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>;
- отсутствие привычного невынашивания беременности ( $\geq 3$  потеря беременности в анамнезе в сроке до 22 недель гестации);
- селективный перенос одного эмбриона;
- отсутствие ПГС для групп 1 и 2;
- проведение интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (от англ. – *intracytoplasmic sperm injection*, ICSI, ИКСИ);
- наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения из исследования:

- наличие у женщин противопоказаний к проведению ВРТ, таких как наружный генитальный эндометриоз III-IV степени, воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), пороки развития половых органов, объемные образования яичников, миома матки больших размеров;
- злокачественные заболевания любой локализации;
- отсутствие эмбрионов для переноса в полость матки;
- ВРТ с донорской яйцеклеткой или суррогатной мамой.

### 2.3. Объем выборки

Для решения задачи 1 объем выборки определялся числом изучаемых воздействующих факторов (предполагалось влияние на исход программ ВРТ 5 предикторов). Принимая во внимание, что максимальное число предикторов, включенных в модель, не должно быть больше, чем число исходов, деленное на значение от 5 до 20, для изучения 5 предикторов необходимо было получить 25 исходов (беременностей) в группе. Учитывая то, что частота наступления беременности в циклах ВРТ достигает 30%, в группу необходимо было включить минимум 80 пациенток, всего 320 пациенток.

Для решения задач 2-3 объем выборки был рассчитан с помощью программы STATISTICA 10 и основывался на литературных данных о частоте наступления беременности у различных групп пациенток программ ВРТ при проведении и отсутствии ПГС [46,75,85]. Для получения корректных результатов (уровень достоверности исследования 90% и уровень альфа 0,05) необходимо было включить от 24 до 49 пациенток в каждую группу, с учетом возможности выбывания до 15% пациенток из исследования - по 56 пациенток в группу, в общей сложности - 224 пациентки.

Таким образом, был сформирован следующий объем выборки в зависимости от разделения на группы:

- группа 1 - пациентки ПРВ без ПГС, n=87;
- группа 2 - пациентки РРВ без ПГС, n=101;
- группа 3 - пациентки ПРВ с ПГС, n=73;
- группа 4 – пациентки РРВ с ПГС, n=62 (Рисунок 1).

## 2.4. Методы исследования

Пациентки прошли амбулаторное обследование перед программой ЭКО, которое включало обязательные методы исследования, специальные методы исследования, а также исследования по медицинским показаниям. Все обследования в рамках проводимого исследования проводились однократно (Таблица 1).

Обязательные исследования для обоих супругов включали [82]:

- определение в крови антител к бледной трепонеме (RW), антител класса M/G к вирусу иммунодефицита человека 1/2 (ВИЧ 1,2), к антигенам вирусного гепатита В и С (HBs-Ag, HCV);
- микроскопическое исследование отделяемого шейки матки и влагалища на микроорганизмы, грибы рода *Candida*, на трихомонаду;
- исследование соскоба из цервикального канала на хламидии, вирус простого герпеса 1/2 и цитомегаловирус методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- определение кариотипа супругов, медико-генетическое консультирование.

Обязательные исследования для женщин включали [82]:

- общеклинический анализ крови;
- биохимический анализ крови;
- гемостазиограмму;
- определение групповой и резус-принадлежности крови;
- общий анализ мочи;
- определение в крови антител класса M/G к вирусу краснухи;
- цитологическое исследование соскоба эндоцервика и экзоцервика;
- УЗИ органов малого таза на 5-8 день менструального цикла;
- флюорографию;
- электрокардиографию;

- заключение терапевта о наличии или отсутствии противопоказаний для проведения программы ЭКО/переноса эмбриона (ПЭ);
- УЗИ молочных желез (до 35 лет) или маммографию (после 35 лет);
- УЗИ щитовидной железы;
- гормоны крови (на 2-3 день менструального цикла): ЛГ, ФСГ, Е2, ТТГ, Т<sub>4</sub><sub>св</sub>, дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭАС), пролактин, кортизол, Т, АМГ.

Обязательным исследованием для мужчины был анализ эякулята.

Исследования по показаниям включали [82]:

- исследование состояния матки, проходимости маточных труб (гистеросальпингография, гистероскопия и лапароскопия);
- консультации смежных специалистов (эндокринолога, уролога).

Специальные методы исследования включали:

- морфологическая оценка ооцитов на наличие дисморфизмов во время проведения процедуры ИКСИ с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TE300 (общее увеличение 400x) [10];
- ПГС методом FISH или аCGH.

Таблица 1  
Схема обследования пациентов

	Перед ЭКО	ТВП	3-5-е сутки после ТВП	2 нед. после ПЭ	3 нед. после ПЭ	5 нед. после ПЭ
Обязательное обследование	X					
Морфологическая оценка ооцитов		X				
ПГС			X			
β-ХГ				X		
УЗИ					X	X

#### **2.4.1. Общеклинические методы обследования**

Все пациентки были проанкетированы. Оценивался возраст, уровень образования, профессиональные вредности, наличие «вредных привычек». Затем измерялись антропометрические данные: рост, масса тела, ИМТ, а также артериальное давление и пульс. Оценивалось состояние подкожной жировой клетчатки, проводилась пальпация молочных желез, щитовидной железы и брюшной полости. Собирались данные акушерско-гинекологического анамнеза: менструальной функции, паритета, числа самопроизвольных выкидышей, осложнений предыдущих беременностей и родов, перенесенных гинекологических заболеваний и оперативных вмешательств на органах малого таза. Учитывалось наличие инфекционных и соматических заболеваний, оперативных вмешательств в анамнезе.

Уточнялись данные о продолжительности бесплодия, о проведенных мероприятиях по диагностике и лечению бесплодия. Отмечалось наличие программ ВРТ в анамнезе, а также их особенности: протокол стимуляции суперовуляции, эмбриологические данные и исходы программ ВРТ.

Далее проводился гинекологический осмотр *per speculum*: наружных половых органов, влагалища и шейки матки, и *per vaginum*: размеры, плотность, подвижность и болезненность тела матки, состояние придатков матки.

#### **2.4.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза**

Первое УЗИ органов малого таза выполнялось на 5-8 день менструального цикла, предшествующего циклу стимуляции овуляции. в отделении функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (заведующий - профессор А.И. Гус). Проводилась оценка размера матки, наличия миомы матки или признаковadenомиоза, толщины и структуры эндометрия, объема яичников, числа

антральных фолликулов, наличие объемных образований и жидкости в малом тазу.

Следующее УЗИ проводилось в цикле стимуляции суперовуляции: на 2-3 день цикла, на 6-й день стимуляции овуляции, далее ежедневно до введения триггера овуляции. Проводилась оценка роста фолликулов и толщины эндометрия с целью коррекции дозы вводимых гонадотропинов, а также определения даты введения антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) и триггера овуляции.

Далее УЗИ выполнялось на 21-й день после переноса эмбриона при наличии положительного теста  $\beta$ -ХГ с целью определения плодного яйца в полости матки, и через 5-6 недель после переноса эмбриона с целью определения сердцебиения эмбриона [10].

#### **2.4.3. Гормональное исследование**

Исследование уровня гормонов в сыворотке крови проводилось во время ранней фолликулярной фазы (на 2-3 день цикла) в цикле, предшествующем стимуляции овуляции, радио иммунным методом в научно-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (заведующий - к.м.н. Т.Ю. Иванец). Использовались тест-системы «Hoffmann La Roche, Ltd.» Швейцария).

#### **2.4.4. Исследование эякулята**

Эякулят собирался в стерильный пластмассовый контейнер путем мастурбации. Изучались следующие параметры: объем, цвет, время разжижения и вязкость спермы, pH, концентрация и подвижность сперматозоидов, наличие их морфологических изменений, число лейкоцитов, число и типы незрелых клеток сперматогенеза (Таблица 2).

Таблица 2

## Нормативные показатели спермограммы (ВОЗ, 2010)

Показатель	Нормы, единицы измерения
Общий объем эякулята	$\geq 1,5$ мл
pH	$\geq 7,2$
Концентрация сперматозоидов	$\geq 15$ млн/мл
Общее число сперматозоидов	$\geq 39$ млн
Время разжижения	$< 60$ мин.
Подвижность сперматозоидов	$\geq 40\%$
Сперматозоиды с прогрессивным движением	$\geq 32\%$
Число нормальных сперматозоидов	$\geq 4\%$
Число живых сперматозоидов	$\geq 58\%$
Концентрация лейкоцитов	$< 1$ млн/мл
Антиспермальные антитела (ACAT)	$< 50\%$

Патологии эякулята оценивалась следующим образом:

- аспермия - нет эякулята;
- азооспермия - нет сперматозоидов;
- олигозооспермия – общее число сперматозоидов  $< 15$  млн/мл;
- АЗС – число подвижных сперматозоидов  $< 40\%$  и/или число сперматозоидов с прогрессивным движением  $< 32\%$ ;
- ТЗС - число сперматозоидов с нарушением морфологии  $> 96\%$ .

#### 2.4.5. Стимуляция функции яичников и трансвагинальная пункция фолликулов

Для стимуляции функции яичников использовался протокол с ант-ГнРГ. Стимуляция проводилась препаратами рекомбинантного ФСГ (рФСГ), комбинированного препарата рФСГ и ЛГ, или человеческого менопаузального гонадотропина (чМГ) со 2-3 дня менструального цикла. Доза препарата зависела от возраста пациентки и овариального резерва (уровня АМГ и числа антравальных фолликулов по данным УЗИ). После проведения УЗИ производилась коррекция дозы препаратов ГТ.

Для предупреждения паразитарных пиков ЛГ начинали вводить препараты ант-ГнРГ со дня достижения лидирующим фолликулом диаметра 14 мм ежедневно до дня введения триггера овуляции.

Триггер овуляции вводился в день достижения лидирующим фолликулом диаметра 17 мм: ХГ в дозе 10 000 МЕ, или агонист ГнРГ (а-ГнРГ) в дозе 0,2 мг при риске развития СГЯ (в случае получения >15 доминантных фолликулов в обоих яичниках в день назначения триггера овуляции).

Трансвагинальная пункция (ТВП) яичников осуществлялась под внутривенным обезболиванием с помощью одноразовых функциональных игл под ультразвуковым контролем. Фолликулярная жидкость с ооцитами помещалась в стерильные подогретые пробирки, содержащие 0,5 мл гепарина (2500 ЕД/мл).

#### **2.4.6. Морфологическая оценка ооцитов и оплодотворение**

Асперированная фолликулярная жидкость осматривалась эмбриологом с помощью стереомикроскопа. Определялось число полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК). Затем ооциты отмывались от фолликулярной жидкости и крови, и помещались в стерильные планшеты с культуральной средой для инкубации в течение 2-3 часов [10].

Затем производилось удаление клеток кумулюса из препарата. Вначале ОКК помещались на 20 секунд в раствор гиалуронидазы, затем отмывались от фермента в буферной среде и оставлялись на 30 минут в исходной культуральной среде [10]. Оставшиеся клетки кумулюса удалялись механическим путем. После энзимной и механической обработки ооцитов оценивалась степень зрелости клеток [10]:

- если в цитоплазме ооцита было ядро, но отсутствовало полярное тельце, ооцит был в профазе первого деления мейоза, т.е. на стадии зародышевого пузырька (от англ. - germinal vesicle, GV);

- если в цитоплазме ооцита не было ни ядра, ни полярного тельца, ооцит был в метафазе первого деления мейоза (МI);
- если в цитоплазме ооцита было и ядро, и полярное тельце, ооцит был на стадии второго деления мейоза (МII).

На данном этапе проводилась морфологическая оценка ооцитов и выявление цД и эцД. К цД относились: центральная гранулярность, вакуолизация, наличие агрегатов гладкого эндоплазматического ретикулума, рефрактерных телец, и цитоплазмы темного цвета. К эцД относились: и наличие гранулярности в перивителлиновом пространстве, аномалии первого полярного тельца, деформация или утолщение зоны пеллюцида. Все зрелые ооциты были оплодотворены методом ИКСИ.

После оплодотворения ооциты переносились в культуральную среду Cook (Австралия). Нормальным считалось оплодотворение, если через 16-18 часов после ИКСИ в цитоплазме визуализировались два симметричных по размеру пронуклеуса. При визуализации 1-го или 3-х и более пронуклеусов оплодотворение считалось ненормальным. При отсутствии пронуклеусов ооцит считался неоплодотворившимся.

#### **2.4.7. Морфологическая оценка эмбрионов**

Морфологическая оценка эмбрионов проводилась через 120-122 часа (на 5-е сутки) культивирования. Учитывались морфологические характеристики эмбрионов по классификации Гарднера (степень зрелости бластоцисты, качество внутриклеточной массы (ВКМ) и качество ТФЭ [79].

Зрелость бластоцисты классифицировалась по следующим степеням:

1. полость бластоцисты - менее 1/2 объема эмбриона;
2. полость бластоцисты - более 1/2 объема эмбриона;
3. полость бластоцисты занимает весь объем эмбриона;
4. начинается истончение блестящей оболочки;
5. ТФЭ начинает проникать через блестящую оболочку;

6. бластоциста покидает блестящую оболочку.

ВКМ классифицировалась следующим образом:

- A. плотная упаковка большого числа клеток легко визуализируемой ВКМ;
- B. свободная упаковка среднего числа клеток легко визуализируемой ВКМ;
- C. незначительное число клеток ВКМ.

ТФЭ классифицировался следующим образом:

- A. большое число клеток формирует единый эпителиальный слой;
- B. небольшое число клеток формирует неплотный эпителиальный слой;
- C. незначительное число клеток ТФЭ.

К эмбрионам отличного качества относились бластоцисты 4-5 класса с ВКМ категории А и качеством ТФЭ категории А.

#### **2.4.8. Преимплантационный генетический скрининг**

Преимплантационный генетический скрининг методом FISH состоял из биопсии бластомера, фиксации исследуемых клеток, и их молекулярно-цитогенетической диагностики.

Биопсия бластомера проводилась на 3-й день культивирования эмбрионов (через 72 часа после ТВП) при условии наличия в эмбрионе как минимум шести бластомеров. Биопсия проводилась микроманипулятором Narishiga (Япония). Для рассечения zona pellucida использовалась лазерная пушка Fertilase (Германия). Для аспирации бластомера использовалась микропипетка Cook (Австралия).

Подготовка ядра и гибридизации *in situ* проводилась по протоколу производителя [80]. Выделение ядра из бластомера проводилось с применением 10 мкл гипотонического раствора (1 мл 1% Твина 20, 0,1 мл 0,01 % раствора соляной кислоты и 8,9 мл дистиллированной воды) [84]. Фиксация ядер бластомеров проводилась метанол-уксусным раствором (3:1) при комнатной температуре. Далее гибридизация *in situ* проводилась следующим образом [63]:

- дегидратация препаратов с ядрами в серии спиртов 70°, 80°, 96° по 2 минуты в каждом;
- экспозиция препарата в раствор пепсина в течение 3 минут при температуре 37°C;
- помещение препарата в раствор 2 x SSC на 4 минуты при температуре 37°C;
- повторная фиксация ядер бластомеров в метанол-уксусном растворе (3:1) в течение 10 минут;
- помещение стекла с ядрами в раствор 2 x SSC на 4 минуты при температуре 37°C;
- дегидратация в серии спиртов 70°, 80°, 96° по 2 минуты в каждом;
- лиофилизация препаратов на воздухе;
- добавление ДНК зондов для 5 хромосом к высушенным образцам (ДНК-зонды фирмы Abbot к 13 (SpectrumRed), 18 (SpectrumAqua), 21 (SpectrumGreen), X (SpectrumBlue), Y (SpectrumGold) хромосомам);
- помещение препарата на термоплату на 10 минут при температуре 75°C;
- помещение предметного стекла с препаратом во влажную камеру на ночь и инкубирование при температуре 42°C;
- пост гибридизационное отмывание препарата в 0,4 x SSC (pH 7,0-7,5) в течение 1 минуты при температуре 73°C и последующая отмывка в растворе 2 x SSC/ 0,1% NP-40 в течение 30 секунд при комнатной температуре;
- нанесение на препарат противо выцветающего реагента Antifade.

Далее проводился микроскопический анализ под увеличением 100 x10 с помощью флуоресцентного микроскопа Axioplan 2 Zeiss с набором фильтров (Orange, Green, Aqua, Blue, Gold).

Преимплантационный генетический скрининг методом aCGH заключался в биопсии трофэктодермы, фиксации исследуемых клеток и их молекулярно-цитогенетической диагностике.

Биопсия ТФЭ проводилась на 5-й день культивирования эмбрионов *in vitro* (через 120 часов после ТВП). Биопсия осуществлялась с помощью микроманипулятора Narishiga (Япония). Для рассечения *zona pellucida* использовалась лазерная пушка Fertilase (Германия). Для аспирации клеток ТФЭ использовались микропипетки Cook (Австралия) [81].

Процедура ПГС методом CGH проводилась с использованием оборудования Agilent (США). Амплификация ДНК бластомеров проводилась с помощью набора PicoPlex SingleCell WGA Kit (Rubicon Genomics, США) [88]. Качество и количество полученной в ходе амплификации ДНК оценивалось с помощью 1,2% агарозного электрофореза [88]. Мечение ампликонов проводилось с помощью набора SurePrint G3 8x60K (Agilent, США). Проводилась гибридизация в течение 16 часов, затем - отмыка и сканирование на сканере биологических чипов SureScan Microarray Scanner [88]. Интерпретация полученных результатов проводилась с использованием программного продукта Agilent CytoGenomics. Agilent CytoGenomics 2.5.8.1.

Все эуплоидные эмбрионы подвергались криоконсервации на 5-е сутки культивирования. ПЭ осуществлялся в криоциклах.

#### **2.4.9. Подготовка эндометрия в крио цикле**

Подготовка эндометрия для переноса крио консервированных эмбрионов проводилась с использованием циклической гормональной терапии (эстрадиола валерат в дозе 8 мг/сутки с 4-5 дня менструального цикла, микронизированный прогестерон 400-600 мг/сутки с 15-16 дня менструального цикла) [10]. УЗИ эндометрия осуществлялось на 9-10 день менструального цикла для коррекции дозы эстрогенов и на 15-16 день цикла для назначения гестагенов.

ПЭ осуществлялся на 20-21 день цикла, размораживание эмбрионов осуществлялось согласно принятым в клинической практике протоколам.

## **2.4.10.      Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода**

Перенос эмбрионов проводился с помощью мягкого катетера Wallace (Германия) или Cook (Австралия). Производился перенос одного эмбриона. Ведение посттрансферного периода осуществлялось согласно принятым в клинической практике протоколам.

Через 14 дней после ПЭ определялся уровень  $\beta$ -ХГ в сыворотке крови. Тест считался положительным, если уровень  $\beta$ -ХГ был  $>20$  МЕ/л. Через 21 день после ПЭ проводилось УЗИ, и при визуализации плодного яйца регистрировалась клиническая беременность.

## **2.5. Статистическая обработка полученных данных**

Статистическая обработка данных выполнялась с использованием программ «Statistica V10» (США), SPSS Statistics 22 (США) и TreeAge Pro Inc (США).

Категориальные данные оценивались с помощью рисков и теста  $\chi^2$ . Мерой ассоциации для сравнения бинарных данных было отношение шансов (ОШ) с доверительным интервалом 95% (95% ДИ). Для контроля конфаундеров рассчитывалось скорректированное ОШ ( $\text{ОШ}_{\text{кор}}$ ) и применялся метод логистической регрессии с расчетом площади под кривой (от англ. – Area Under the Curve, AUC).

Количественные данные после определения вида распределения (нормальное или ненормальное) были представлены в виде средних значений со стандартным отклонением с применением параметрической статистики (t-тест), или медиан с интерквартильным размахом с применением методов непараметрической статистики (тест Манна-Уитни).

Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического корреляционного критерия Спирмена.

Для анализа затраты-эффективность была построена модель принятия решений для определения минимальной стоимости одного живорождения на одного пациента, проходящего лечение методом ЭКО/ПГС.

Различия между статистическими величинами считались статистически значимыми при уровне достоверности  $p < 0,05$ .

## Глава 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОК, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

### 3.1. Клинико-анамнестические данные пациенток

Для решения поставленных задач в исследование были включены 160 пациенток ПРВ (>35 лет) и 163 пациентки РРВ ( $\leq 35$  лет):

- группа 1 - пациентки ПРВ без ПГС, n=87;
- группа 2 - пациентки РРВ без ПГС, n=101;
- группа 3 - пациентки ПРВ с ПГС, n=73;
- группа 4 – пациентки РРВ с ПГС, n=62.

Данные о возрасте, антропометрических данных и наличии вредных привычек у пациенток представлены в таблице 3.

Таблица 3  
Возраст и антропометрические данные пациенток

Показатели	Группа 1 ПРВ ПГС- n=87	Группа 2 РРВ ПГС- n=101	Группа 3 ПРВ ПГС+ n=73	Группа 4 РРВ ПГС+ n=62	p1- p2- p3-
Возраст, лет*	39,9±2,9	30,2±2,9	39,8±3,4	30,5±3,4	<0,0001 <0,0001 0,9535
Рост, см*	165,8±5,8	166,7±5,8	166,6±5,4	166,6±5,0	0,3287 0,9925 0,4315
Масса тела, кг*	64,3±8,6	59,7±6,1	65,3±9,1	60,4±8,6	<0,0001 <b>0,0021</b> 0,4846
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> *	23,3±2,9	21,5±1,7	23,5±3,1	21,8±2,9	<0,0001 <b>0,0011</b> 0,7370
Курение**	9 (10,3%)	3 (2,3%)	5 (6,8%)	3 (4,8%)	<b>0,0391</b> 0,6219 0,4357

\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

\*\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

p1 – сравнение групп 1 и 2; p2 – сравнение групп 3 и 4; p3 – сравнение групп 1 и 3

По сравнению с группами 2 и 4 (РРВ) пациентки групп 1 и 3 (ПРВ) были старше и имели больший ИМТ. Также в группе 1 было в 5 раз больше курящих пациенток по сравнению с группой 2.

Данные о менструальной функции (длина менструального цикла и менструации, возраст менархе) и сексуальной функции (возраст начала половой жизни, прием комбинированных оральных контрацептивов (КОК)) представлены в таблице 4. Менструальная функция не отличалась у пациенток всех групп. При оценке сексуальной функции было отмечено, что по сравнению с группой 1 пациентки группы 2 раньше начинали половую жизнь и в 3,2 раза чаще применяли КОК в анамнезе.

Таблица 4  
Особенности менструальной и сексуальной функции у пациенток

Показатели	Группа 1 ПРВ ПГС- n=87	Группа 2 РРВ ПГС- n=101	Группа 3 ПРВ ПГС+ n=73	Группа 4 РРВ ПГС+ n=62	p1- p2- p3-
Возраст менархе, лет*	13,3±1,0	13,1±1,2	13,1±1,2	12,9±1,2	0,2031 0,6350 0,1464
Длительность менструации, дней*	4,7±1,0	5,0±0,9	4,8±1,1	4,9±1,1	0,0601 0,7411 0,6151
Длина цикла, дней*	28,0±2,1	28,6±2,2	28,5±2,3	28,5±2,3	0,0690 0,9545 0,1832
Возраст начала половой жизни, лет*	20,5±4,6	18,3±2,1	19,6±2,9	19,2±2,5	<0,0001 0,3548 0,1243
Прием КОК**	4 (4,6%)	15 (14,8%)	3 (4,1%)	3 (4,8%)	0,0200 0,8376 0,8804

\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

\*\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

p1 – сравнение групп 1 и 2; p2 – сравнение групп 3 и 4; p3 – сравнение групп 1 и 3

Данные о гинекологической заболеваемости представлены в таблице 5.

Таблица 5

## Структура гинекологической заболеваемости пациенток

Показатели	Группа 1 ПРВ ПГС- n=87	Группа 2 PPB ПГС- n=101	Группа 3 ПРВ ПГС+ n=73	Группа 4 PPB ПГС+ n=62	p1- p2- p3-
ЗППП*	26 (29,9%)	36 (35,6%)	32 (43,8%)	21 (33,8%)	0,4023 0,2373 0,0674
ВЗОМТ*	61 (70,1%)	64 (63,4%)	43 (58,9%)	27 (43,5%)	0,3283 0,0751 0,1386
ЦИН*	4 (4,6%)	2 (1,9%)	1 (1,4%)	0	0,3086 0,3549 0,2424
Эндометриоз*	28 (32,2%)	29 (28,7%)	19 (26,0%)	12 (19,3%)	0,6056 0,3583 0,3944
Миома матки*	39 (44,8%)	12 (11,9%)	14 (19,2%)	8 (12,9%)	<0,0001 0,3252 0,0005
СПКЯ*	1 (1,1%)	7 (6,9%)	2 (2,7%)	3 (4,8%)	0,0502 0,5198 0,4601
Полипы эндометрия*	2 (2,3%)	3 (2,9%)	5 (6,8%)	3 (4,8%)	0,7754 0,6219 0,1610
Резекция яичников*	16 (18,4%)	25 (24,7%)	9 (12,3%)	8 (12,9%)	0,2922 0,9201 0,2928
Тубэктомия*	17 (19,5%)	24 (23,7%)	12 (16,4%)	4 (6,4%)	0,4845 0,0736 0,6119
Сальпингоовариолизис*	53 (60,9%)	55 (54,5%)	32 (43,8%)	21 (33,8%)	0,3714 0,2373 0,0610
Длительность бесплодия, лет**	7,3±4,9	4,8±2,8	4,1±2,9	2,9±1,8	<0,0001 0,0071 <0,0001

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

\*\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

p1 – сравнение групп 1 и 2; p2 – сравнение групп 3 и 4; p3 – сравнение групп 1 и 3

ВЗОМТ, заболевания, передающиеся половым путем (ЗППП), патология шейки матки в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН), а также полипы эндометрия были пролечены перед вступлением пациенток в цикл ЭКО. Было выявлено, что пациентки группы 1 чаще, чем пациентки группы 2 и группы 3 имели миому матки. Также большая продолжительность бесплодия отмечалась у пациенток ПРВ, особенно у пациенток группы 1.

Данные акушерского анамнеза представлены в таблице 6. У пациенток позднего репродуктивного возраста было большее число беременностей в анамнезе, особенно у пациенток группы 3, за счет большего числа самопроизвольных выкидышей.

Таблица 6  
Акушерский анамнез пациенток

Показатели	Группа 1 ПРВ ПГС- n=87	Группа 2 ПРВ ПГС- n=101	Группа 3 ПРВ ПГС+ n=73	Группа 4 ПРВ ПГС+ n=62	p1- p2- p3-
Число беременностей	1 (0-2)	0 (0-1)	3 (2-5)	2 (1-3)	<b>0,0002</b> <b>&lt;0,0001</b> <b>&lt;0,0001</b>
Число родов	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0,1725 0,0607 0,0643
Число самопроизвольных выкидышей	0 (0-1)	0 (0-0)	2 (1-2)	1 (0-2)	<b>0,0271</b> <b>0,0282</b> <b>&lt;0,0001</b>
Число искусственных абортов	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0,0609 0,0607 0,3452

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни  
p1 – сравнение групп 1 и 2; p2 – сравнение групп 3 и 4; p3 – сравнение групп 1 и 3

Данные об экстрагенитальной патологии пациенток представлены в таблице 7. При анализе соматической заболеваемости не было выявлено разницы между группами пациенток. Заболевания верхних дыхательных путей (ВДП) были представлены хроническим тонзиллитом и фарингитом, заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) - хроническим гастритом и

энтероколитом, урологические заболевания - хроническим циститом и уретритом, аллергические заболевания - атопическим дерматитом и бронхиальной астмой, эндокринные заболевания – аутоиммунным гипотиреозом. Все соматические заболевания на момент вступления пациенток в протокол ЭКО были в состоянии стойкой ремиссии или компенсации.

Таблица 7

## Структура соматических заболеваний у пациенток

Показатели	Группа 1 ПРВ ПГС- n=87	Группа 2 PPB ПГС- n=101	Группа 3 ПРВ ПГС+ n=73	Группа 4 PPB ПГС+ n=62	p1- p2- p3-
Заболевания ВДП	7 (8,0%)	6 (5,9%)	4 (5,5%)	2 (3,2%)	0,5704 0,5266 0,5227
Заболевания ЖКТ	15 (17,2%)	9 (8,9%)	11 (15,1%)	8 (12,9%)	0,0878 0,7184 0,7105
Урологические заболевания	4 (4,6%)	7 (6,9%)	7 (9,6%)	4 (6,4%)	0,4967 0,5066 0,2139
Аллергические заболевания	10 (11,5%)	20 (19,8%)	12 (16,4%)	9 (14,5%)	0,1209 0,7587 0,3657
Эндокринные заболевания	9 (10,3%)	7 (6,9%)	6 (8,2%)	7 (11,3%)	0,4028 0,5466 0,6459

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест  
 p1 – сравнение групп 1 и 2; p2 – сравнение групп 3 и 4; p3 – сравнение групп 1 и 3

### 3.2. Лабораторные данные пациенток

При оценке данных обязательных видов обследования не было выявлено отклонений от нормы у всех исследуемых пациенток. Результаты этих исследований не отличались в группах сравнения.

Данные исследования уровня гормонов представлены в таблице 8. У пациенток ПРВ отмечался более низкий уровень АМГ и более высокий уровень ФСГ.

Таблица 8

## Уровень гормонов

Показатели	Группа 1 ПРВ ПГС- n=87	Группа 2 ПРВ ПГС- n=101	Группа 3 ПРВ ПГС+ n=73	Группа 4 ПРВ ПГС+ n=62	p1- p2- p3-
ФСГ, мЕд/мл	7,3±2,5	6,1±1,7	6,6±1,9	6,3±1,9	<b>0,0003</b> 0,5246 0,0596
ЛГ, мЕд/мл	4,9±2,0	5,1±1,9	5,5±2,3	5,2±2,9	0,5230 0,5316 0,1067
АМГ, нг/мл	1,56±1,26	3,84±2,83	2,03±1,94	3,67±2,60	<b>&lt;0,0001</b> <b>0,0001</b> 0,1323
Пролактин, мЕд/л	331,0± 150,6	325,1± 140,1	281,8± 134,4	275,4± 122,8	0,7888 0,7892 0,0629
ТТГ, мЕд/л	1,77±0,99	1,57±0,69	1,85±0,94	2,02±0,95	0,1255 0,3463 0,6454
T4 <sub>св</sub> , пмоль/л	14,29±3,31	14,60±2,35	13,93±2,42	13,73±1,81	0,4936 0,6168 0,4787
E2, пмоль/л	180,5± 87,7	181,6± 105,7	172,7± 66,3	174,6± 66,1	0,9474 0,8775 0,5585
T, нмоль/л	1,43±0,85	1,65±0,83	1,59±1,03	1,79±0,93	0,1074 0,2990 0,3533
ДГЭАС, мкмоль/л	4,02±2,25	5,05±2,26	6,57±3,55	6,08±2,64	0,0602 0,5465 0,0601
Кортизол, нмоль/л	402,9± 170,6	391,4± 154,6	389,4± 198,1	358,7± 157,3	0,6813 0,4225 0,7076

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест  
 p1 – сравнение групп 1 и 2; p2 – сравнение групп 3 и 4; p3 – сравнение групп 1 и 3

### 3.3. Особенности протоколов стимуляции суперовуляции

Особенности протоколов стимуляции суперовуляции пациенток представлены в таблице 9.

Таблица 9

## Особенности протоколов стимуляции суперовуляции

Показатели	Группа 1 ПРВ ПГС- n=87	Группа 2 ПРВ ПГС- n=101	Группа 3 ПРВ ПГС+ n=73	Группа 4 ПРВ ПГС+ n=62	p1- p2- p3-
рФСГ*	32 (36,8%)	60 (59,4%)	18 (24,7%)	34 (54,8%)	<b>0,0266</b>
рФСГ/ЛГ или чМГ*	55 (63,2%)	41 (40,6%)	55 (75,3%)	28 (45,2%)	<b>0,0003</b> 0,0621
Длительность стимуляции, дней**	8,8±1,8	9,1±1,7	9,5±1,7	9,1±1,5	0,3790 0,0961 0,0624
Суммарная доза ГТ, МЕ**	2522,4± 1464,5	1928,6± 1146,3	2399,3± 1045,3	1740,7± 662,8	<b>0,0021</b> <b>&lt;0,0001</b> 0,5487
ХГ как триггер овуляции*	83 (95,4%)	79 (78,2%)	61 (83,6%)	39 (62,9%)	<b>0,0006</b>
α-ГнРГ как триггер овуляции*	4 (4,6%)	22 (21,8%)	12 (16,4%)	23 (37,1%)	<b>0,0063</b> 0,0628

\*Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

\*\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

p1 – сравнение групп 1 и 2; p2 – сравнение групп 3 и 4; p3 – сравнение групп 1 и 3

У пациенток ПРВ чаще назначались препараты ГТ, содержащие ЛГ (рФСГ/ЛГ и чМГ), и ХГ в качестве триггера овуляции. Суммарная доза ГТ также была выше в этих группах пациенток.

### 3.4. Характеристика сперматогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза

Данные сперматогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза представлены в таблице 10. Анализ сперматогенеза не выявил значимых отличий между группами пациентов. Параметры оогенеза были лучше у женщин ПРВ: число ОКК и зрелых ооцитов было больше в группах 2 и 4. Число ооцитов с цД и эцД не отличалось между группами. Параметры эмбриогенеза были также лучше у пациенток ПРВ: число зигот было больше в группах 2 и 4, также отмечалось большее число бластоцист и бластоцист отличного качества у пациенток группы 4 по сравнению с группой 3.

Таблица 10

## Характеристика полученных гамет и эмбрионов

Показатели	Группа 1 ПРВ ПГС- n=87	Группа 2 ПРВ ПГС- n=101	Группа 3 ПРВ ПГС+ n=73	Группа 4 ПРВ ПГС+ n=62	p1- p2- p3-
Нормоспермия *	28 (32,2%)	34 (33,7%)	25 (34,2%)	19 (30,6%)	0,8295 0,6564 0,7824
Число ОКК ***	4 (2-7)	7 (4-10)	6 (4-10)	9 (6-13)	<0,0001 <b>0,0011</b> 0,0602
Число зрелых ооцитов***	4 (2-6)	6 (3-8)	5 (4-7)	7 (5-12)	<b>0,0002</b> <b>0,0001</b> 0,0690
Наличие ооцитов с цД*	57 (65,5%)	69 (68,3%)	55 (75,3%)	48 (77,4%)	0,8764 0,7773 0,3452
Наличие ооцитов с эцД*	49 (56,3%)	54 (53,4%)	36 (49,3%)	36 (58,1%)	0,8426 0,3098 0,5483
Число зигот***	3 (1-6)	5 (3-6)	4 (3-6)	6 (4-10)	<b>0,0006</b> <0,0001 0,0695
Уровень фертилизации*	0,80±0,20	0,75±0,21	0,73±0,24	0,78±0,21	0,0675 0,2468 0,0636
Число бластоцист***	1 (1-1)	1 (1-1)	2 (1-3)	5 (3-8)	0,9989 <b>0,0008</b> 0,0600
Число бластоцист отличного качества***	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (0-3)	2 (1-4)	0,9989 <b>0,0010</b> 0,1366

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест;

\*\*\*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни  
p1 – сравнение групп 1 и 2; p2 – сравнение групп 3 и 4; p3 – сравнение групп 1 и 3

Таким образом, при анализе клинико-лабораторных и эмбриологических параметров пациенток было выявлено:

- Пациентки ПРВ группы 1 отличались от пациенток ПРВ группы 2 тем, что были старше, имели больший ИМТ, чаще курили, позже начинали

половую жизнь, реже принимали КОК в анамнезе, чаще болели миомой матки, имели большую продолжительность бесплодия, больше беременностей за счет большего числа самопроизвольных выкидышей, более высокий уровень ФСГ и более низкий уровень АМГ. Для стимуляции суперовуляции им чаще назначали препараты ГТ, содержащие ЛГ (рФСГ/ЛГ или чМГ) в больших дозах, а в качестве триггера овуляции – препараты ХГ. В протоколе ЭКО у них было получено меньше ОКК, зрелых ооцитов и зигот. В качестве возможных конфаундеров, влияющих на исход программ ВРТ, были учтены: возраст, ИМТ, курение, прием КОК, наличие миомы матки, число самопроизвольных выкидышей в анамнезе, уровень АМГ, вид ГТ для стимуляции суперовуляции, доза ГТ, вид триггера овуляции и число зигот. Возраст начала половой жизни не был учтен, так как не был связан с гинекологической заболеваемостью пациенток (число перенесенных ИППП и ВЗОМТ было сопоставимым в обеих группах) и не имел клинического значения, т.е. влияния на исход программ ВРТ. Продолжительность бесплодия не была учтена, так как имела прямую корреляционную связь с возрастом пациенток ( $r=0,2679$ ,  $p=0,0001$ ). Число беременностей не было учтено, так как имело прямую корреляционную связь с числом самопроизвольных выкидышей ( $r=0,4080$ ,  $p=0,0001$ ). Уровень ФСГ не был учтен, так как имел обратную корреляционную связь с уровнем АМГ ( $r=-0,2498$ ,  $p=0,0070$ ). Число ОКК и число зрелых ооцитов не было учтено, так имело прямую корреляционную связь с числом зигот ( $r=0,8906$ ,  $p<0,0001$ ;  $r=0,9345$ ,  $p<0,0001$ ).

- Пациентки ПРВ группы 3 отличались от пациенток РРВ группы 4 тем, что были старше, имели больший ИМТ, имели большую продолжительность бесплодия, больше беременностей за счет большего числа самопроизвольных выкидышей, более низкий уровень АМГ. Для стимуляции суперовуляции им чаще назначали препараты ГТ, содержащие ЛГ (рФСГ/ЛГ или чМГ) в больших дозах, а в качестве триггера овуляции – препараты ХГ. В протоколе ЭКО у них было получено меньше ОКК, зрелых ооцитов, зигот, бластоцист и

бластроцист отличного качества. В качестве возможных конфаундеров, влияющих на исход программ ВРТ, были учтены: возраст, ИМТ, число самопроизвольных выкидышей в анамнезе, уровень АМГ, вид ГТ для стимуляции суперовуляции, доза ГТ, вид триггера овуляции и число бластроцист. Продолжительность бесплодия не была учтена, так как имела прямую корреляционную связь с возрастом пациенток ( $r=0,2579$ ,  $p=0,0370$ ). Число беременностей не было учтено, так как имело прямую корреляционную связь с числом самопроизвольных выкидышей ( $r=0,4396$ ,  $p=0,0001$ ). Число ОКК, число зрелых ооцитов, число зигот не было учтено, так имело прямую корреляционную связь с числом бластроцист ( $r=0,5681$ ,  $p=0,0001$ ;  $r=0,7376$ ,  $p=0,0001$ ;  $r=0,8200$ ,  $p=0,0001$ ). Число бластроцист отличного качества не было учтено, так как имело прямую корреляционную связь с числом бластроцист ( $r=0,7911$ ,  $p=0,0001$ ) и имело меньшее клиническое значение, чем число бластроцист (не всем пациенткам осуществлялся перенос бластроцист отличного качества в случае их отсутствия).

- Пациентки ПРВ группы 1 отличались от пациенток ПРВ группы 3 тем, что им не проводился ПГС, они чаще болели миомой матки, имели большую продолжительность бесплодия, меньше беременностей за счет меньшего числа самопроизвольных выкидышей. В качестве возможных конфаундеров, влияющих на исход программ ВРТ, были учтены: ПГС, наличие миомы матки и число самопроизвольных выкидышей в анамнезе. Продолжительность бесплодия не была учтена, так как имела прямую корреляционную связь с возрастом пациенток ( $r=0,1865$ ,  $p=0,0180$ ). Число беременностей не было учтено, так как имело прямую корреляционную связь с числом самопроизвольных выкидышей ( $r=0,4808$ ,  $p=0,0001$ ).

## Глава 4. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОГРАММ ВРТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЗНАЧЕНИЯ ПГС У ПАЦИЕНТОК ПОЗДНЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

### 4.1. Исходы программ ВРТ

Данные об исходах программ ВРТ представлены в таблице 11 и рисунках 2-4.

В группах без ПГС у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ (группы 1 и 2) отмечалось значимо меньшая частота беременностей и живорождений. Клиническая беременность наступила у 20 из 87 пациенток в группе 1 (22,9%) и у 43 из 101 пациенток в группе 2 (42,6%) ( $p=0,0045$ ). Было диагностировано 2 потери беременности в группе 1 и 5 потерь беременности в группе 2 ( $p=0,3383$ ). Роды произошли у 18 пациенток (20,7%) в группе 1 и у 38 пациенток (37,6%) в группе 2 ( $p=0,0113$ ). Пороговым возрастом, при котором и выше которого шансы наступления беременности и живорождения максимально снижались, был возраст **37 лет**: ОШ беременности = 2,6 (95% ДИ=1,4; 5,1, AUC=61,3%), ОШ живорождения = 2,6 (95% ДИ=1,3; 5,1, AUC=60,8%). При стратификации на несколько групп частота наступления беременности и живорождения была максимальной в группе  $\leq 35$  лет (Таблица 12).

В группах с ПГС у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ (группы 3 и 4) не отмечалось разницы в частоте беременностей и живорождений. Клиническая беременность наступила у 28 из 73 пациенток в группе 3 (38,4%) и у 23 из 62 пациенток в группе 4 (37,1%) ( $p=0,8804$ ). Было диагностировано по 3 потери беременности в каждой группе ( $p=0,8376$ ). Роды произошли у 25 пациенток (34,2%) в группе 3 и у 20 пациенток (32,3%) в группе 4 ( $p=0,8070$ ). При стратификации на группы частота наступления

беременности и живорождения была максимальной в группе от 36 до 39 лет (Таблица 12).

У пациенток ПРВ без ПГС по сравнению с пациентками ПРВ с ПГС (группы 1 и 3) отмечалась значимо меньшая частота беременностей и живорождений. Клиническая беременность наступила у 20 из 87 пациенток в группе 1 (22,9%) и у 28 из 73 пациенток в группе 3 (38,4%) ( $p=0,0346$ ). Роды произошли у 18 пациенток (20,7%) в группе 1 и у 25 пациенток (34,2%) в группе 3 ( $p=0,0440$ ).

Таблица 11  
Исходы программ ВРТ

Показатели	Группа 1 ПРВ ПГС- n=87	Группа 2 ПРВ ПГС- n=101	Группа 3 ПРВ ПГС+ n=73	Группа 4 ПРВ ПГС+ n=62	p1- p2- p3-
Биохимическая беременность	23 (26,4%)	43 (42,6%)	28 (38,4%)	24 (38,7%)	<b>0,0208</b> 0,9664 0,1070
Клиническая беременность	20 (22,9%)	43 (42,6%)	28 (38,4%)	23 (37,1%)	<b>0,0045</b> 0,8804 <b>0,0346</b>
Самопроизволь- ный выкидыш	2 (2,3%)	5 (4,9%)	3 (4,1%)	3 (4,8%)	0,3383 0,8376 0,5120
Живорождение	18 (20,7%)	38 (37,6%)	25 (34,2%)	20 (32,3%)	<b>0,0113</b> 0,8070 <b>0,0440</b>

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

p1 – сравнение групп 1 и 2; p2 – сравнение групп 3 и 4; p3 – сравнение групп 1 и 3

Таблица 12  
Исходы программ ВРТ в различных возрастных группах

Возраст (лет)		$\leq 35$ лет	36-39 лет	$\geq 40$ лет	ОШ (95% ДИ)	p, $\chi^2$
ПГС- (группа 1)	Клиническая беременность	<b>43 из 101</b> <b>(42,6%)</b>	13 из 45 (28,9%)	7 из 42 (16,7%)	1,9 (1,2;2,9)	<b>0,0026</b>
	Живорождение	<b>38 из 101</b> <b>(37,6%)</b>	13 из 45 (28,9%)	5 из 42 (11,9%)	1,9 (1,2;3,0)	<b>0,0032</b>
ПГС+ (группа 3)	Клиническая беременность	23 из 62 (37,1%)	<b>20 из 39</b> <b>(51,3%)</b>	8 из 34 (23,5%)	1,2 (0,8;1,9)	0,3379
	Живорождение	20 из 62 (32,2%)	<b>20 из 39</b> <b>(51,3%)</b>	5 из 34 (14,7%)	1,1 (0,7;1,8)	0,5518

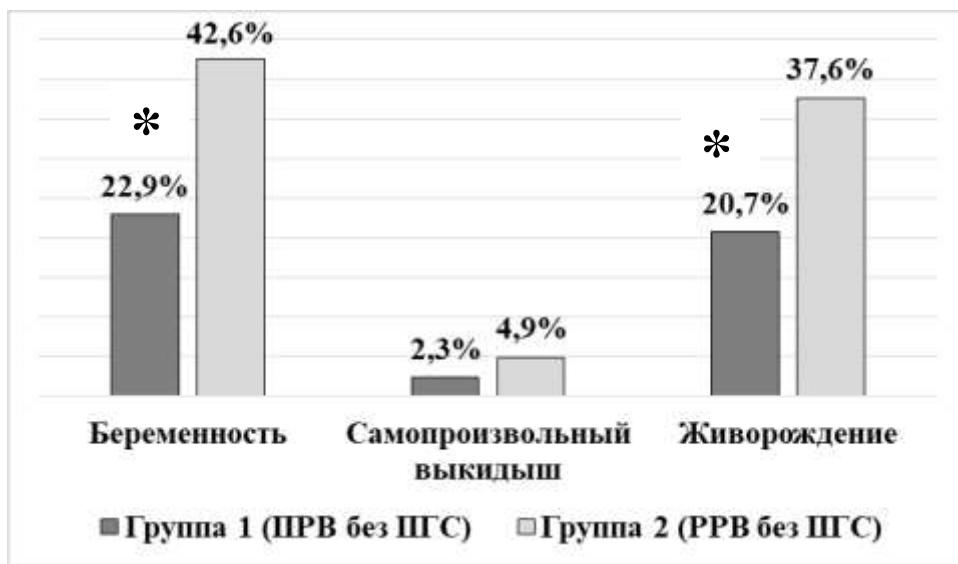


Рисунок 2. Исходы программ ВРТ у пациенток групп 1 и 2, \*p<0,05

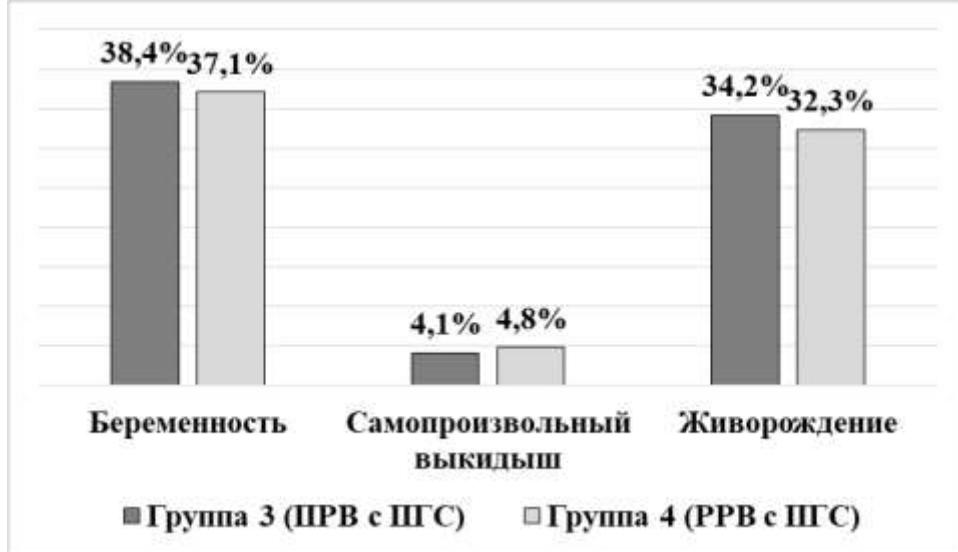


Рисунок 3. Исходы программ ВРТ у пациенток групп 3 и 4, \*p<0,05

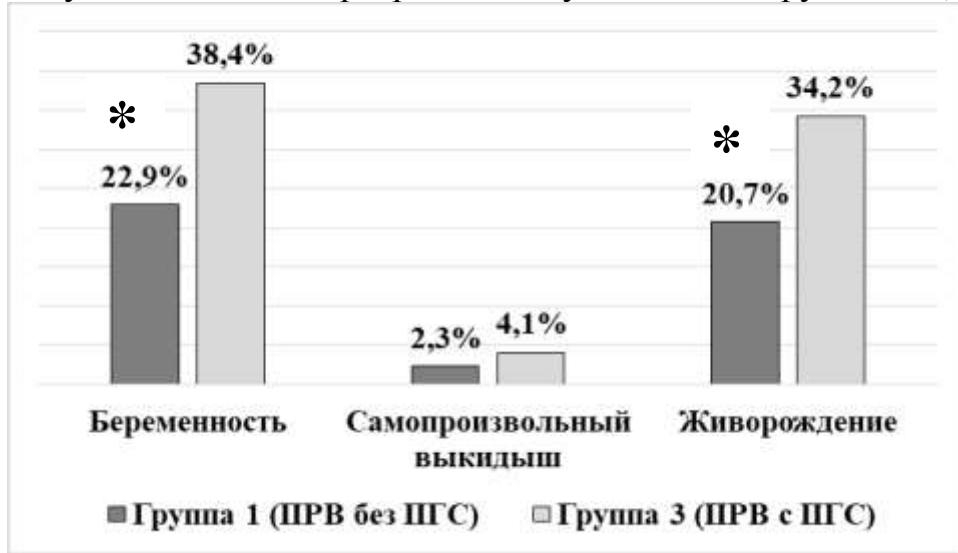


Рисунок 4. Исходы программ ВРТ у пациенток групп 1 и 3, \*p<0,05

## 4.2. Многофакторный анализ эффективности программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста

Был проведен многофакторный анализ оценки шансов наступления беременности и живорождения в программах ВРТ у пациенток групп 1 и 2. Для этого было проанализировано влияние выявленных потенциальных конфаундеров на вероятность наступления беременности и живорождения.

У 188 пациенток (87 пациенток группы 1 и 101 пациентки группы 2) беременность наступила в 63 случаях (группа 1а), не наступила – в 125 случаях (группа 2а), живорождение случилось в 56 случаях (группа 1б), не случилось – в 132 случаях (группа 2б). Данные о влиянии потенциальных конфаундеров на частоту наступления беременности у пациенток групп 1 и 2 представлены в таблице 13.

Таблица 13  
Факторы, влияющие на наступление беременности  
у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1а (беременность+) n=63	Группа 2а (беременность-) n=125	p-
Возраст, лет**	33,4±4,5	35,3±6,1	<b>0,0271</b>
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> **	22,0±2,0	22,5±2,7	0,2649
Курение*	2 (3,2%)	10 (8,0%)	0,2013
Прием КОК*	8 (12,7%)	11 (8,8%)	0,4025
Миома матки*	13 (20,6%)	38 (30,4%)	0,1551
Число самопроизвольных выкидышей***	0 (0-0)	0 (0-0)	0,6202
АМГ, нг/мл**	2,7±2,0	2,9±2,7	0,7267
Препараты рФСГ/ЛГ или чМГ для стимуляции*	26 (41,3%)	60 (48,0%)	0,3812
Суммарная доза ГТ, МЕ**	2114,9±1311,0	2248,0±1347,1	0,5196
ХГ как триггер овуляции*	58 (92,1%)	104 (83,2%)	0,0965
Число зигот***	5 (3-6)	4 (2-6)	<b>0,0143</b>

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест;

\*\*\*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

Данные о влиянии потенциальных конфаундеров на частоту живорождения у пациенток групп 1 и 2 представлены в таблице 14.

Помимо возраста на частоту наступления беременности и живорождения оказывало влияние только число полученных зигот, которое было значимо больше у забеременевших и родивших пациенток.

Грубое ОШ наступления беременности в программе ЭКО у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ, не прошедших ПГС, составило 2,4 (95% ДИ=1,3; 4,7). ОШ<sub>кор</sub> наступления беременности в программе ЭКО у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ, не прошедших ПГС, с учетом числа полученных зигот составило 2,2 (95% ДИ=1,1; 4,3).

Таблица 14  
Факторы, влияющие на живорождение у пациенток групп 1 и 2

Показатели	Группа 1б (живорождение+) n=56	Группа 2б (живорождение-) n=132	p-
Возраст, лет**	33,4±4,4	35,2±6,1	<b>0,0397</b>
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> **	22,1±2,0	22,4±2,7	0,4975
Курение*	2 (3,6%)	10 (7,6%)	0,3043
Прием КОК*	8 (14,3%)	11 (8,3%)	0,2156
Миома матки*	13 (23,2%)	38 (28,8%)	0,4318
Число самопроизвольных выкидышей***	0 (0-0)	0 (0-0)	0,9834
АМГ, нг/мл**	2,8±2,0	2,8±2,7	0,9661
Препараты рФСГ/ЛГ или чМГ для стимуляции*	25 (44,6%)	61 (46,2%)	0,8434
Суммарная доза ГТ, МЕ**	2129,3±1325,4	2234,8±1340,2	0,6208
ХГ как триггер овуляции*	51 (91,1%)	111 (84,1%)	0,2048
Число зигот***	5 (3-6)	4 (2-6)	<b>0,0063</b>

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест;

\*\*\*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

Грубое ОШ живорождения в программе ЭКО у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ, не прошедших ПГС, составило 2,3 (95% ДИ=1,2; 4,5). ОШ<sub>кор</sub> живорождения в программе ЭКО у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ, не прошедших ПГС, с учетом числа полученных зигот составило 2,0 (95% ДИ=1,0; 3,9). В полученной модели

AUC составила 67,5%. Была получена следующая формула вероятности живорождения в программах ВРТ у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ, не прошедших ПГС (Формула 1).

$$P(Ж) = \frac{\text{Exp} [0,88 - 0,69*B/10 + 0,18*\mathcal{E}]}{1+\text{Exp} [0,88 - 0,69*B/10 + 0,18*\mathcal{E}]} * 100\%$$

где Р (Ж) – вероятность живорождения, Exp – экспонента, В – возраст в годах, Э – число полученных эмбрионов

**Формула 1. Вероятность живорождения в программах ВРТ в зависимости от возраста пациенток и числа полученных зигот.**

Например, пациентка в возрасте 40 лет с числом полученных зигот =3 будет иметь вероятность живорождения 20%. Пациентка в возрасте 30 лет с числом полученных зигот = 6 будет иметь вероятность живорождения 47%. А пациентка в возрасте 20 лет с числом полученных зигот = 10 будет иметь вероятность живорождения 85%.

Далее был проведен многофакторный анализ оценки шансов наступления беременности и живорождения в программах ВРТ у пациенток групп 3 и 4. Для этого было проанализировано влияние выявленных потенциальных конфаундеров на вероятность наступления беременности и живорождения.

У 135 пациенток (73 пациентки группы 3 и 62 пациентки группы 4) беременность наступила в 51 случае (группа 3а), не наступила - в 84 случаях (группа 4а), живорождение случилось в 45 случаях (группа 3б), не случилось - в 90 случаях (группа 4б). Данные о влиянии потенциальных конфаундеров на частоту наступления беременности у пациенток групп 3 и 4 представлены в таблице 15.

Таблица 15

Факторы, влияющие на наступление беременности  
у пациенток групп 3 и 4

Показатели	Группа 3а (беременность+) n=51	Группа 4а (беременность-) n=84	p-
Возраст, лет**	34,6±4,8	36,2±4,2	0,1172
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> **	22,9±2,8	22,6±3,4	0,6071
Число самопроизвольных выкидышей***	2 (0-2)	1 (0-2)	0,4323
АМГ, нг/мл**	3,3±3,0	2,4±1,8	<b>0,0480</b>
Препараты рФСГ/ЛГ или чМГ для стимуляции*	34 (66,7%)	49 (58,3%)	0,3347
Суммарная доза ГТ, МЕ**	1932,3±819,6	2196,7±1007,2	0,1159
ХГ как триггер овуляции*	32 (62,7%)	68 (80,9%)	<b>0,0192</b>
Число бластоцист***	5 (3-7)	3 (2-5,5)	<b>0,0092</b>

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест;

\*\*\*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

Данные о влиянии потенциальных конфаундеров на частоту живорождения у пациенток групп 3 и 4 представлены в таблице 16.

Таблица 15

Факторы, влияющие на живорождение у пациенток групп 3 и 4

Показатели	Группа 3б (живорождение+) n=45	Группа 4б (живорождение-) n=90	p-
Возраст, лет**	34,6±5,1	36,1±6,0	0,1712
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> **	22,9±2,9	22,6±3,3	0,6983
Число самопроизвольных выкидышей***	2 (0-2)	1 (0-2)	0,5014
АМГ, нг/мл**	3,5±3,2	2,4±1,8	<b>0,0143</b>
Препараты рФСГ/ЛГ или чМГ для стимуляции*	29 (64,4%)	54 (60,0%)	0,6169
Суммарная доза ГТ, МЕ**	1935,0±856,6	2177,8±982,8	0,1608
ХГ как триггер овуляции*	27 (60,0%)	73 (81,1%)	<b>0,0083</b>
Число бластоцист***	5 (3-8)	3 (2-5)	<b>0,0073</b>

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\*Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест;

\*\*\*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

На частоту наступления беременности и живорождения в группах пациенток с ПГС оказывали влияние уровень АМГ и число полученных бластоцист, которые были значимо больше у забеременевших и родивших пациенток, а также триггер овуляции в виде ХГ, который реже назначался забеременевшим и родившим пациенткам.

Грубое ОШ наступления беременности в программе ЭКО у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ, прошедших ПГС, составило 1,05 (95% ДИ=0,5; 2,1). ОШ<sub>кор</sub> наступления беременности в программе ЭКО у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ, прошедших ПГС, с учетом уровня АМГ и числа полученных бластоцист составило 1,5 (95% ДИ=0,7; 3,7). Триггер овуляции не имел значимости в созданной модели. Таким образом, у пациенток ПРВ, прошедших ПГС, беременность наступала в 1,5 раза реже, но это не было статистически значимо.

Грубое ОШ живорождения в программе ЭКО у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ, прошедших ПГС, составило 1,09 (95% ДИ=0,5; 2,2). ОШ<sub>кор</sub> живорождения в программе ЭКО у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками РРВ, прошедших ПГС, с учетом с учетом уровня АМГ и числа полученных бластоцист составило 1,8 (95% ДИ=0,7; 4,6). Триггер овуляции не имел значимости в созданной модели. Таким образом, у пациенток ПРВ, прошедших ПГС, живорождение наблюдалось в 1,8 раз реже, но это не было статистически значимо.

Далее был проведен многофакторный анализ оценки шансов наступления беременности и живорождения в программах ВРТ у пациенток групп 1 и 3. Для этого было проанализировано влияние выявленных потенциальных конфаундеров на вероятность наступления беременности и живорождения.

У 160 пациенток (87 пациенток группы 1 и 73 пациентки группы 3) беременность наступила в 48 случае (группа 5а), не наступила - в 112 случаях (группа 6а), живорождение случилось в 43 случаях (группа 5б), не случилось - в 117 случаях (группа 6б). Данные о влиянии потенциальных конфаундеров

на частоту наступления беременности у пациенток групп 1 и 3 представлены в таблице 17.

Таблица 17  
Факторы, влияющие на наступление беременности  
у пациенток групп 1 и 3

Показатели	Группа 5а (беременность+) n=48	Группа 6а (беременность-) n=112	p-
ПГС*	28 (58,3%)	45 (40,2%)	<b>0,0346</b>
Миома матки*	14 (29,2%)	39 (34,8%)	0,4861
Число самопроизвольных выкидышей**	1 (0-2)	0 (0-2)	0,0647

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

Данные о влиянии потенциальных конфаундеров на частоту живорождения у пациенток групп 1 и 3 представлены в таблице 18.

Таблица 18  
Факторы, влияющие на живорождение у пациенток групп 1 и 3

Показатели	Группа 5а (живорождение+) n=43	Группа 6а (живорождение-) n=117	p-
ПГС*	25 (58,1%)	48 (41,0%)	<b>0,0540</b>
Миома матки*	14 (32,6%)	39 (33,3%)	0,9264
Число самопроизвольных выкидышей**	1 (0-2)	0 (0-2)	0,0687

\* Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест;

\*\*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

Ни один из потенциальных конфаундеров не оказывал влияния на исход программ ВРТ при сравнении данных групп пациенток. ОШ наступления беременности в программе ЭКО у пациенток ПРВ, прошедших ПГС, по сравнению с пациентками ПРВ, не прошедших ПГС, составило 2,1 (95% ДИ=1,04; 4,2). ОШ живорождения в программе ЭКО у пациенток ПРВ, прошедших ПГС, по сравнению с пациентками ПРВ, не прошедших ПГС, составило 2,0 (95% ДИ=0,98; 4,1).

### **4.3. Частота и структура анеуплоидии эмбрионов**

У 73 пациенток ПРВ (группа 3) было получено 233 эмбриона. 96 эмбрионов были проанализированы методом aCGH на 5-е сутки культивирования с анализом всех хромосом, а 137 эмбрионов были проанализированы методом FISH на 3-е сутки культивирования с анализом 13, 18, 21 и половых хромосом. Из 233 эмбрионов при суммарном анализе 143 (61,4%) были анеуплоидными.

У 62 пациенток РРВ (группа 4) было получено 297 эмбрионов. 130 эмбрионов были проанализированы методом aCGH на 5-е сутки культивирования с анализом всех хромосом, а 167 эмбрионов были проанализированы методом FISH на 3-е сутки культивирования с анализом 13, 18, 21 и половых хромосом. Из 297 эмбрионов при суммарном анализе анеуплоидия была выявлена у 136 эмбрионов (45,8%).

ОШ анеуплоидии эмбрионов в зависимости от возраста пациенток составило 1,9 (95% ДИ=1,3; 2,7).

При суммарном анализе ПГС любым методом (FISH+aCGH) было выявлено, что наиболее частыми типами хромосомной патологии эмбрионов в группе 3 была полисомия, которая наблюдалась в 1,6 раз чаще моносомии. Преобладала полисомия 13,18, 21 и половых хромосом (Таблицы 19, 23). В группе 4, наоборот, распространность полисомии и моносомии различных хромосом была одинаковой. Преобладала как полисомия, так и моносомия 13,18, 21 и половых хромосом, и моносомия 16 хромосомы. Также обращало на себя внимание то, что у пациенток РРВ наблюдалась значительно менее выраженная распространность моносомий и особенно полисомий по другим хромосомам, отличных от 13,18,21 и половых хромосом (Таблицы 20, 23).

Таблица 19

## Анеуплоидии эмбрионов пациенток группы 3 (ПРВ)

<b>13 (n=233)</b>		<b>18 (n=233)</b>		<b>21 (n=233)</b>		<b>X/Y (n=233)</b>		<b>1-12, 14-17, 19, 20, 22 (n=96)</b>	
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Полисомия</b>									
23	9,8	28	12,0	31	13,3	31	13,3	32	33,3
<b>Моносомия и нуллисомия</b>									
10	4,3	14	6,0	11	4,7	10	4,3	29	30,2

Таблица 20

## Анеуплоидии эмбрионов пациенток группы 4 (PPB)

<b>13 (n=297)</b>		<b>18 (n=297)</b>		<b>21 (n=297)</b>		<b>X/Y (n=297)</b>		<b>1-12, 14-17, 19, 20, 22 (n=130)</b>	
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Полисомия</b>									
18	6,0	15	5,0	25	8,4	25	8,4	9	6,9
<b>Моносомия и нуллисомия</b>									
13	4,3	14	4,7	10	3,4	14	4,7	26	20,0

Далее был проведен сравнительный анализ 2-х различных методик: FISH на 3-е сутки и аCGH на 5-е сутки.

При сравнении двух групп по пяти хромосомам (13,18,21,X/Y) методом FISH на 3-е сутки было выявлено, что в структуре анеуплоидий в обеих группах женщин преобладали полисомии по отношению к моносомии (57,6% и 22,5% в группе 3, 39,3% и 21,6% в группе 4). При этом у пациенток ПРВ было значимо больше полисомии по 18 хромосоме (синдром Эдвардса) по сравнению с пациентками PPB. В остальном структура анеуплоидии не отличалась у пациенток ПРВ и PPB (Таблица 21).

При сравнении двух групп по всем хромосомам методом аCGH на 5-е сутки было выявлено, что в структуре анеуплоидий в группе 3 преобладали полисомии по отношению к моносомии (68,6% и 41,7%), а в группе 4 соотношение полисомии и моносомии было одинаковым (19,9% и 29,2%). У пациенток ПРВ значимо чаще отмечалась полисомия по половым и другим хромосомам, отличных от 13,18,21,X/Y, и погранично значимо чаще – полисомия по 13 хромосоме по сравнению с пациентками PPB (Таблица 22).

Таблица 21

Анеуплоидии эмбрионов пациенток групп 3 и 4 при FISH-диагностике

	<b>13</b>		<b>18</b>		<b>21</b>		<b>X/Y</b>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Полисомия</b>								
группа 3, n=137	15	10,9	20	14,6	24	17,5	20	14,6
группа 4, n=167	15	8,9	11	6,6	20	11,9	20	11,9
$\chi^2$ -тест, p-	0,5690		<b>0,0230</b>		0,1920		0,5020	
<b>Моносомия</b>								
группа 3, n=137	8	5,8	8	5,8	5	3,6	10	7,3
группа 4, n=167	9	5,4	8	4,8	7	4,2	12	7,2
$\chi^2$ -тест, p-	0,9030		0,7980		0,8870		0,9120	
<b>Нуллисомия</b>								
группа 3, n=137	-	-	1	0,7	1	0,7	-	-
группа 4, n=167	-	-	3	1,8	-	-	-	-
$\chi^2$ -тест, p-	-		0,6300		0,4510		-	

Таблица 22

Анеуплоидии эмбрионов пациенток групп 3 и 4 при аCGH-диагностике

	<b>13</b>		<b>18</b>		<b>21</b>		<b>X/Y</b>		<b>1-12, 14- 17,19-20, 22</b>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Полисомия</b>										
группа 3, n=96	8	8,3	8	8,3	7	7,3	11	11,4	32	33,3
группа 4, n=130	3	2,3	4	3,1	5	3,8	5	3,8	9	6,9
$\chi^2$ -тест, p-уровень	<b>0,0570</b>		0,1310		0,3690		<b>0,0360</b>		<b>&lt;0,0001</b>	
<b>Моносомия</b>										
группа 3, n=96	2	2,1	4	4,2	5	5,2	-	-	29	30,2
группа 4, n=130	4	3,1	3	2,3	3	2,3	2	1,5	26	20,0
$\chi^2$ -тест, p-уровень	0,8500		0,4620		0,2890		0,5090		0,0860	
<b>Нуллисомия</b>										
группа 3, n=96	-	-	1	1,0	-	-	-	-	-	-
группа 4, n=130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\chi^2$ -тест, p-уровень	-		0,4250		-		-		-	

Таблица 23

## Структура анеуплоидии эмбрионов в группе 3 (ПРВ) и группе 4 (PPB)

Xp	Полисомии группа 3	Полисомии группа 4	Моносомии группа 3	Моносомии группа 4	Нуллисомии группа 3	Нуллисомии группа 4
1	-	1 из 130 (0,7%)	1 из 96 (1%)	1 из 130 (0,7%)	-	-
2	-	-	2 из 96 (2%)	1 из 130 (0,7%)	-	-
3	1 из 96 (1%)	-	1 из 96 (1%)	1 из 130 (0,7%)	-	-
4	3 из 96 (3,1%)	-	3 из 96 (3,1%)	1 из 130 (0,7%)	-	-
5	3 из 96 (3,1%)	-	-	1 из 130 (0,7%)	-	-
6	2 из 96 (2%)	-	1 из 96 (1%)	-	-	-
7	3 из 96 (3,1%)	-	3 из 96 (3,1%)	1 из 130 (0,7%)	-	-
8	1 из 96 (1%)	-	3 из 96 (3,1%)	2 из 130 (1,5%)	-	-
9	2 из 96 (2%)	1 из 130 (0,7%)	2 из 96 (2%)	1 из 130 (0,7%)	-	-
10	1 из 96 (1%)	-	1 из 96 (1%)	2 из 130 (1,5%)	-	-
11	3 из 96 (3,1%)	-	1 из 96 (1%)	-	-	-
12	1 из 96 (1%)	1 из 130 (0,7%)	2 из 96 (2%)	-	-	-
13	<b>23 из 233 (9,8%)</b>	<b>18 из 297 (6%)</b>	<b>10 из 233 (4,3%)</b>	<b>13 из 297 (4,3%)</b>	-	-
14	1 из 96 (1%)	-	-	-	-	-
15	1 из 96 (1%)	1 из 130 (0,7%)	3 из 96 (3,1%)	3 из 130 (2,3%)	-	-
16	2 из 96 (2%)	3 из 130 (2,3%)	3 из 96 (3,1%)	<b>6 из 130 (4,6%)</b>	-	-
17	1 из 96 (1%)	-	-	3 из 130 (2,3%)	-	-
18	<b>28 из 233 (12%)</b>	<b>15 из 297 (5%)</b>	<b>12 из 233 (5,1%)</b>	11 из 297 (3,7%)	2 из 233 (0,8%)	<b>3 из 297 (1%)</b>
19	5 из 96 (5,2%)	1 из 130 (0,7%)	-	-	-	-
20	1 из 96 (1%)	-	1 из 96 (1%)	1 из 130 (0,7%)	-	-
21	<b>31 из 233 (13,3%)</b>	<b>25 из 297 (8,4%)</b>	<b>10 из 233 (4,3%)</b>	10 из 297 (3,4%)	1 из 233 (0,4%)	-
22	1 из 96 (1%)	2 из 130 (1,5%)	2 из 96 (2%)	2 из 130 (1,5%)	-	-
23	-	-	-	-	-	-
X/Y	<b>31 из 233 (13,3%)</b>	<b>25 из 297 (8,4%)</b>	<b>10 из 233 (4,3%)</b>	<b>14 из 297 (4,7%)</b>	-	-

Таким образом, у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками PPB значительно чаще встречалась полисомия по 18 хромосоме при проведении ПГС на 3-е сутки и полисомии по 13, X/Y и другим хромосомам, отличных от 13,18,21,X/Y, при проведении ПГС на 5-е сутки. При проведении ПГС на 5-е сутки отмечалась более низкая доля самых распространенных анеуплоидий (13, 18, 21, X/Y хромосомам) и высокая частота анеуплоидии по другим хромосомам по сравнению с ПГС на 3-е сутки (Рисунки 5, 6).

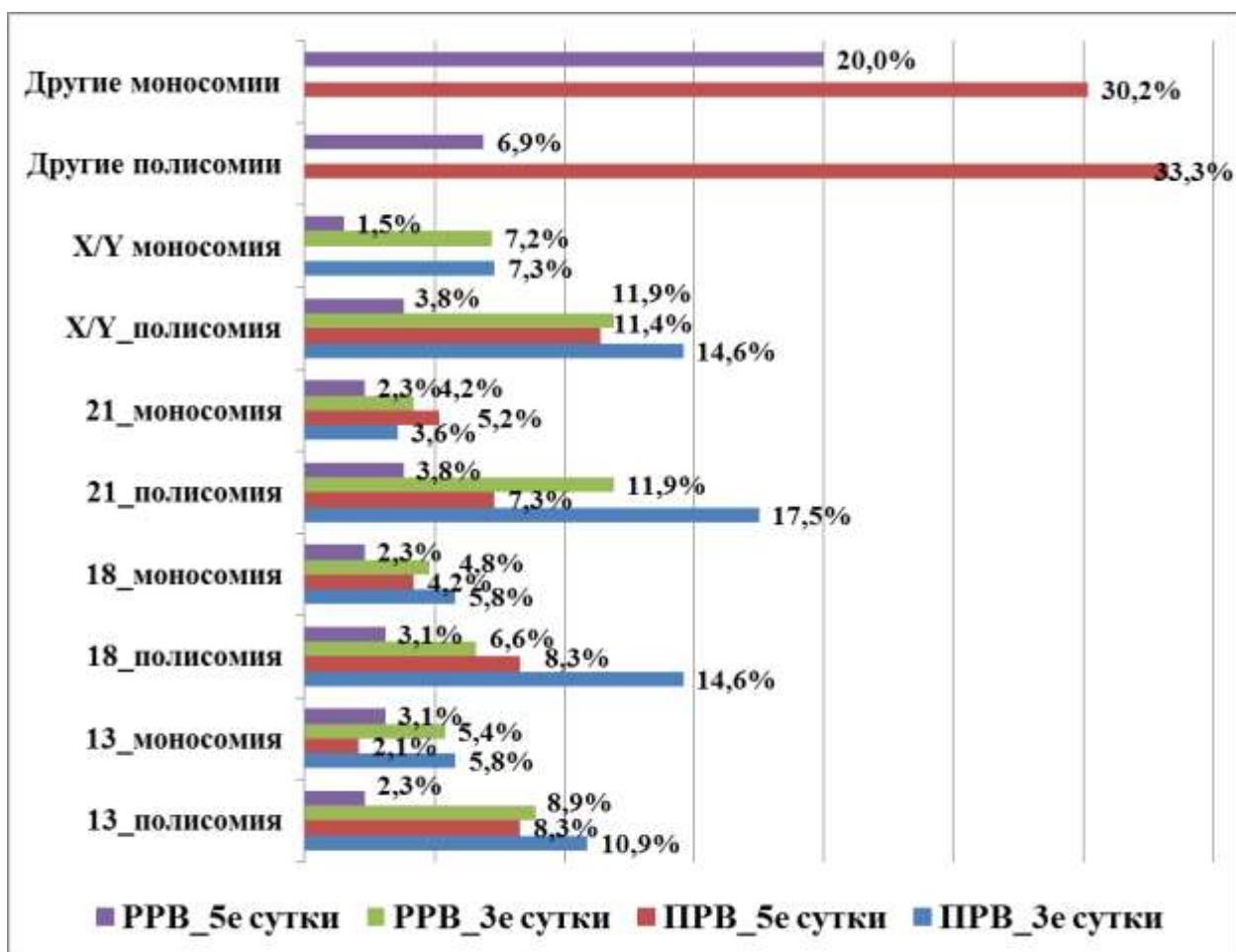


Рисунок 5. Структура анеуплоидии при применении различных методов ПГС у пациенток ПРВ и PPB.

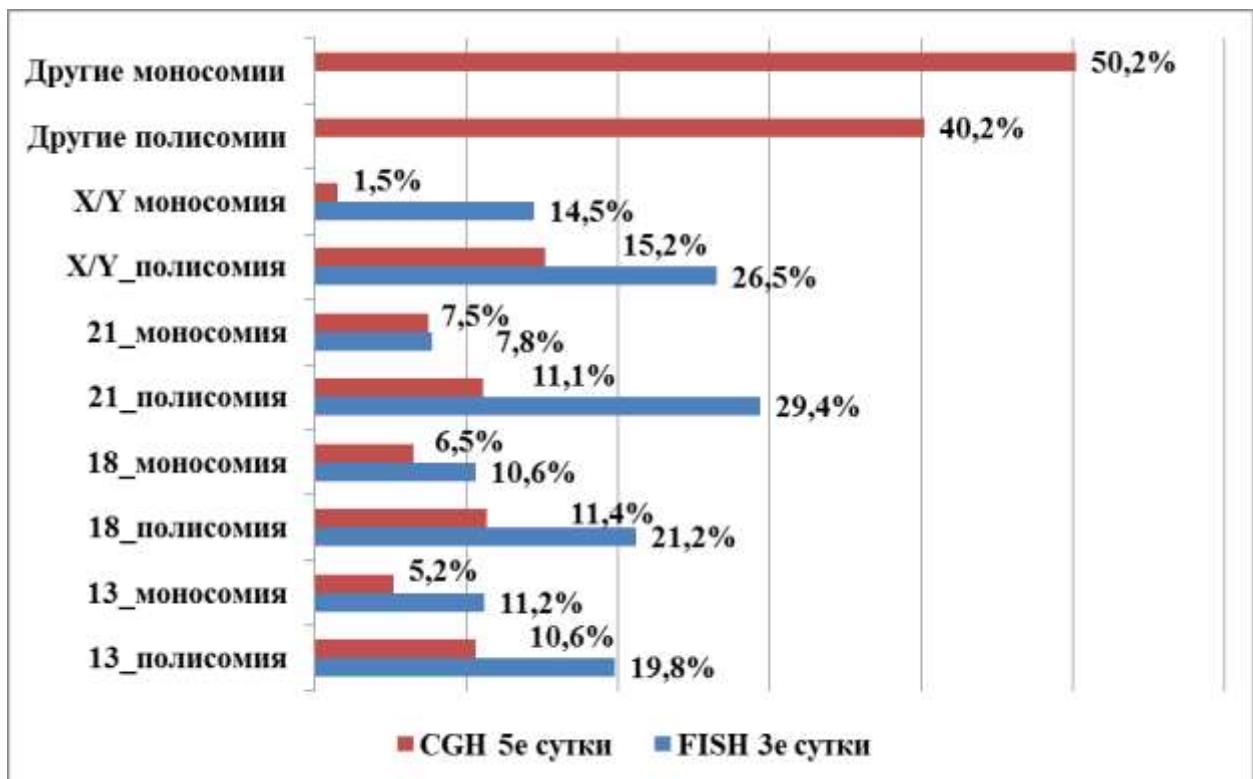


Рисунок 6. Структура анеуплоидии при применении различных методов ПГС.

#### **4.4. Пороговый возраст пациенток по развитию анеуплоидии эмбрионов**

Для определения порогового возраста максимального риска развития анеуплоидии эмбрионов в программах ВРТ было проведено сравнение доли эмбрионов с анеуплоидией среди эмбрионов от пациенток ПРВ, прошедших ПГС (группа 3, n=233), и у пациенток РРВ, прошедших ПГС (группа 4, n=297).

Первым пороговым возрастом пациенток, по достижению и выше которого риск развития анеуплоидии эмбрионов был максимальным, был **40** лет. Риск анеуплоидии эмбрионов у пациенток 40 лет и старше составил 71,9%, ОШ анеуплоидии эмбрионов составило **2,8** (95% ДИ=1,8; 4,5). В полученной модели АУС составила 58,3%, чувствительность (Se) – 29,4%, специфичность (Sp) – 87,2%.

Вторым пороговым возрастом, ниже которого риск развития анеуплоидии эмбрионов был минимальным, был **29 лет**. Риск анеуплоидии эмбрионов у пациенток младше 30 лет составил 42,2%, ОШ анеуплоидии эмбрионов составило **0,8** (95% ДИ=0,5; 1,1). В полученной модели AUC составила 52,3%, Se=16,5%, Sp=74,9%.

При создании модели с двумя порогами отсечки (**29 и 40 лет**) ОШ анеуплоидии эмбрионов составило 1,8 (95% ДИ=1,4;2,4), AUC=60%, Se=54,1%, Sp=81% (Таблица 24, Рисунок 7).

Таблица 24  
Доля анеуплоидных эмбрионов в различных возрастных группах пациенток

Возраст	Анеуплоидные эмбрионы	Эуплоидные эмбрионы	Число эмбрионов
<30 лет	46 (42,2%)	63 (57,8%)	109
30-39 лет	151 (49,2%)	156 (50,8%)	307
≥40 лет	82 (71,9%)	32 (28,1%)	114
Число эмбрионов	279	251	530

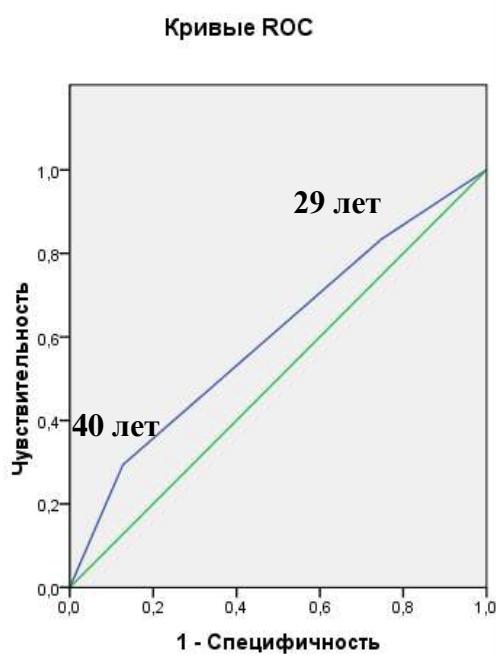


Рисунок 7. ROC-кривая вероятности анеуплоидии эмбрионов у пациенток младше 30 лет и 40 лет и старше.

Таким образом, у пациенток младше 30 лет частота анеуплоидии эмбрионов была меньше, чем эуплоидии, у пациенток в возрасте 30-39 лет частота анеуплоидии и эуплоидии эмбрионов была одинаковой, у пациенток 40 лет и старше частота анеуплоидии эмбрионов была в 2,6 раз выше, чем эуплоидии эмбрионов.

#### **4.5. Пороговый возраст эффективности программ ВРТ с применением ПГС**

Для поиска порогового возраста максимальной эффективности ЭКО с ПГС был проведен стратификационный анализ эффективности ЭКО с ПГС у пациенток различных возрастных групп. Возраст пациенток был в диапазоне от 23 до 47 лет (средний возраст  $(35,1 \pm 5,7)$  лет, медиана с интерквартильным размахом = 35 (30-39) лет). Было выявлено два порога отсечки: возраст **35 лет и 40 лет**, выше и ниже которых шансы наступления беременности и живорождения снижались в 2,6 раз при проведении ПГС (ОШ=2,6; 95% ДИ=1,05;6,4) (Таблица 25, Рисунок 8).

Таблица 25  
Частота наступления беременности у пациенток различных возрастных групп в зависимости от проведения ПГС

Исход ВРТ	Возраст (лет)	Группы 3 и 4 (ЭКО и ПГС)	Группы 1 и 2 (ЭКО без ПГС)	ОШ (95% ДИ)	p, $\chi^2$
Беременность	$\leq 35$ лет (n=163)	23 из 62 (37,1%)	43 из 101 (42,6%)	0,8 (0,4; 1,5)	0,4895
	36-39 лет (n=84)	20 из 39 (51,3%)	13 из 45 (28,9%)	2,6 (1,05; 6,4)	<b>0,0381</b>
	$\geq 40$ лет	8 из 34 (23,5%)	7 из 42 (16,7%)	1,5 (0,5; 4,8)	0,4566
Живорождение	$\leq 35$ лет (n=163)	20 из 62 (32,2%)	38 из 101 (37,6%)	0,8 (0,4; 1,5)	0,4876
	36-39 лет (n=84)	20 из 39 (51,3%)	13 из 45 (28,9%)	2,6 (1,05; 6,4)	<b>0,0381</b>
	$\geq 40$ лет	5 из 34 (14,7%)	5 из 42 (11,9%)	1,3 (0,3; 5,1)	0,7450

Таким образом, оптимальным возрастом для проведения ПГС был возраст от 36 до 39 лет. У пациенток 35 лет и младше эффективность программ ВРТ без применения ПГС была даже несколько выше по сравнению с программами ВРТ с ПГС.

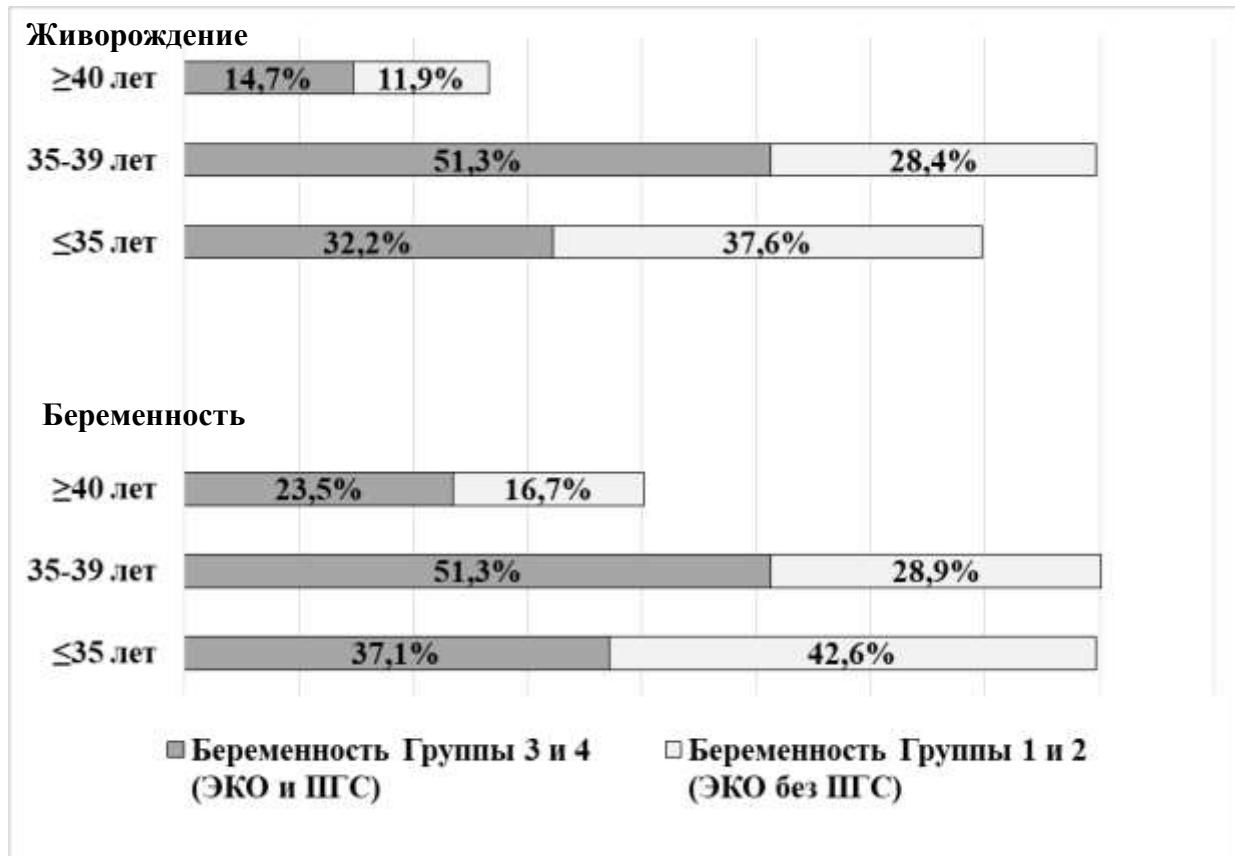


Рисунок 8. Частота наступления беременности у пациенток различных возрастных групп в зависимости от проведения ПГС.

Эффективность программ ВРТ у пациенток старше 40 лет была несколько выше, но не статистически значимо. При этом пороговым возрастом, при котором риск развития анеуплоидии эмбрионов повышался в 2,8 раз, был 40 лет. По-видимому, неэффективность ЭКО с ПГС у пациенток старше 40 лет была связана, во-первых, с малым числом полученных эмбрионов и отменой ПЭ после ПГС по причине выявления анеуплоидии, а, во-вторых, с маточным фактором бесплодия вследствие многочисленных выскабливаний полости матки после неудачных беременностей.

Действительно, у пациенток ПРВ 40 лет и старше отмечалось значимо большее число беременностей за счет искусственных абортов по сравнению с

пациентками 36-39 лет (2 (1-4) и 1 (0-3) для общего числа беременностей ( $p=0,0348$ ), и 2 (0-3) и 1 (0-2) для общего числа самопроизвольных выкидышей и искусственных абортов в анамнезе ( $p=0,0071$ ) для групп старше и младше 40 лет соответственно).

Из 73 пациенток группы 3 (с ПГС) 34 пациентки были в возрасте 40 лет и старше, а 39 пациенток были в возрасте 36-39 лет. У пациенток старше 40 лет отмена ПЭ по причине выявления анеуплоидии всех эмбрионов была зарегистрирована у 16 из 34 пациенток (47,0%), а у пациенток 36-39 лет - лишь у 7 из 39 пациенток (17,9%) ( $p=0,0080$ ).

Нами был проведен анализ по поиску минимального числа зигот и бластоцист в различных возрастных группах пациенток, при котором в результате ПГС был получен хотя бы один эуплоидный эмбрион (Таблица 26).

Таблица 26  
Число зигот, бластоцист и эуплоидных эмбрионов в различных возрастных группах пациенток

Возраст (лет)	число пациенток	число зигот	число бластоцист	число эуплоидных эмбрионов/эмоноидных эмбрионов	число бластоцист	число бластоцист/число эуплоидных эмбрионов	число зигот/число эуплоидных эмбрионов
≥40	34	148	114	32	0,28	3,5 ≈ 4	4,6 ≈ 5
• ≥43	• 15	• 61	• 44	• 8	• 0,18	• 5,5 ≈ 6	• 7,6 ≈ 8
36-39	39	206	119	58	0,48	2,0 ≈ 2	3,6 ≈ 4
≤35	62	458	297	161	0,54	1,8 ≈ 2	2,8 ≈ 3
Всего	135	812	530	251	0,47	2,1	3,2

Было выявлено, что для пациенток в возрасте 35 лет и младше для получения одного эуплоидного эмбриона необходимо получить хотя бы 3 зиготы или 2 бластоцисты, для пациенток в возрасте 36-39 лет - 4 зиготы или 2 бластоцисты, для пациенток в возрасте 40 лет и старше - 5 зигот или 4 бластоцисты. При этом для пациенток 43 лет и старше необходимо было получить уже 8 зигот или 6 бластоцист в связи с высоким уровнем анеуплоидии эмбрионов в этой группе пациенток.

#### 4.6. Эффективность программ ВРТ с ПГС у пациенток позднего репродуктивного возраста в зависимости от овариального резерва

Для оценки влияния овариального резерва на эффективность программ ВРТ с применением ПГС пациентки ПРВ 40 лет и старше ( $n=34$ ) были поделены на группы в зависимости от наличия хотя бы одного эуплоидного эмбриона для переноса: группа А - 18 пациенток с хотя бы одним эуплоидным эмбрионом, группа Б - 16 пациенток с отсутствием эуплоидных эмбрионов для переноса.

Было выявлено, что в группе А по сравнению с группой Б средний возраст пациенток был значимо ниже ( $41,7 \pm 1,7$  лет и  $43,9 \pm 3,4$  лет,  $p=0,0239$ ), уровень АМГ был значимо выше ( $2,4 \pm 1,9$  нг/мл и  $1,2 \pm 0,7$  нг/мл,  $p=0,0191$ ), а число полученных ооцитов не отличалось между группами ( $7,1 \pm 3,7$  и  $8,9 \pm 6,7$ ,  $p=0,3239$ ). Корреляционный анализ также продемонстрировал обратную корреляционную зависимость числа полученных эуплоидных эмбрионов с возрастом пациенток ( $r=-0,3510$ ,  $p=0,0420$ ) и прямую корреляционную зависимость с уровнем АМГ ( $r=0,3767$ ,  $p=0,0317$ ) (Рисунок 9).

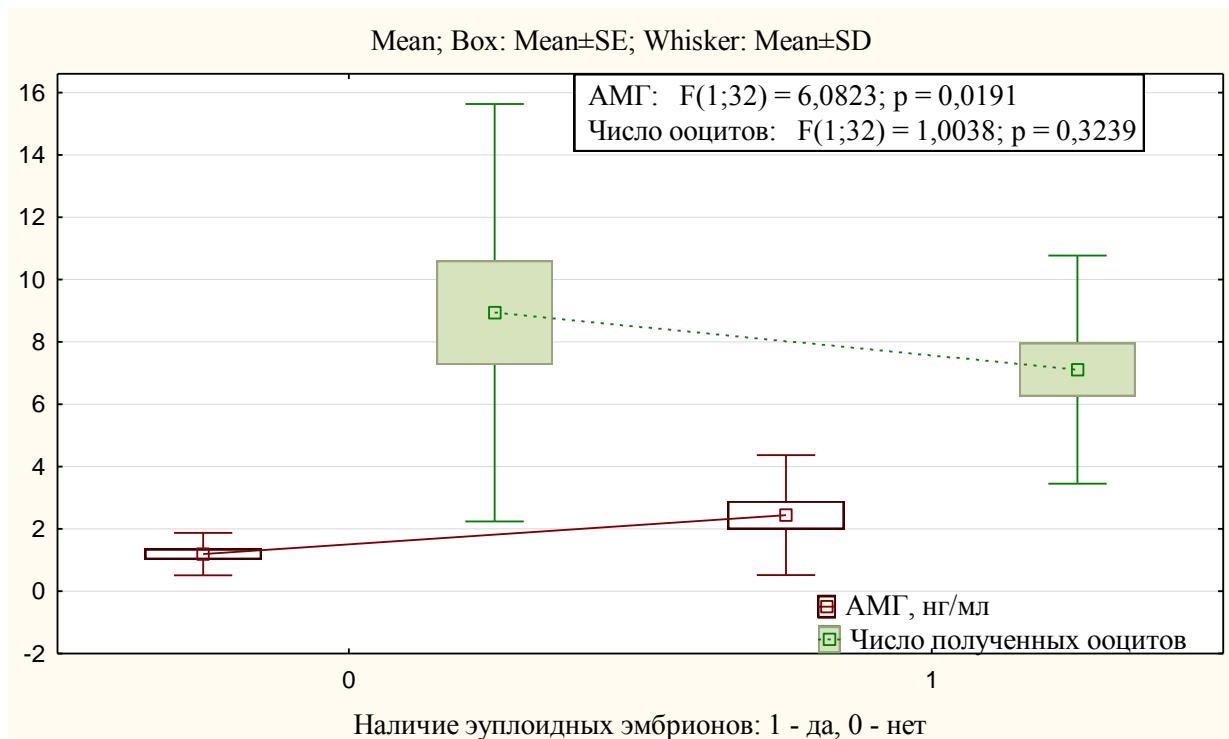


Рисунок 9. Зависимость эуплоидии эмбрионов от овариального резерва пациенток 40 лет и старше.

#### **4.7. Эффективность программ ВРТ при назначении различных видов ПГС у пациенток позднего репродуктивного возраста**

Для оценки эффективности различных методов ПГС у пациенток ПРВ были проанализированы результаты ЭКО у 87 пациенток группы 1 (ПРВ без ПГС) и 73 пациенток группы 3 (ПРВ с ПГС), которые были разделены на две группы в зависимости от метода проведения ПГС: группа 3а - пациентки, которым проводился ПГС методом FISH на 3-е сутки (n=42), группа 3б - пациентки, которым проводился ПГС методом аCGH на 5-е сутки (n=31).

У пациенток, которым проводили ПГС на 5-е сутки, было зарегистрировано значительно больше клинических беременностей (15 случаев, 48,4%) по сравнению с пациентками, которым проводили ПГС на 3-е сутки (13 случаев, 30,9%), или не проводили ПГС (20 случаев, 22,9%) ( $p=0,0030$ ). ОШ наступления беременности при применении ПГС методом аCGH на 5-е сутки в группе пациенток ПРВ составило **3,1 (95% ДИ 1,2; 8,1)**.

Живорождение было зарегистрировано у 14 пациенток (45,2%) группы 3а, 11 пациенток (26,2%) группы 3б и 18 пациенток группы 1 (20,7%) ( $p=0,0310$ ) (Таблица 27, Рисунок 10). ОШ живорождения при применении ПГС методом аCGH на 5-е сутки у пациенток ПРВ составило **3,1 (95% ДИ 1,3; 7,6)**.

Таблица 27  
Исходы программ ВРТ у пациенток ПРВ в зависимости от проведения и вида ПГС

Показатели	Группа 1 ПРВ ПГС- n=87	Группа 3а ПРВ ПГС/FISH n=42	Группа 4 ПРВ ПГС/aCGH n=31	p-
Клиническая беременность	20 (22,9%)	13 (30,9%)	15 (48,4%)	<b>0,0300</b>
Самопроизвольный выкидыш	2 (2,3%)	2 (4,7%)	1 (3,2%)	0,7520
Живорождение	18 (20,7%)	11 (26,2%)	14 (45,2%)	<b>0,0310</b>

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi^2$ -тест

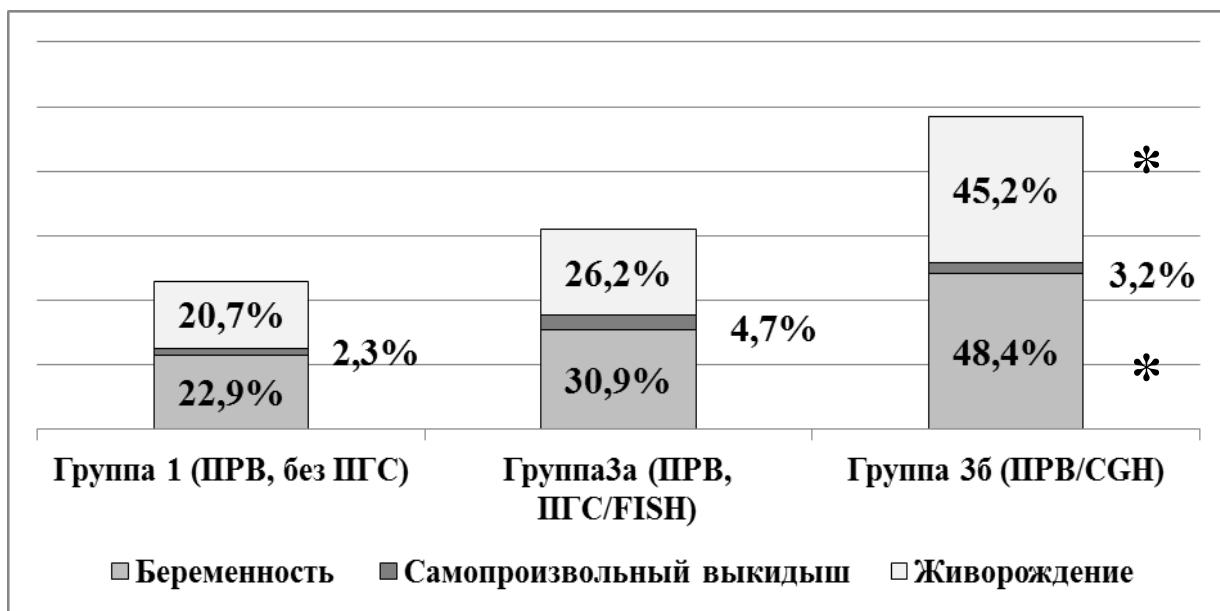


Рисунок 10. Эффективность программ ВРТ у пациенток ПРВ в зависимости от проведения и вида ПГС, \* $p<0,05$

#### **4.7. Клинико-экономическая эффективность ЭКО с ПГС у пациенток позднего репродуктивного возраста**

Для сравнения клинико-экономической эффективности ЭКО без ПГС и ЭКО с ПГС была создана модель принятия решений (TreeAge Pro Inc), в которой было проведено сравнение 2-х стратегий: рутинного ЭКО и ЭКО с ПГС методом аCGH у бесплодных пациенток ПРВ ( $>35$  лет) для определения минимальной стоимости одного живорождения на одного пациента, проходящего вышеуказанное лечение бесплодия.

В модель были включены пары с наличием эмбрионов, пригодных для переноса в полость матки. Допущением модели была возможность применения одного цикла ЭКО со свежими эмбрионами без криоконсервации эмбрионов. Данные по вероятности наступления беременности и самопроизвольного выкидыша в группах ЭКО и ЭКО/ПГС у пациенток ПРВ были получены из результатов собственных наблюдений (Таблица 28).

Критерием включения со стороны супруга явилось наличие фертильной или субфертильной спермы с целью минимизации влияния отцовских анеуплоидий на хромосомный набор эмбриона.

Таблица 28

## Вероятности исходов ЭКО и ЭКО/ПГС у пациенток ПРВ (&gt;35 лет)

Показатели	p**
Беременность после ЭКО	0,229
Беременность после ЭКО/ПГС*	0,384
Самопроизвольный выкидыш после ЭКО	0,023
Самопроизвольный выкидыш после ЭКО/ПГС*	0,041

\*ПГС методом aCGH на 5-е сутки; \*\*р - вероятность

В анализе были учтены только прямые затраты на проведение ЭКО и ЭКО/ПГС, т.е. непосредственная стоимость медицинских услуг. Стоимость ЭКО в свежем цикле рассчитывалось как норматив финансовых затрат на 1 случай применения процедуры за счет средств обязательного медицинского страхования (ОМС) в 2016 году [82]. Стоимость ПГС рассчитывалась по прайсу ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России и включала стоимость биопсии эмбриона, и подготовки бластомеров для ПГС методом CGH для 2-х эмбрионов (среднее число эмбрионов у пациенток в возрасте старше 35 лет; собственные данные) (Таблица 29).

Таблица 29

## Стоимость различных медицинских услуг при оказании медицинской помощи по лечению бесплодия методами ВРТ

Наименование медицинской процедуры	Стоимость процедуры (руб.)
ЭКО	113 109
ПГС методом aCGH	50 000
ЭКО + ПГС методом aCGH	163 109

\*цены в рублях 2016 г.

Вероятность живорождения при применении одного цикла ЭКО у пациенток ПРВ составила 22% по сравнению с 37% для пациенток ПРВ при применении одного цикла ЭКО/ПГС. Средняя стоимость лечения методом

ЭКО составила 113 109 руб. по сравнению со 201 989 руб. при лечении методом ЭКО/ПГС (Рисунок 11).

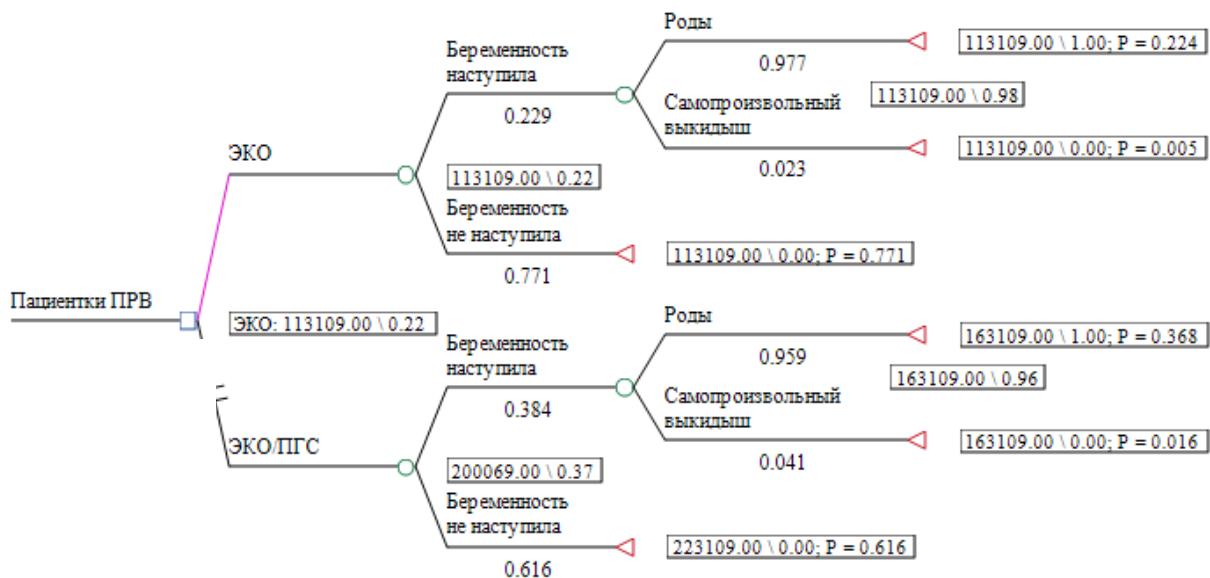


Рисунок 11. Дерево решений для модели эффективности ЭКО по сравнению с ЭКО/ПГС методом aCGH на 5-е сутки культивирования эмбрионов у пациенток ПРВ (>35 лет).

Средняя стоимость лечения методом ЭКО для одного живорождения составила 514 131,8 руб., при лечении методом ЭКО/ПГС - 540 727,0 руб. Стоимость лечения бесплодия методом ЭКО/ПГС в расчете на одно живорождение была на 5% больше, по сравнению со стоимостью лечения бесплодия методом ЭКО (Таблица 30).

Таблица 30  
Основные результаты лечения бесплодия методом ЭКО у пациенток ПРВ (>35 лет)

Исходы	ЭКО	ЭКО/ПГС*
Вероятность живорождения	0,22	0,37
Стоимость лечения (руб.)	113 109	200 069
Стоимость лечения/ вероятность живорождения (руб.)	514 131,8	540 727,0

\*ПГС методом aCGH

Таким образом, в когорте пациенток позднего репродуктивного возраста (>35 лет) применение ЭКО с ПГС не было экономически выгодной стратегией.

Далее мы провели сравнительный анализ 2-х стратегий: рутинного ЭКО и ЭКО с ПГС методом аCGH у бесплодных пациенток в возрасте 36-39 лет для определения минимальной стоимости одного живорождения на одного пациента, проходящего вышеуказанное лечение бесплодия. Данные по вероятности наступления беременности и самопроизвольного выкидыша в группах ЭКО и ЭКО/ПГС у пациенток ПРВ были получены из результатов собственных наблюдений (Таблица 31). Стоимость различных медицинских услуг - см. таблицу 29.

Таблица 31  
Вероятности исходов ЭКО и ЭКО/ПГС у пациенток 36-39 лет

Показатели	p**
Беременность после ЭКО	0,289
Беременность после ЭКО/ПГС*	0,513
Самопроизвольный выкидыш после ЭКО	0
Самопроизвольный выкидыш после ЭКО/ПГС*	0

\*ПГС методом аCGH на 5-е сутки; \*\*р - вероятность

Вероятность живорождения при применении одного цикла ЭКО у пациенток ПРВ составила 22% по сравнению с 37% для пациенток ПРВ при применении одного цикла ЭКО/ПГС. Средняя стоимость лечения методом ЭКО составила 113 109 руб. по сравнению со 201 989 руб. при лечении методом ЭКО/ПГС (Рисунок 12).

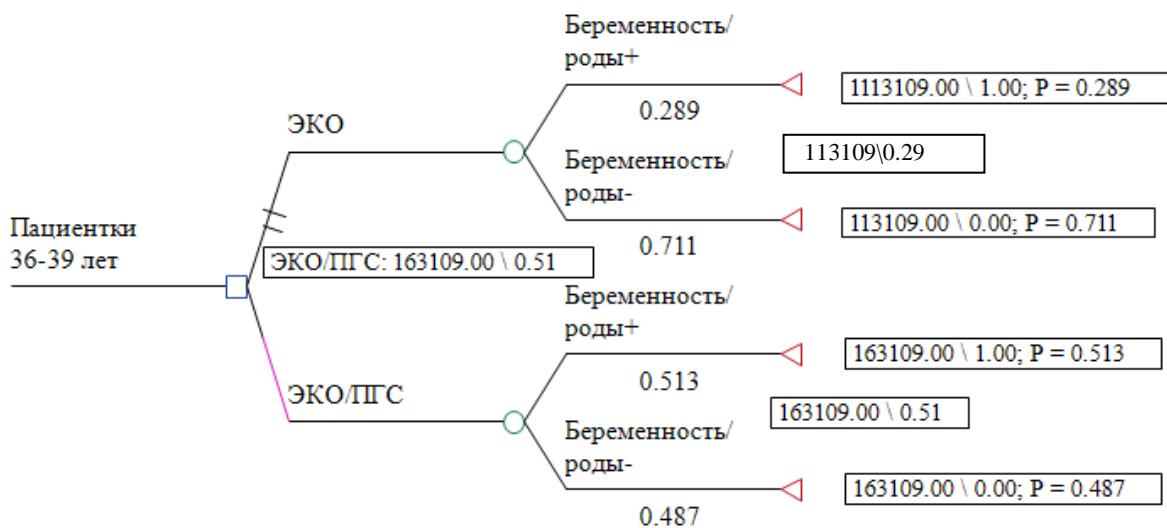


Рисунок 12. Дерево решений для модели эффективности ЭКО по сравнению с ЭКО/ПГС методом аCGH на 5-е сутки культивирования эмбрионов у пациенток ПРВ (36-39 лет).

Средняя стоимость лечения методом ЭКО для одного живорождения составила 113 109 руб., при лечении методом ЭКО/ПГС – 163 109 руб. Стоимость лечения бесплодия методом ЭКО в расчете на одно живорождение была на 18% больше, по сравнению со стоимостью лечения бесплодия методом ЭКО/ПГС (Таблица 32).

Таблица 32  
Основные результаты лечения бесплодия методом ЭКО у пациенток ПРВ (36-39 лет)

Исходы	ЭКО	ЭКО/ПГС*
Вероятность живорождения	0,29	0,51
Стоимость лечения (руб.)	113 109	163 109
Стоимость лечения/ вероятность живорождения (руб.)	390 031,0	319 821,5

\*ПГС методом аCGH

Показатель приращения затрат (от англ. - incremental cost-effectiveness ratio, ICER, инкрементный показатель соотношения стоимости и эффективности) на ведение пациентки ПРВ 36-39 лет при назначении или не назначении ПГС составил 70 209,5 руб. Показатель ICER означает, что для достижения дополнительного 1% эффективности (т.е. 1% случаев

живорождения) при проведении ЭКО без ПГС требуется дополнительное вложение **70 209,5 руб.**

Таким образом, метод лечения бесплодия у пациенток ПРВ с помощью ЭКО/ПГС является экономически выгодной стратегией в группе пациенток 36-39 лет, но не у пациенток 40 лет и старше. В данной возрастной группе пациенток для достижения одного дополнительного процента живорождения в программах ВРТ в случае применения ПГС методом аCGH на 5-е сутки культивирования эмбрионов происходит экономия 70 209,5 рублей по сравнению с отсутствием проведения ПГС.

## Глава 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время проблема восстановления фертильности у женщин позднего репродуктивного возраста находится в эпицентре внимания врачей во всем мире [14]. Возраст играет важную роль в способности пары к зачатию [14]. Фертильность женщины может снижаться с возрастом по многим причинам, таким как: постепенное обеднение овариального резерва, наличие отягощенного гинекологического анамнеза, увеличение риска анеуплоидии ооцитов [10].

Программа ЭКО является одним из наиболее современных методов лечения бесплодия. При этом возраст является одним из основных факторов, влияющих на эффективность программ ВРТ [14]. В связи с тем, что доля первородящих женщин позднего репродуктивного возраста стремительно увеличилась за последние годы, возрастает потребность в изучении методов, позволяющих повысить эффективность вспомогательных репродуктивных технологий у данных пациенток. Таким методом в настоящее время является преимплантационный генетический скрининг, позволяющий производить отбор эуплоидных эмбрионов, тем самым повышая частоту наступления беременности.

В ходе проведенного исследования были выявлены основные причины снижения фертильности у пациенток позднего репродуктивного возраста, проведена оценка параметров фолликулогенеза и оогенеза, а также было определено влияние этих факторов на частоту наступления беременности и живорождения в программах ВРТ.

В данном исследовании пациентки ПРВ имели больший ИМТ и более отягощенный акушерский анамнез, больше курили, а также имели большую длительность бесплодия, что закономерно и непосредственно связано с возрастом пациенток. У них чаще, чем у пациенток РРВ, отмечалась миома матки (39 пациенток (44,8%) в группе 1 и 12 пациенток (11,9%) в группе 2)

( $p<0,0001$ ). Аналогичные данные были получены в работе DeWaay D, *et al.* (2002), которые подтвердили, что заболеваемость миомой матки увеличивается с возрастом. В их исследовании были получены данные о том, что в промежутке от 25 до 30 лет распространенность миомы матки составляет всего 0,31 на 1000 женщин, в то время как у женщин 45-50 лет заболеваемость увеличивается в 20 раз, составляя 6,2 на 1000 женщин [90]. ПРВ увеличивает риск развития миомы матки, рост которой происходит со средней скоростью 1,2 см в 2,5 года.

Была выявлена разница в гормональном статусе пациенток позднего и раннего репродуктивного возраста. Пациентки ПРВ имели более высокий уровень ФСГ и более низкий уровень АМГ, что является неблагоприятным прогностическим фактором в программах ВРТ. На сегодняшний день АМГ является единственным доказанным лабораторным критерием оценки овариального резерва. В клинической практике определение уровня АМГ в сыворотке крови имеет большое значение для прогнозирования овариального ответа, так как отражает не только состояние фолликулярного пула, но и качество ооцитов [91]. Согласно консенсусу Европейской ассоциации эмбриологии и репродукции человека (ESHRE), критерием снижения овариального резерва является уровень АМГ  $\leq 1,2$  нг/мл [92]. В нашем исследовании 28 пациенток (32,2%) в группе 1 и только 7 пациенток (6,9%) в группе 2 имели снижение овариального резерва ( $p<0,0001$ ).

Были выявлены особенности стимуляции функции яичников в группе пациенток в возрасте старше 35 лет. Пациенткам ПРВ чаще назначали комбинированные препараты ФСГ/ЛГ, большие суммарные дозы гонадотропинов и ХГ в качестве триггера овуляции. В литературе выделяют пациенток с хорошим и плохим «бедным» ответом яичников на стимуляцию суперовуляции в циклах ЭКО [93]. «Бедный» ответ - это недостаточная реакция яичников на введение больших доз (более 300 МЕ/сут) гонадотропинов при стимуляции суперовуляции, при которой не удается обеспечить рост и созревание более 3 фолликулов [93]. По различным

оценкам, число женщин с «бедным» ответом на введение препаратов ФСГ составляет около 10-30% [14], [93]. Большинство пациенток с «бедным ответом» - это женщины старшей возрастной группы. Стимуляция только препаратами ФСГ у пациенток с «бедным ответом» приводит к росту небольшого числа фолликулов, недостаточному развитию эндометрия, низкой частоте имплантации и клинической беременности [93]. В исследовании Humaidan P. *et al.* (2004) было показано, что добавление ЛГ значительно увеличивало частоту имплантации и наступления беременности у женщин старше 35 лет [94]. Авторы объясняют это явление тем, что добавление ЛГ может повысить чувствительность яичников к ФСГ, индуцировать секрецию эстрadiола преовуляторным фолликулом и улучшить, таким образом, рост эндометрия.

Частота назначения а-ГнРГ в качестве триггера овуляции была значимо выше в группе 2 по сравнению с группой 1 (21,8% и 4,6%, соответственно). Полученные различия можно объяснить тем, что а-ГнРГ используется в качестве триггера овуляции для профилактики развития СГЯ, при этом пациентки ПРВ имеют низкий риск развития СГЯ, что связано с физиологическим снижением овариального резерва.

В ходе проведенного исследования было показано, что эффективность программ ВРТ у пациенток ПРВ была значимо ниже, чем у пациенток РРВ. У пациенток ПРВ отмечалось снижение числа ооцитов, зрелых ооцитов и эмбрионов. В возрасте старше 35 лет вероятность наступления беременности после проведения ВРТ была в 2,2 раза ниже, а живорождения - в 2 раза ниже, чем у пациенток 35 лет и младше. При этом из всех перечисленных потенциальных конфаундеров, отличающих пациенток ПРВ от пациенток РРВ, только число полученных эмбрионов оказывало влияние на исходы программ ВРТ. На основании возраста пациентки и числа полученных эмбрионов была разработана прогностическая модель вероятности рождения ребенка в программах ВРТ. Пороговым возрастом, при котором и выше

которого шансы наступления беременности и живорождения максимально снижались (в 2,6 раз), был возраст 37 лет.

В проведенном исследовании было установлено, что проведение ПГС у пациенток ПРВ увеличивало шансы беременности и живорождения в 2 раза по сравнению с его отсутствием. Поэтому, у пациенток ПРВ и РРВ, у которых проводился ПГС, не было отмечено значимой разницы в частоте наступления беременности и живорождения ( $p>0,05$ ). А у пациенток ПРВ без ПГС по сравнению с пациентками ПРВ с ПГС отмечалась значимо меньшая частота беременностей и живорождений (в 2 раза меньше). Известно, что доля ооцитов и, соответственно, эмбрионов с различными видами анеуплоидии прогрессивно увеличивается с возрастом и может достигать 100% у женщин старше 45 лет [14]. Исследование полярных тел методом aCGH у зигот пациенток ПРВ показало, что доля зигот с анеуплоидиями составила 65,5% [44]. При этом более высокий уровень анеуплоидий, достигающий 72%, был зарегистрирован у женщин ПРВ старше 40 лет. Известно, что 95% случаев трисомии 21 хромосомы, приводящей к развитию синдрома Дауна, вызваны ошибками материнского мейоза [57], также как и синдрома Патау (трисомия 13), который в 67% случаях является следствием материнских ошибок мейоза первого деления, или синдрома Эдвардса (трисомия 18), который чаще всего возникает при ошибках материнского мейоза второго деления [60].

Именно из-за высокого риска развития анеуплоидии эмбрионов у пациенток ПРВ, применяется ПГС. Благодаря этому методу возможно производить отбор эуплоидных эмбрионов, что, в свою очередь, приводит к увеличению частоты наступления беременности, уменьшению репродуктивных потерь и снижению риска рождения детей с генетическими нарушениями [10].

На настоящий момент данные о влиянии ПГС на эффективность программ ЭКО у пациенток ПРВ противоречивы [10]. Наши данные не согласуются с данными Hardarson T. et al. (2008), которые получили

доказательства в пользу отсутствия увеличения частоты наступления беременности у женщин ПРВ при проведении ПГС [72], и данными Mersereau J. et al. (2008), которые не выявили клинико-экономическую эффективность ПГС у женщин 38-40 и старше 40 лет [73]. При этом наши данные согласуются с данными Hsiao-Ling Lee et al. (2014), которые выявили, что частота живорождения на каждый перенесенный эмбрион после криоконсервации с использованием ПГС у женщин ПРВ была выше (45,5%), чем у женщин, которым проводили перенос после криоконсервации без ПГС (19,0%), или проводили ЭКО в естественном цикле без ПГС (15,8 %) [74], и данными Yang Z. et al., которые доказали эффективность ПГС в результате проведенного РКИ [71].

Было выявлено, что риск получения анеуплоидных эмбрионов у пациенток позднего репродуктивного возраста был выше в 1,9 раз, а пороговый возраст по развитию анеуплоидии эмбрионов составил 40 лет, старше которого шансы анеуплоидии эмбрионов увеличивались в 2,8 раз. Вторым пороговым возрастом был возраст 30 лет, младше которого риск анеуплоидии эмбрионов был минимальным. С возрастом, с одной стороны, ухудшается качество ооцитов, что приводит к плохому качеству эмбрионов и низкой частоте имплантации. С другой стороны, с возрастом наблюдается снижение ответа на стимуляцию гонадотропином, и требуются большие суммарные дозы ГТ на цикл. В литературе существует предположение о том, что, чем больше общая доза ГТ, тем меньше вероятность наступления беременности [10]. Значительная доля анеуплоидии эмбрионов у пациенток ПРВ возникает в результате длительного промежутка между блоком первого мейотического деления и овуляторным циклом [10]. В исследовании Kuliev A. et al. было подсчитано, что 30% человеческих зигот являются анеуплоидными, и это число удваивается у женщин старше 38 лет [95].

При анализе структуры хромосомных аномалий любым методом ПГС у пациенток позднего и раннего репродуктивного возраста было выявлено наиболее частыми типами хромосомной патологии эмбрионов у пациенток

ПРВ была полисомия, которая наблюдалась в 1,6 раз чаще моносомии. У пациенток РРВ, наоборот, распространенность полисомии и моносомии различных хромосом была одинаковой. Преобладали анеуплоидии 13,18, 21 и половых хромосом. Также обращало на себя внимание то, что у пациенток РРВ наблюдалась значительно менее выраженная распространенность анеуплоидии по другим хромосомам, отличных от 13,18,21 и половых хромосом.

При сравнении различных методик ПГС было выявлено, что при проведении ПГС на 3-е сутки (FISH) в обеих группах женщин полисомия хромосом преобладали над моносомией, но у пациенток ПРВ значимо чаще встречалась полисомия по 18 хромосоме. При проведении ПГС на 5-е сутки (aCGH) было выявлено, что у пациенток ПРВ преобладали полисомии по отношению к моносомии, а у пациенток РРВ соотношение полисомии и моносомии было одинаковым. При этом отмечалась более низкая доля самых распространенных анеуплоидий (13, 18, 21, X/Y хромосомам) и высокая частота анеуплоидии по другим хромосомам по сравнению с ПГС на 3-е сутки. Данные различия связаны с высокой долей мозаичизма при проведении ПГС на 3-е сутки, а также с вероятностью способности эмбриона к самокоррекции хромосомных нарушений в период с 3-х по 5-е сутки эмбрионального развития [49].

Нами был определен пороговый возраст эффективности программ ВРТ с ПГС, который составил 35 и 40 лет. Т.е. у женщин младше 35 и старше 40 лет применение ПГС не увеличивает эффективность программ ВРТ. Частота наступления беременности в возрастной группе женщин от 36 до 39 лет при проведении ПГС была максимальной. Мы объясняем снижение эффективности ЭКО с ПГС в 2,6 раз у пациенток 40 лет и старше малым числом полученных эмбрионов и отмены ПЭ после ПГС по причине выявления анеуплоидии, а также маточным фактором бесплодия вследствие многочисленных выскабливаний полости матки после неудачных беременностей. Действительно, у пациенток ПРВ 40 лет и старше отмечалось

значимо большее число беременностей за счет искусственных абортов по сравнению с пациентками 36-39 лет. А отмена ПЭ у пациенток старше 40 лет по причине выявления анеуплоидии всех эмбрионов была зарегистрирована у 16 из 34 пациенток (47,0%), а у пациенток 36-39 лет - лишь у 7 из 39 пациенток (17,9%) ( $p=0,0080$ ). Наши данные не совпадают с данными, которые были получены в исследовании Cobo AC, *et al.* (2010) о том, что использование метода ПГС приносит больше пользы при использовании у пациенток старше 40 лет, чем среди других возрастных групп [77]. А некоторые авторы в своих исследованиях показали, что вероятность имплантации эуплоидных эмбрионов после ПГС не зависит от возраста матери [78].

Нами была рассчитано необходимое число зигот и бластоцист, которое необходимо получить для получения хотя бы одного эуплоидного эмбриона, в различных возрастных группах пациенток. Было выявлено, что для пациенток в возрасте 35 лет и младше для получения одного эуплоидного эмбриона необходимо получить хотя бы 3 зиготы или 2 бластоцисты, для пациенток в возрасте 36-39 лет - 4 зиготы или 2 бластоцисты, для пациенток в возрасте 40 лет и старше - 5 зигот или 4 бластоцисты. При этом для пациенток 43 лет и старше необходимо было получить уже 8 зигот или 6 бластоцист в связи с высоким уровнем анеуплоидии эмбрионов в этой группе пациенток. Наши данные частично согласуются с данными Lagalla C, *et al.* (2017), которые показали, что для получения одного эуплоидного эмбриона у пациенток младше 40 лет необходимо получить 5 зигот, у пациенток старше 41-42 лет - 13 зигот, а у пациенток 42 лет и старше - 56 зигот [96]. Мы объясняем более благоприятный прогноз в доле эуплоидных эмбрионов в нашем исследовании незначительным числом пациенток в возрасте старше 42 лет. Таким образом, пациенткам 40 лет и старше можно рекомендовать проведение ПГС в случае получения достаточного числа зигот и бластоцист. При недостаточном числе полученных эмбрионов, следует рекомендовать

повторные стимуляции овуляции и накопление эмбрионов для ПГС: до 5 зигот у пациенток 40-42 лет и до 8 зигот у пациенток 43 лет и старше.

Интересными были полученные данные о зависимости числа эуплоидных эмбрионов с параметрами овариального резерва, в частности, уровнем АМГ, у пациенток 40 лет и старше. Было выявлено, что у пациенток с наличием эуплоидных эмбрионов уровень АМГ был значимо выше, чем у пациенток того же возраста, но с отсутствием эуплоидных эмбрионов после ПГС ( $2,4 \pm 1,9$  нг/мл и  $1,2 \pm 0,7$  нг/мл соответственно,  $p=0,0191$ ). Корреляционный анализ также продемонстрировал прямую корреляционную зависимость числа полученных эуплоидных эмбрионов с уровнем АМГ ( $r=0,3767$ ,  $p=0,0317$ ). Наши данные согласуются с данными Kudesia R, et al. (2017), которые представили аналогичные данные при анализе 990 циклов ЭКО с ПГС. Было выявлено, что пациентки старше 40 лет с более высоким уровнем АМГ и наличием СПКЯ в анамнезе имеют более высокую вероятность получения эуплоидных эмбрионов и, следовательно, им можно рекомендовать проведение ПГС как эффективной стратегии [97].

Полученные различия в эффективности ПГС у женщин разных возрастных подгрупп можно также объяснить следующими факторами. Мы проводили ПГС как методом аCGH, так и методом FISH. При этом оценка эффективности ЭКО с ПГС проводилась суммарно. При исследовании различных методов ПГС для улучшения результатов программ ВРТ было выявлено, что применение ПГС методом аCGH на 5-е сутки в группе пациенток ПРВ в отличие от FISH увеличивало шансы наступления беременности и живорождения в 3,1 раз. Это связано с тем, что при биопсии бластомера на 3-й день культивирования и исследовании методом FISH может быть недооценено общее число нормальных эмбрионов. Полиморфизмы, кросс гибридизация, расщепления сигналов могут быть выявлены при исследовании методом FISH в ядрах хорошего качества, что может привести за собой ошибочный диагноз в ядрах не очень хорошего качества. В исследовании Colls P. et al. было проанализировано более 30 000

эмбрионов. Однако у 7,5% исследуемых клеток, взятых от данных эмбрионов, не удалось выявить точный диагноз для одной или более из 9 анализируемых хромосом (X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21 и 22), что не позволило отнести эмбрионы к нормальным. По причине отсутствия точного диагноза данные эмбрионы рассматривались как неинформативные [78]. В другом исследовании Magli M. et al. (2010) было описано, что процент анеуплоидий для 1 и 4 хромосом (обычно не включаемых в панель исследования методом FISH) был сравним с исследуемыми 15, 16, 21 и 22 хромосомами, что могло быть причиной неудачи ЭКО [79]. Есть вероятность того, что процент нетестируемых методом FISH хромосом может быть выше в подгруппе пациенток старше 40 лет.

Нами также было выявлено, что ЭКО/ПГС является более клинико-экономически эффективным методом лечения бесплодия у пациенток ПРВ, но только в группе 36-39 лет. Для достижения одного дополнительного процента живорождения в программах ВРТ в случае применения ПГС методом aCGH на 5-е сутки культивирования эмбрионов происходит экономия 70 209,5 рублей по сравнению с отсутствием проведения ПГС. Противоположные результаты получены в исследовании J. Mersereau *et al.* (2008), которые показали, что ЭКО/ПГС не являлся клинико-экономически выгодной стратегией в подгруппах пациенток различного возраста [73]. Следует отметить, что в данной работе ПГС проводили методом FISH, что могло оказывать влияние как на стоимость, так и на эффективность метода. А в исследовании Collins SC, et al. (2017), наоборот, было показано, что ПГС является выгодной клинико-экономической стратегией у пациенток старше 37 лет. В данном исследовании ПГС проводился преимущественно методом aCGH [98].

Таким образом, в результате исследования было доказано значительное влияние позднего репродуктивного возраста на результаты программ ВРТ. Были проанализированы наиболее часто встречающиеся типы хромосомных нарушений у пациенток позднего репродуктивного возраста, а также был

определен пороговый возраст, при котором риск развития анеуплоидии эмбрионов был наибольший. В исследовании было показано, что у пациенток РРВ, которым проводили ПГС методом аCGH при биопсии бластоцисты, возрастала частота наступления клинической беременности и живорождения. Данные исследования подтверждают точку зрения, что ПГС является важным этапом при планировании беременности у пациенток позднего репродуктивного возраста, являясь клинико-экономически эффективным методом лечения бесплодия в программах ВРТ. На основании полученных данных был предложен алгоритм дифференцированного назначения ПГС пациенткам различного возраста программ ВРТ (Рисунок 13).

Пациенткам РРВ не рекомендовано проведение ПГС. Пациенткам в возрасте 36-39 лет рекомендовано проведение ПГС как клинико-экономически выгодной стратегии в данной возрастной группе. Пациенткам 40 лет и старше рекомендована подготовка эндометрия перед программой ЭКО. Решение о проведении ПГС должно быть основано на числе полученных зигот и бластоцист. В случае невозможности получения достаточного числа эмбрионов в одном цикле ЭКО показаны повторные стимуляции суперовуляции с накоплением эмбрионов для последующего ПГС. Выполнение ПГС при недостаточном числе эмбрионов (менее 5 у пациенток в возрасте 40-42 лет, менее 8 у пациенток 43 лет и старше) является клинически и клинико-экономически невыгодной стратегией, не повышающей эффективность программ ВРТ.

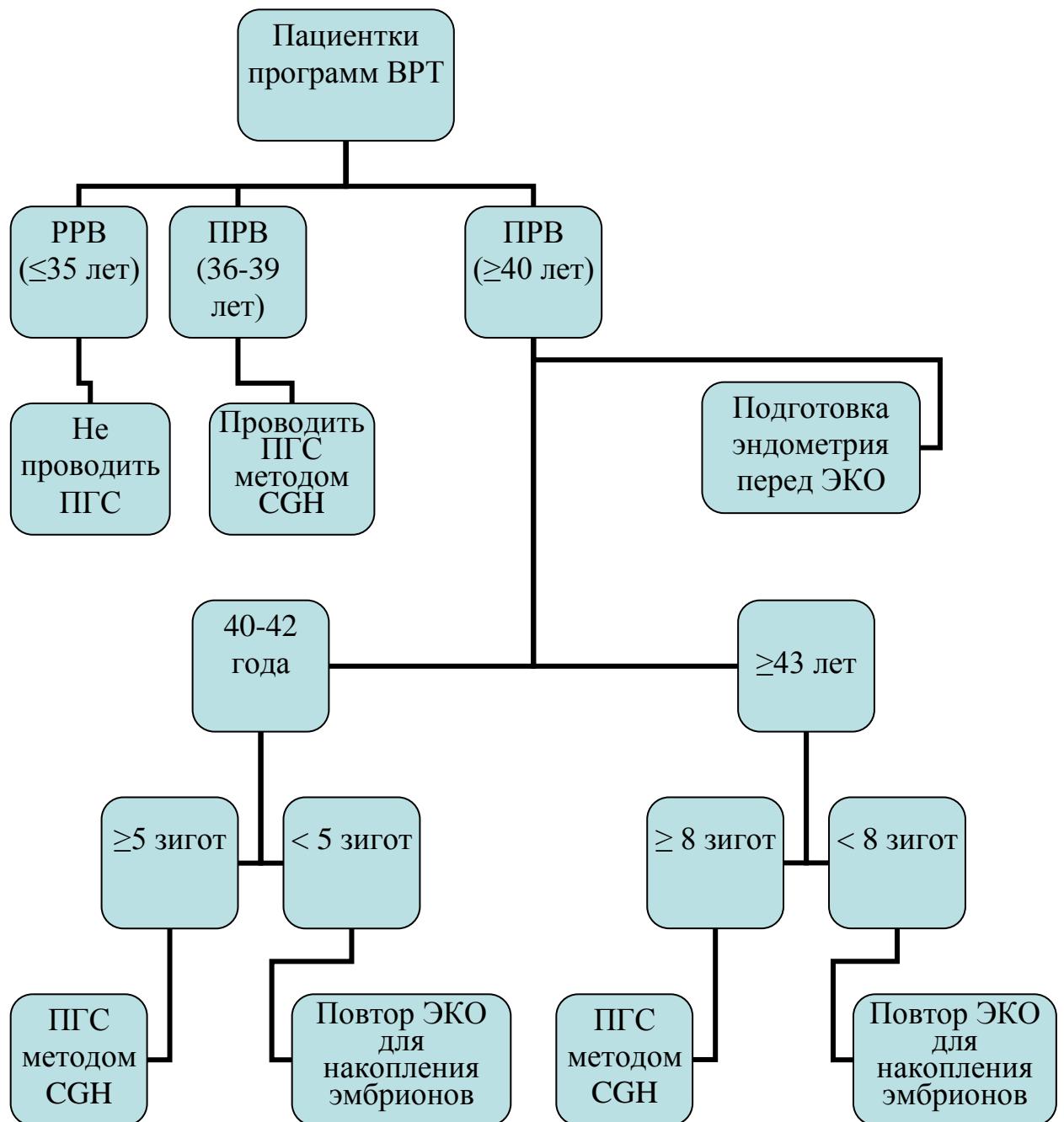


Рисунок 13. Алгоритм дифференцированного назначения ПГС пациенткам различного возраста программ ВРТ.

## ВЫВОДЫ

1. Для пациенток позднего репродуктивного возраста характерна более высокая гинекологическая заболеваемость, отягощенный акушерский анамнез, и более низкий уровень антимюллерового гормона, отражающего истощение фолликулярного пула, что является неблагоприятным прогностическим фактором в программах ВРТ.
2. Особенностями проведения овариальной стимуляции в программах ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста являются более частое назначение комбинированных препаратов ФСГ/ЛГ, большей суммарной дозы гонадотропинов, а также более частое использование хорионического гонадотропина в качестве триггера овуляции.
3. При проведении программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста отмечается значимое снижение числа полученных ооцитов, зрелых ооцитов, и, соответственно, эмбрионов хорошего качества.
4. Эффективность программ ВРТ ниже у пациенток позднего репродуктивного возраста. Шансы наступления клинической беременности после проведения ВРТ в 2,2 раза выше, живорождения – в 2 раза выше у пациенток 35 лет и младше по сравнению с пациентками в возрасте старше 35 лет. Пороговым возрастом, при котором и выше которого шансы наступления беременности и живорождения уменьшаются в 2,6 раз, является возраст 37 лет (ОШ беременности = 2,6 (95% ДИ=1,4; 5,1, AUC=61,3%), ОШ живорождения = 2,6 (95% ДИ=1,3; 5,1, AUC=60,8%).
5. Риск получения анеуплоидных эмбрионов у пациенток позднего репродуктивного возраста в 1,9 раз выше по сравнению с пациентками раннего репродуктивного возраста (ОШ=1,9; 95% ДИ=1,3; 2,7). Пороговым возрастом, при котором и выше которого вероятность получения эмбрионов с анеуплоидией максимально возрастает (в 2,8 раз), является возраст 40 лет (ОШ=2,8; 95% ДИ=1,8; 4,5). У пациенток 40 лет и старше более высокий

уровень АМГ является хорошим прогностическим маркером получения эуплоидных эмбрионов в программах ВРТ.

6. У пациенток позднего и раннего репродуктивного возраста отмечаются различия в структуре хромосомных нарушений эмбрионов: у пациенток позднего репродуктивного возраста в 1,6 раз чаще отмечаются различные полисомии по сравнению с моносомиями, у пациенток раннего репродуктивного возраста частота полисомий и моносомий является примерно одинаковой. Кроме того, у пациенток раннего репродуктивного возраста отмечается значительно менее выраженная распространенность анеуплоидий по хромосомам, отличных от 13,18,21 и половых хромосом.

7. Структура хромосомной патологии эмбрионов при проведении ПГС на 3-и и 5-е сутки существенно различается, что связано с высокой долей мозаичизма при ПГС на 3-и сутки, а также вероятностью способности эмбриона к самокоррекции хромосомных нарушений в период с 3-и по 5-е сутки эмбрионального развития. При проведении ПГС на 5-е сутки отмечается более низкая доля самых распространенных анеуплоидий (13, 18, 21, X/Y хромосомам) и высокая частота анеуплоидий по другим хромосомам по сравнению с ПГС на 3-и сутки.

8. В целом, применение ПГС любым методом у пациенток ПРВ увеличивает частоту наступления беременности в 2,1 раза (ОШ=2,1; 95% ДИ=1,04; 4,2), частоту живорождения - в 2,0 раза (ОШ=2,0; 95% ДИ=0,98; 4,1). Наибольшая эффективность ЭКО с ПГС отмечается в возрастной группе от 36 до 39 лет (ОШ=2,6; 95% ДИ=1,05; 6,4). Неэффективность ЭКО с ПГС у пациенток в возрасте 40 лет и старше связана с малым числом полученных эмбрионов и отменой их переноса после ПГС по причине высокой частоты анеуплоидии, а также с маточным фактором бесплодия вследствие многочисленных выскабливаний полости матки после неудачных беременностей.

9. Наиболее эффективным методом ПГС для пациенток позднего репродуктивного возраста является аCGH на 5-е сутки культивирования

эмбрионов с исследованием трофэктомы бластоцисты. Шансы наступления беременности и живорождения при применении ПГС методом CGH на 5-е сутки в группе пациенток позднего репродуктивного возраста увеличиваются в 3,1 раза (ОШ беременности =3,1; 95% ДИ 1,2; 8,1, ОШ живорождения = 3,1; 95% ДИ 1,3; 7,6).

10. ПГС методом аCGH на 5-е сутки культивирования эмбрионов является клинико-экономически эффективной стратегией у пациенток 36-39 лет, но не является эффективной у пациенток 40 лет и старше. У пациенток 36-39 лет применение преимплантационного генетического скрининга позволяет произвести экономию 70 209,5 рублей для достижения одного дополнительного процента живорождения в программах ВРТ.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Пациенткам позднего репродуктивного возраста требуется комплексный подход в коррекции гинекологических заболеваний, а также дифференцированный подход в выборе подходящего протокола стимуляции суперовуляции. Для расчета индивидуальной вероятности эффективности программ ВРТ может быть использована разработанная математическая модель, включающая оценку клинико-лабораторных факторов.

2. Пациенткам раннего репродуктивного возраста (35 лет и младше) не рекомендовано рутинное назначение преимплантационного генетического скрининга как методики, не повышающей эффективность программ ВРТ в данной возрастной группе.

3. Пациенткам позднего репродуктивного возраста 36-39 лет рекомендовано проведение преимплантационного генетического скрининга методом аCGH на 5-е сутки культивирования эмбрионов путем биопсии трофэктодермы как эффективной клинико-экономической стратегии, повышающей шансы наступления беременности и живорождения в 2,6 раз и позволяющей произвести экономию 70 209,5 рублей для достижения одного дополнительного процента живорождения в программах ВРТ.

4. Пациентки позднего репродуктивного возраста 40 лет и старше представляют группу риска по выявлению различных анеуплоидий у эмбрионов в программах ВРТ. Однако применение преимплантационного генетического скрининга в данной возрастной группе не является эффективной клинико-экономической стратегией вследствие высокого риска утилизации анеуплоидных эмбрионов и наличия маточного фактора бесплодия. Поэтому, пациенткам данной возрастной группы рекомендовано:

- лечение, направленное на повышение рецептивности эндометрия;

- пациенткам 40-42 лет в случае получения  $\geq 5$  зигот проведение ПГС, а в случае получения менее 5 зигот - повторная овариальная стимуляция с целью накопления эмбрионов для ПГС;
- пациенткам 43 лет и старше в случае получения  $\geq 8$  зигот проведение ПГС, а в случае получения менее 8 зигот - повторная овариальная стимуляция с целью накопления эмбрионов для ПГС;
- донорство ооцита в случае неэффективности овариальной стимуляции.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АЗС - астенозооспермия
- АМГ - антимюллеров гормон
- а-ГнРГ – агонисты гонадотропин-рилизинг гормона
- ант-ГнРГ - антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона
- ACAT - антиспермальные антитела
- ВДП – верхние дыхательные пути
- ВЗОМТ - воспалительные заболевания органов малого таза
- ВКМ – внутриклеточная масса
- ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии
- ГТ - гонадотропины
- ДГЭАС - дегидроэпиандростерон-сульфат
- ДИ – доверительный интервал
- Е2 - эстрадиол
- ЖКТ - желудочно-кишечный тракт
- ЗППП - заболевания, передающиеся половым путем
- ИКСИ - (от англ. – intracytoplasmic sperm injection, ICSI) интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит
- ИМТ- индекс массы тела
- КОК - комбинированные оральные контрацептивы
- ЛГ – лютенизирующий гормон
- ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс
- ОШ - отношение шансов
- ОШ<sub>кор</sub> - скорректированное отношение шансов
- ПГД - преимплантационная генетическая диагностика
- ПГС - преимплантационный генетический скрининг
- ПРВ - поздний репродуктивный возраст
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- ПЭ - перенос эмбрионов

РРВ - ранний репродуктивный возраст  
 рФСГ - рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон  
 СГЯ - синдром гиперстимуляции яичников  
 СПКЯ - синдром поликистозных яичников  
 ТВП – транс вагинальная пункция яичников  
 ТЗС - тератозооспермия  
 ТТГ - тиреотропный гормон  
 Т4<sub>св</sub> - свободный тироксин  
 ТФЭ - трофэктомерма  
 УЗИ - ультразвуковое исследование  
 ФСГ - фолликулостимулирующий гормон  
 β-ХГ - β-субъединица хорионического гонадотропина  
 ХГ - хорионический гонадотропин  
 цД - цитоплазматические дисморфизмы ооцитов  
 ЦИН - цервикальная интраэпителиальная неоплазия  
 чМГ - человеческий менопаузальный гонадотропин  
 ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение  
 эцД - экстрацитоплазматические дисморфизмы ооцитов  
 AUC - area under the curve, площадь под кривой  
 Exp - экспонента  
 CGH - comparative genomic hybridization, сравнительная геномная гибридизация  
 аCGH - array comparative genomic hybridization, микроматричная сравнительная геномная гибридизация  
 мCGH - metaphase comparative genomic hybridization, метафазная сравнительная геномная гибридизация  
 FISH - fluorescent in situ hybridization, флуоресцентная гибридизация *in situ*  
 ICER - incremental cost-effectiveness ratio, инкрементный показатель соотношения стоимости и эффективности  
 Se - sensitivity, чувствительность  
 Sp - specificity, специфичность

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Leridon, H. Kremlin-Bice L., Cedex Å. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment // Hum. Reprod. – 2004. - Vol. 19 (7). – P. 1548–1553.
2. Liu K. Case A. Advanced reproductive age and fertility // J. Obs. Gynaecol Can. – 2011. - Vol. 33 (11). – P. 1165–75.
3. Сыркашева А.Г., Ильина Е.О., Долгушина Н.В. Бесплодие у женщин старшего репродуктивного возраста: причины, тактика ведения, перспективы использования преимплантационного генетического скрининга (обзор литературы) // Гинекология. – 2016. - № 3. – С. 40–43.
4. Мишиева Н.Г., Назаренко Т.А., Жорданидзе Д.О. Овариальный резерв в прогнозе лечения бесплодия // Проблемы репродукции. – 2008. – № 1. – С. 30–31.
5. Ответ яичников в программах вспомогательных репродуктивных технологий при трубном бесплодии / И.А. Петров [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2017. - № 1. – С. 33–39.
6. Состояние овариального резерва при некоторых формах функционального бесплодия / Д. О. Жорданидзе [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2010. - № 5. – С. 25–31.
7. Effect of parental age on fertilization and pregnancy characteristics in couples treated by intracytoplasmic sperm injection. / S. D. Spandorfer [et al.] // Hum. Reprod. – 1998. - Vol. 13 (2). - P. 334–338.
8. Bukulmez O., Arici A. Assessment of ovarian reserve // Curr. Opin Obstet. Gynecol. – 2004. - Vol. 16 (3). - P. 231–237.
9. Вспомогательные репродуктивные технологии у супружеских пар с высоким риском генетических нарушений. Преимплантационный генетический скрининг,” / Е.В. Кулакова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2017. - № 8. – С. 21–27.
10. Сыркашева А.Г. Современные подходы к повышению

эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с дисморфизмами ооцитов: дис. ... канд. мед. наук. - Москва, 2015.

11. Роль преимплантационного генетического скрининга в эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с привычным невынашиванием беременности (обзор литературы) / О.Е. Коротченко [и др.] // Проблемы репродукции. – 2017. – Т. 23, № 2. - С. 50–55.

12. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009 / F. Zegers-Hochschild [et al.] // Fertil. Steril. – 2009. - Vol. 92 (5). – P. 1520–1524.

13. Denson V. Diagnosis and Management of Infertility // J. Nurse Pract. – 2006. - Vol. 2 (6). – P. 380–386.

14. Мишиева Н.Г. Бесплодие у женщин позднего репродуктивного возраста: принципы диагностики и лечения в зависимости от овариального резерва: дис. ... д-ра мед. наук. - Москва, 2008.

15. Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., Чкуасели А.С. Факторы, определяющие овариальный резерв женщины // Журнал акушерства и женских болезней. – 2009. – Т. 58, № 2. – С. 65–71.

16. Gougeon A., Ecochard R., Thalabard J.C. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women // Biol. Reprod. – 1994. - Vol. 50 (3). – P. 653–663.

17. A new model of reproductive aging: The decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause / K. R. Hansen [et al.] // Hum. Reprod. – 2008. - Vol. 23 (3). – P. 699–708.

18. Laven J. S. E. Genetics of Early and Normal Menopause // Semin. Reprod. Med. – 2015. - Vol. 33 (6). – P. 377–383.

19. Pelosi E., Forabosco A., Schlessinger D. Genetics of the ovarian

reserve // Front. Genet. – 2015. - Vol. 6. – P. 1–20.

20. Ovarian reserve tests for predicting fertility outcomes for assisted reproductive technology: The International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation protocol for a systematic review of ovarian reserve test accuracy / N.P. Johnson [et al.] // Br. J. Obstet. Gynaecol. – 2006. - Vol. 113 (12). – P. 1472–1480.

21. Velde T., Peter L. The variability of female reproductive aging // Hum. Reprod. Update. – 2002. - Vol. 8 (2). – P. 141–154.

22. Reproductive aging: accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women / N. Klein [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1996. – Vol. 81. – P. 1038–1045.

23. Broekmans F. J., Soules M. R., Fauser B. C. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. // Endocr. Rev. – 2009. - Vol. 30 (5). - P. 465–493.

24. Nesbitt-Hawes E.M., Ledger W. Endometriosis and infertility // Reproductive Surgery in Assisted Conception. – Springer, 2015. – P. 29–35.

25. Anti muellerian hormone serum levels in women with endometriosis: a case-control study / O. Shebl [et al.] // Gynecol. Endocrinol. – 2009. - Vol. 25 (11). – P. 713–716.

26. Влияние резекции яичников на их функциональный резерв / В.С. Корсак [и др.] // Проблемы репродукции. – 1996. – Т. 2, № 4. – С. 63-67.

27. Яковлева Н.В. Лечебно-диагностические алгоритмы реабилитации пациенток с трубно-перitoneальным бесплодием: дис. ... д-ра мед. наук. - Новосибирск, 2014.

28. Nargund G., Cheng W.C., Parsons J. The impact of ovarian cystectomy on ovarian response to stimulation during in-vitro fertilization cycles // Hum. Reprod. – 1996. - Vol. 11 (1). - P. 81–83.

29. The effect of adnexal surgery on the ovarian response to stimulation in in vitro fertilization / A. Shulman [et al.] // Eur. J. Obs. Gynecol. Reprod. Biol. –

2002. - Vol. 103 (2). – P. 158–162.

30. Белялова Н.С. Белялов Ф.И. Факторы риска и профилактика рака // Клиническая медицина. – 2005. - Т. 11, № 1. – С. 17–21.
31. Гасымова У.Р. Состояние овариального резерва у женщин репродуктивного возраста, перенесших органосохраняющие операции на органах малого таза: дис. ... канд. мед. наук. - Москва, 2014.
32. Lushbaugh C., Carasett C. The effects of gonadal irradiation in clinical radiation therapy: a review // Cancer. – 1976. - Vol. 37. – P. 1111–1120..
33. Long-term gonadal toxicity after therapy for Hodgkin вЂ™ s and non-Hodgkin вЂ™ s lymphoma / C. Bokemeyer [et al.] // Ann. Hemat. – 1994. - Vol. 68 (3). – P. 105–110.
34. Жорданидзе Д.О. Состояние овариального резерва при некоторых формах бесплодия. Диссертация на соискание ученой степени: дис. канд. мед. наук. - Москва, 2011.
35. Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidenced by the clomiphene citrate challenge test. / F. I. Sharara [et al.] // Fertil. Steril. – 1994. - Vol. 62 (2). – P. 257–262.
36. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte . Part I: clinical results / J. Geraedts [et al.] // Hum. Reprod. – 2011. - Vol. 0 (0). – P. 1–8.
37. Сыркашева А.Г. Современные подходы к повышению эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с дисморфизмами ооцитов // Акушерство и гинекология. – 2015. - № 7.
38. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. / F. Pellestor [et al.] // Hum. Genet. – 2003. - Vol. 112 (2). – P. 195–203.
39. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation ( CGH ) ± Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions / È. Olert [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. – 2011. – Vol. 9. –

P. 539–547.

40. Nagaoka S.I., Hassold T.J. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem // *Nat. Rev. Genet.* – 2013. - Vol. 13 (7). - P. 493–504.

41. Rare chromosome abnormalities , prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe / D. Wellesley [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2012. - Vol. 20 (5). – P. 521–526.

42. Sperm aneuploidy rates in younger and older men / C. M. Luetjens [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2002. - Vol. 17 (7). – P. 1826–1832.

43. Pellestor F., Andréo B. The occurrence of aneuploidy in human : lessons from the cytogenetic studies of human oocytes // *Eur. J. Med. Genet.* – 2006. - Vol. 49. – P. 103–116.

44. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure / E. Fragouli [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. - Vol. 94 (3). – P. 875–887.

45. Hassold T., Hall H., Hunt P. The origin of human aneuploidy: Where we have been, where we are going // *Hum. Mol. Genet.* – 2007. - Vol. 16 (2). – P. 203–208.

46. Cdc20 Is Critical for Meiosis I and Fertility of Female Mice / F. Jin [et al.] // *PLoS Genet.* – 2010. - Vol. 6 (9).

47. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH , CGH and aCGH : scientific data and technical evaluation / E. Fragouli [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. - Vol. 26 (2). – P. 480–490.

48. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3 / H. Danzer [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2005. - Vol. 84 (5). - P. 1395–1400.

49. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential / B.-Y. D. Barash-Hazan [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol. 92 (3). – P. 890–896.

50. Huppertz B., Herrler A. Regulation of Proliferation and Apoptosis

During Development of the Preimplantation Embryo and the Placenta // Birth Defects Res. Embryo. Today. – 2006. - Vol. 261. – P. 249–261.

51. Human pre-implantation embryo development / K.K. Niakan [et al.] // Development. – 2012. - Vol. 841. – P. 829–841.

52. Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester/ S. Munné [et al.] // Reprod. Biomed. Online. – 2003. - Vol. 8 (1). – P. 81–90.

53. Mantzouratou A., Delhanty J. D. A. Aneuploidy at Different Life Stages : Embryonic and Prenatal Aneuploidy in the Human Cleavage // Cytogenet. Genome Res. – 2011. - Vol. 133. – P. 141–148.

54. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos / S. Munné [et al.] // Hum. Reprod. – 1993. - Vol. 8 (12). – P. 2185–2191.

55. Vermeesch T., Voet E., Vanneste J. Aneuploidy at Different Life Stages : Embryonic and Prenatal The Human Cleavage Stage Embryo Is a Cradle of Chromosomal Rearrangements // Cytogenet. Genome Res. – 2011. – Vol. 133 (2-4). – P. 160–168.

56. Recombination and Maternal Age-Dependent Nondisjunction : Molecular Studies of Trisomy 16 / T. Hassold [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1995. – Vol. 57 (4). – P. 867–874.

57. Antonarakis S. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms // N. Engl. J. Med. – 1991. - Vol. 324 (13). – P. 872–876.

58. Nondisjunction of human acrocentric chromosomes : studies of 432 trisomic fetuses and liveborns / M.V. Zaragoza [et al.] // Hum. Genet. – 1994. – Vol. 94 (4). - P. 411–417.

59. The Origin of Trisomy 22 : Evidence for Acrocentric Chromosome-Specific Patterns of Nondisjunction / H.E. Hall [et al.] // Am. J. Med. Genet. – 2007. - Vol. 143 (19). – P. 2249–2255.

60. Non-disjunction of chromosome 18 / M. Bugge [et al.] // Hum. Mol.

Genet. – 1998. - Vol. 7 (4). – P. 661–669.

61. Reduction of the multiple pregnancy rate in a preimplantation genetic diagnosis programme after introduction of single blastocyst transfer and cryopreservation of blastocysts biopsied on Day 3 / T. El-Toukhy [et al.] // Hum. Reprod. – 2009. - Vol. 24 (10). – P. 2642–2648.

62. Vitrification of human embryos subjected to blastomere biopsy for pre-implantation genetic screening produces higher survival and pregnancy rates than slow freezing / L. Keskinpe [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2009. – Vol. 26 (11-12). – P. 629–635.

63. Сокур С.А. Оптимизация исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий у супружеских пар с повышенным уровнем анеуплоидии в сперматозоидах: дис. ... канд. мед. наук. - Москва, 2015.

64. Kuliev A., Rechitsky S. Polar body-based preimplantation genetic diagnosis for Mendelian disorders // Mol. Hum. Reprod. – 2011. - Vol. 17 (5). - P. 275–285.

65. Article Outcome of laser-assisted polar body biopsy and aneuploidy testing / M. Montag [et al. ] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2004. - Vol. 9 (4). – P. 425–429.

66. Delhanty J. D. A. Preimplantation genetics : an explanation for poor human fertility ? // Ann. Hum. Genet. – 2001. – Vol. 65 (Pt. 4). – P. 331–338.

67. Neonatal follow-up of 995 consecutively born children after embryo biopsy for PGD / S. Desmyttere [et al.] // Hum. Reprod. – 2012. - Vol. 27 (1). – P. 288–293.

68. Barnabas S., Grove D. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births // Prenat. Diagn. – 1998. - Vol. 18 (13). – P. 1459–1466.

69. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays / D. Pinkel [et al.] // Nat. Genet. – 1998. - Vol. 20 (2). - P. 207–211.

70. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening /

E.E. Wallach [et al.] // Fertil. Steril. – 2010. – Vol. 94 (4). – P. 1173–1177.

71. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients : results from a randomized pilot study / Z. Yang [et al.] // Mol. Cytogenet. – 2012. – Vol. 25. – P. 1–8.

72. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial / T. Hardarson [et al.] // Hum. Reprod. – 2008. - Vol. 23 (12). – P. 2806–2812.

73. Mersereau J.E., Plunkett B.A., Cedars M.I. Preimplantation genetic screening in older women: a cost-effectiveness analysis // Fertil. Steril. – 2008. - Vol. 90 (3). - P. 592–598.

74. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening improves implantation and live birth in women age 40 through 43 / H. Lee [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2015. – Vol. 32 (3). - P. 435–444.

75. , Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs / S. Mastenbroek [et al.] // Hum. Reprod. Update. – 2011. - Vol. 17 (4). – P. 454–466.

76. Surrey M., Grifo J. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization // Fertil. Steril. – 2013. – Vol. 54. – P. 1–9.

77. Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening / A.C. Cobo [et al.] // Reprod. Biomed. Online. – 2010. – Vol. 21 (5). - P. 649–657.

78. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using ‘ no result rescue ’/ P. Colls [et al.] // Fertil. Steril. – 2007. - Vol. 88 (1). – P. 53-61.

79. Aneuploidies of chromosomes 1, 4, and 6 are not compatible with human embryos’ implantation / M.C. Magli [et al.] // Fertil. Steril. – 2012. - Vol. 94 (6). - P. 2012–2016.

80. Gleicher N., Kushnir V.A., Barad D.H. Preimplantation genetic

screening (PGS ) still in search of a clinical application : a systematic review // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2014. - Vol. 12 (1). – P. 1–8.

81. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years / P. Platteau [et al.] // Fertil. Steril. – 2005. - Vol. 84 (2). – P. 319-324.

82. Приказ Минздрава России №107н от 30 августа 2012 г «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

83. Ванян Р.Э. Клинико-диагностическое значение аутоиммунных и генетических факторов при “бедном” овариальном ответе на стимуляцию суперовуляции в программах вспомогательных репродуктивных технологий: дис. ... канд. мед. наук. - Москва, 2015.

84. Лебедева О.Е. Оптимизация программы вспомогательных репродуктивных технологий у супружеских пар, нуждающихся в проведении интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит, путем применения преимплантационной диагностики : дис. ... канд. мед. наук. - Москва, 2011.

85. Gardner D., Schoolcraft W.B. Culture and transfer of human blastocysts // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. – 1999. - Vol. 11 (3). - P. 307–311.

86. FISH chromosome search technology by Abbott Molecular [Electronic resource] // Mode of access: <https://www.abbottmolecular.com/products-a-z.html#letter-F>.

87. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening / S. Mastenbroek [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2007. - Vol. 357 (1). – P. 9–17.

88. Сафонова Н.А. Прогнозирование результатов программ вспомогательных репродуктивных технологий по профилю экспрессии мРНК в кумулюсных клетках: дис. ... канд. мед. наук. - Москва, 2017.

89. О программе государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи на 2014 год и на плановый период 2015 и 2016 годов : Постановление Правительства РФ от 18.10.2013 № 932 (ред. от

29.05.2014).

90. Natural history of uterine polyps and leiomyomata / V.B.J. DeWaay [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2002. - Vol. 100 (1). – P. 1-3.

91. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles / T. Ebner [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2006. - Vol. 21 (8). – P. 2022–2026.

92. ESHRE consensus on the definition of ‘poor response’ to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria / A.P. Ferraretti [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. - Vol. 26 (7). – P. 1616–1624.

93. Абляева Е.И. Индукция суперовуляции в программах вспомогательных репродуктивных технологий у женщин старшего репродуктивного возраста. Влияние экзогенного лuteinizирующего гормона на результативность программ вспомогательных репродуктивных технологий // РМЖ. – 2015. - № 14. - С 821.

94. Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH: an opening study / P. Humaidan [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2004. - Vol. 8 (6). – P. 635–643.

95. Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing / A. Kuliev [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2011. - Vol. 22 (1). – P. 2–8.

96. Preimplantation genetic screening: which indications can benefit? zygote number, female age and medical history are analyzed / C. Lagalla [et al.] // European Society of Human Reproduction and Embryology 2017 : Annual Meeting. - Geneva, Switzerland, 2017.

97. Kudesia R., Gounko D., Lee J. Can high markers of ovarian reserve overcome the usual age-related decline in euploidy in IVF-PGS cycles in women over age 40 // European Society of Human Reproduction and Embryology 2017 : Annual Meeting. - Geneva, Switzerland, 2017.

98. Collins S. C., Xu X., Mak W. Cost-effectiveness of preimplantation

genetic screening for women older than 37 undergoing in vitro fertilization. // J. Assist. Reprod. Genet. – 2017. - Vol. 34 (11). – P. 1515–1522.