

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Долгушина Наталия Витальевна

Официальные оппоненты:

Серебренникова Клара Георгиевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки России, кафедра акушерства и гинекологии с курсом перинатологии, профессор

Рудакова Елена Борисовна - доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр», отделение вспомогательных репродуктивных технологий, заведующий

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «___» 2018 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации http://sciense.ncagp.ru/upfiles/pdf/BeikEP_diss.pdf

Автореферат разослан «___» 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, доцент

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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) (Lenindon H, 2004). 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 (Liu K, 2011).

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. После 40 лет скорость атрезии фолликулов увеличивается вдвое (Мишиева Н.Г., 2008, Петров И.А., 2017). И даже при сохранном 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 (Жорданидзе Д.О., Назаренко Т.А., 2010). Все это снижает шансы наступления как спонтанной беременности, так и беременности, полученной в результате вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Некоторые исследователи считают, что возраст женщины старше 40 лет является однозначным показанием для лечения бесплодия с помощью методов ВРТ. 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 (Bukulmez O., 2004).

Преимплантационный генетический скрининг (ПГС) является методом, предотвращающим перенос эмбрионов с аномальным числом хромосом. Благодаря этому методу диагностики возможно производить селекцию генетически полноценных эмбрионов, что, в свою очередь, ведет к увеличению частоты наступления беременности, уменьшению репродуктивных потерь и снижению риска рождения детей с генетическими нарушениями (Кулакова Е.В., Калинина Е.А., 2017).

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). Каждый из этих методов имеет ряд преимуществ и недостатков (Сыркашева А.Г., 2016). 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 бластоцитов 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 проводился 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 70209,5 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 доложены на заседании аprobационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 5 марта 2018 г.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (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 них 4 - в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК: «Акушерство и гинекология» (ИФ=0,860), «Гинекология» (ИФ=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 109 страницах,

иллюстрирована 13 рисунками и 32 таблицами. Библиографический указатель включает 22 работы на русском и 76 - на английском языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Набор пациентов и эмбриологическая часть исследования осуществлялись в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия. Лабораторные исследования проводились в отделе клинической и молекулярной генетики.

Для решения поставленных задач было проведено ретроспективное (по архивным материалам) и проспективное (на основании анализа собственных данных) когортное исследование. Были проанализированы 323 супружеские пары. В зависимости от возраста пациенток и проведения ПГС были сформированы следующие группы: группа 1 - пациентки РРВ без ПГС (n=87), группа 2 - пациентки РРВ без ПГС (n=101), группа 3 - пациентки РРВ с ПГС (n=73), группа 4 - пациентки РРВ с ПГС (n=62). Оценивались шансы наступления беременности и живорождения в расчете на один цикл ЭКО в зависимости от возраста пациенток и проведения ПГС, а также пороговый возраст, при котором вероятность анеуплоидии эмбрионов и эффективность программ ВРТ с ПГС была максимальной.

Все включенные в исследование пациенты были обследованы согласно приказу Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению". Показаниями для проведения ПГС у пациенток РРВ было наличие неудачных попыток ЭКО и потеря беременности в анамнезе.

Критериями включения в исследование были нормальный кариотип супругов, трубно-перитонеальное бесплодие, фертильная/субфертильная сперма супруга, индекс массы тела (ИМТ) пациенток от 19 кг/м² до 29,9 кг/м², отсутствие привычного невынашивания беременности в анамнезе (≥ 3 потери беременности в анамнезе в сроке до 22 недель гестации), перенос

одного эмбриона, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит (ИКСИ), подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения были противопоказания к проведению ВРТ, злокачественные заболевания любой локализации, ВРТ с донорской яйцеклеткой или суррогатной мамой.

Стимуляция функции яичников проводилась по протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) с использованием препарата рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ), комбинированного препарата ФСГ и лютеинизирующего гормона (ЛГ), или человеческого менопаузального гонадотропина (чМГ). Доза препарата для каждой пациентки подбиралась индивидуально. По достижении лидирующими фолликулами диаметра 17 мм вводился триггер овуляции. В качестве триггера овуляции использовался человеческий хорионический гонадотропин (ХГ) в дозе 8 000 - 10 000 МЕ, или агонист ГнРГ (а-ГнРГ) в дозе 0,2 мг. Через 36 часов после введения триггера овуляции проводилась трансвагинальная пункция яичников.

Степень зрелости и качество ооцитов, наличие дисморфизмов ооцитов, качество эмбрионов оценивал эмбриолог методом световой микроскопии через 144-146 часов после оплодотворения (микроскоп Nikon TE 300, общее увеличение x400). Все зрелые ооциты подвергались оплодотворению методом ИКСИ. Морфологическая оценка эмбрионов осуществлялась через 120-122 часа после оплодотворения. Учитывались морфологические характеристики эмбрионов по классификации Гарднера. К эмбрионам отличного качества относили бластоцисты 4 или 5 класса с качеством внутриклеточной массы (ВКМ) и трофэктомидермы (ТФЭ) категории А.

ПГС проводился методом FISH на 3-е сутки культивирования эмбрионов путем биопсии бластомера или методом микроматричной CGH (аCGH) на 5-е сутки культивирования эмбрионов путем биопсии ТФЭ. Все эуплоидные эмбрионы подвергались крио консервации на 5-е сутки культивирования, и ПЭ осуществлялся в криоциклах.

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). 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. В полость матки переносили один эмбрион. В каждой группе производилась оценка частоты наступления беременности и живорождения в расчете на один цикл ЭКО/ПЭ.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью пакета статистических программ STATISTICA V10 (США), «SPSS Statistics V22» (США) и TreeAge Pro Inc (США).

Результаты собственных исследований и их обсуждение

При анализе клинико-лабораторных данных были выявлены следующие отличия между группами пациенток (Таблица 1). Пациентки групп 1 и 3 были значимо старше, имели больший ИМТ, большее число беременностей в анамнезе за счет самопроизвольных выкидышей, и в 1,5-4 раза чаще имели миому матки. Уровень ФСГ у них был значимо выше, а уровень антимюллерова гормона (АМГ) - ниже по сравнению с пациентками РРВ, что, как известно, является плохим прогностическим фактором в программах ВРТ. Согласно консенсусу Европейской ассоциации эмбриологии и репродукции человека, критерием снижения овариального резерва является уровень АМГ $\leq 1,2$ нг/мл. В нашем исследовании 32,2% пациенток ПРВ и только 6,9% РРВ имели снижение овариального резерва.

Таблица 1

Клинико-лабораторные характеристики 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-
Возраст, лет**	39,9±2,9	30,2±2,9	39,8±3,4	30,5±3,4	<0,0001 <0,0001
ИМТ, кг/м ² **	23,3±2,9	21,5±1,7	23,5±3,1	21,8±2,9	<0,0001 0,0011
Миома матки*	39 (44,8%)	12 (11,9%)	14 (19,2%)	8 (12,9%)	<0,0001 0,0005
Число самопр./ выкидышей***	1 (0-1)	0 (0-0)	2 (1-2)	0 (0-2)	0,0271 0,0282
АМГ, нг/мл**	1,56±1,26	3,84±2,83	2,03±1,94	3,67±2,60	<0,0001 0,0001

*Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^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

При оценке оогенеза и эмбриогенеза число ооцитов, и, соответственно, зигот и бластоцист было значимо выше у пациенток PPB (Таблица 2).

Таблица 2

Стимуляция суперовуляции и параметры оогенеза/эмбриогенеза

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-
рФСГ/ЛГ или чМГ*	55 (63,2%)	41 (40,6%)	55 (75,3%)	28 (45,2%)	0,0266 0,0003
Суммарная доза ГТ, МЕ**	2522,4± 1464,5	1928,6± 1146,3	2399,3± 1045,3	1740,7± 662,8	0,0021 <0,0001
ХГ как триггер овуляции*	83 (95,4%)	79 (78,2%)	61 (83,6%)	39 (62,9%)	0,0006 0,0063
Число ооцитов***	4 (2-7)	7 (4-10)	6 (4-10)	9 (6-13)	<0,0001 0,0011
Число зигот***	3 (1-6)	5 (3-6)	4 (3-6)	6 (4-10)	0,0006 <0,0001
Число бластоцист***	1 (1-1)	1 (1-1)	2 (1-3)	5 (3-8)	0,9989 0,0008

*Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^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

В протоколах стимуляции суперовуляции пациенткам ПРВ в 1,5 раз чаще назначались большие дозы гонадотропинов, содержащие ЛГ, и в 1,3 раз чаще - ХГ в качестве триггера овуляции по сравнению с пациентками РРВ. Стимуляция только препаратами ФСГ пациенток со сниженным овариальным резервом приводит к росту небольшого числа фолликулов, недостаточному развитию эндометрия, низкой частоте имплантации и клинической беременности, а добавление ЛГ значительно увеличивает частоту имплантации и наступления беременности у женщин старше 35 лет.

В ходе проведенного исследования было показано, что эффективность программ ВРТ у пациенток ПРВ была значимо ниже. В возрасте старше 35 лет вероятность наступления беременности после проведения ВРТ была в 2,2 раза ниже ($\text{ОШ}_{\text{кор}} = 2,2$; 95% ДИ=1,1; 4,3), а живорождения - в 2 раза ниже, чем у пациенток 35 лет и младше ($\text{ОШ}_{\text{кор}} = 2,0$; 95% ДИ=1,0; 3,9). При этом из всех перечисленных потенциальных конфаундеров, отличающих пациенток позднего возраста от пациенток раннего возраста, только число полученных эмбрионов оказывало влияние на исходы программ ВРТ (Рисунок 1).

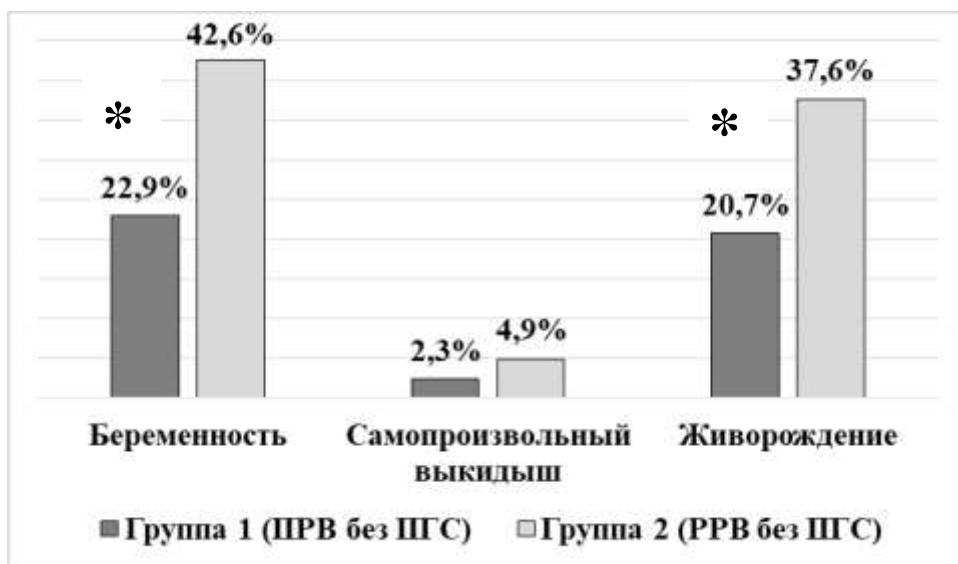


Рисунок 1. Исходы программ ВРТ у пациенток групп 1 и 2, * $p<0,05$

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%).

На основании возраста пациентки и числа полученных эмбрионов была разработана прогностическая модель вероятности рождения ребенка в программах ВРТ (Формула 1). Например, пациентка 40 лет с числом полученных зигот, равное трем, будет иметь вероятность живорождения 20%. А пациентка 20 лет с числом полученных зигот, равное 10, будет иметь вероятность живорождения 85%.

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

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.

Известно, что доля ооцитов и, соответственно, эмбрионов с различными видами анеуплоидии прогрессивно увеличивается с возрастом и может достигать 100% у женщин старше 45 лет. В нашем исследовании, было выявлено, что риск получения анеуплоидных эмбрионов у пациенток старше 35 лет был выше в 1,9 раз (ОШ =1,9; 95% ДИ: 1,3; 2,7), а пороговый возраст по развитию анеуплоидии эмбрионов составил 40 лет, старше которого шансы анеуплоидии эмбрионов увеличивались уже в 2,8 раз (ОШ = 2,8; 95% ДИ=1,8; 4,5). Вторым пороговым возрастом был возраст 30 лет, младше которого риск анеуплоидии эмбрионов был минимальным (ОШ = 0,8; 95% ДИ=0,5; 1,1) (Таблица 3).

Таблица 3

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

При анализе структуры хромосомных аномалий на 3-е сутки (FISH) в обеих группах женщин полисомия хромосом преобладали над моносомией, но у пациенток позднего возраста значительно чаще встречалась полисомия по 18 хромосоме.

При проведении ПГС на 5-е сутки наиболее частыми типами хромосомной патологии эмбрионов у пациенток позднего возраста была полисомия, которая наблюдалась в 1,6 раз чаще моносомии, а у пациенток раннего возраста соотношение полисомии и моносомии было одинаковым. Преобладали анеуплоидии 13,18, 21 и половых хромосом. Также обращало на себя внимание то, что у пациенток раннего возраста наблюдалась значительно менее выраженная распространенность анеуплоидии по другим хромосомам, отличных от 13,18,21 и половых хромосом (Рисунок 2).

В целом, при сравнении двух методик при ПГС на 5-е сутки отмечалась более низкая доля самых распространенных анеуплоидий (13, 18, 21, X/Y хромосомам) и более 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.

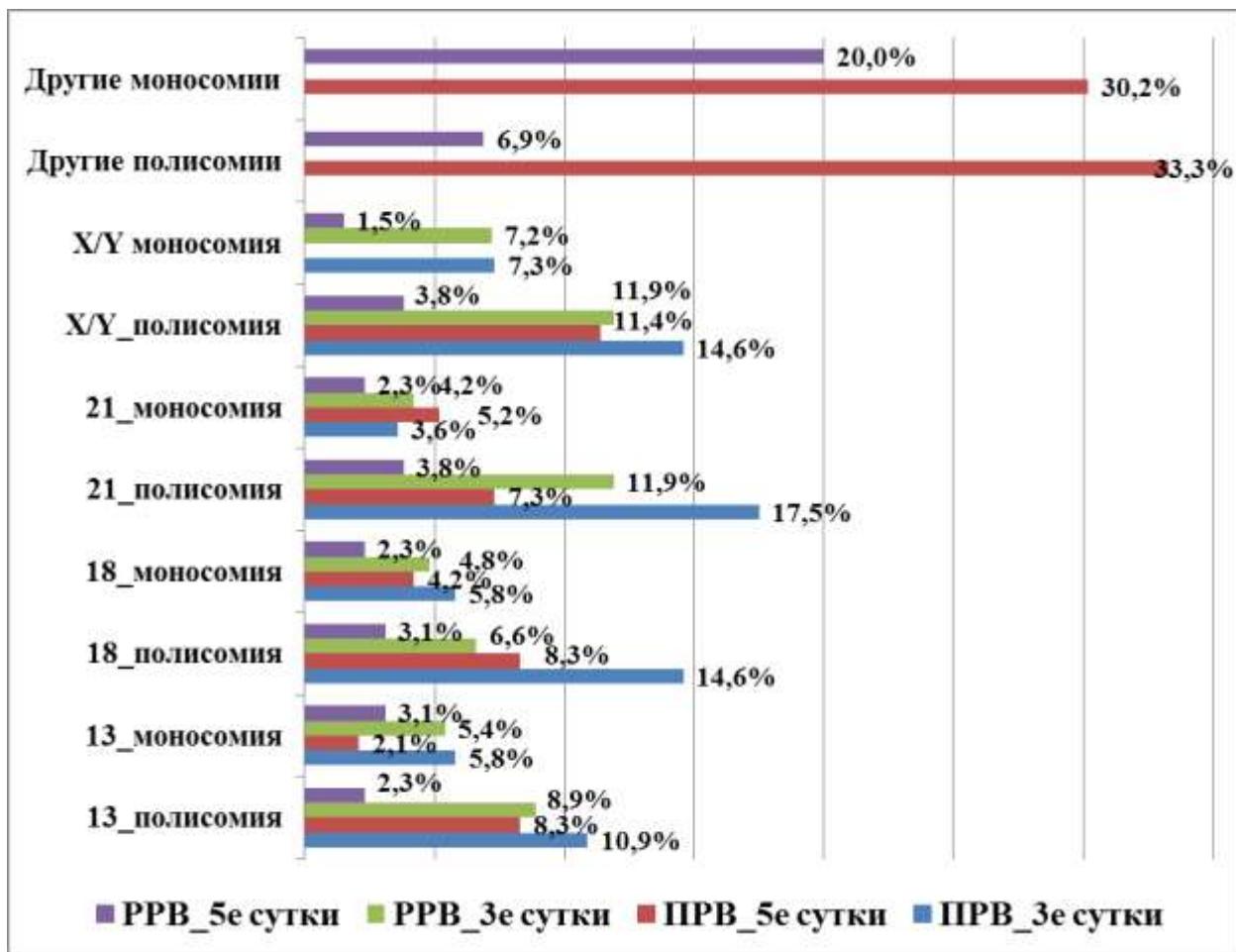


Рисунок 2. Структура анеуплоидии при применении различных методов ПГС у пациенток ПРВ и PPB.

В проведенном исследовании было установлено, что проведение ПГС у пациенток позднего возраста увеличивало шансы беременности и живорождения в 2 раза по сравнению с его отсутствием. Поэтому, у пациенток позднего и раннего возраста, у которых проводился ПГС, не было отмечено значимой разницы в частоте наступления беременности и живорождения. ОШ_{кор} беременности у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками PPB, прошедших ПГС, с учетом уровня АМГ и числа полученных бластоцитов = 1,5 (95% ДИ=0,7; 3,7). ОШ_{кор} живорождения у пациенток ПРВ по сравнению с пациентками PPB, прошедших ПГС, с учетом с учетом уровня АМГ и числа полученных бластоцитов = 1,8 (95% ДИ=0,7; 4,6).

А у пациенток позднего возраста без ПГС по сравнению с пациентками позднего возраста с ПГС отмечалась значимо меньшая частота

беременностей и живорождений. ОШ беременности у пациенток ПРВ, прошедших ПГС, по сравнению с пациентками ПРВ, не прошедших ПГС = 2,1 (95% ДИ=1,04; 4,2). ОШ живорождения у пациенток ПРВ, прошедших ПГС, по сравнению с пациентками ПРВ, не прошедших ПГС = 2,0 (95% ДИ=0,98; 4,1) (Рисунок 3).

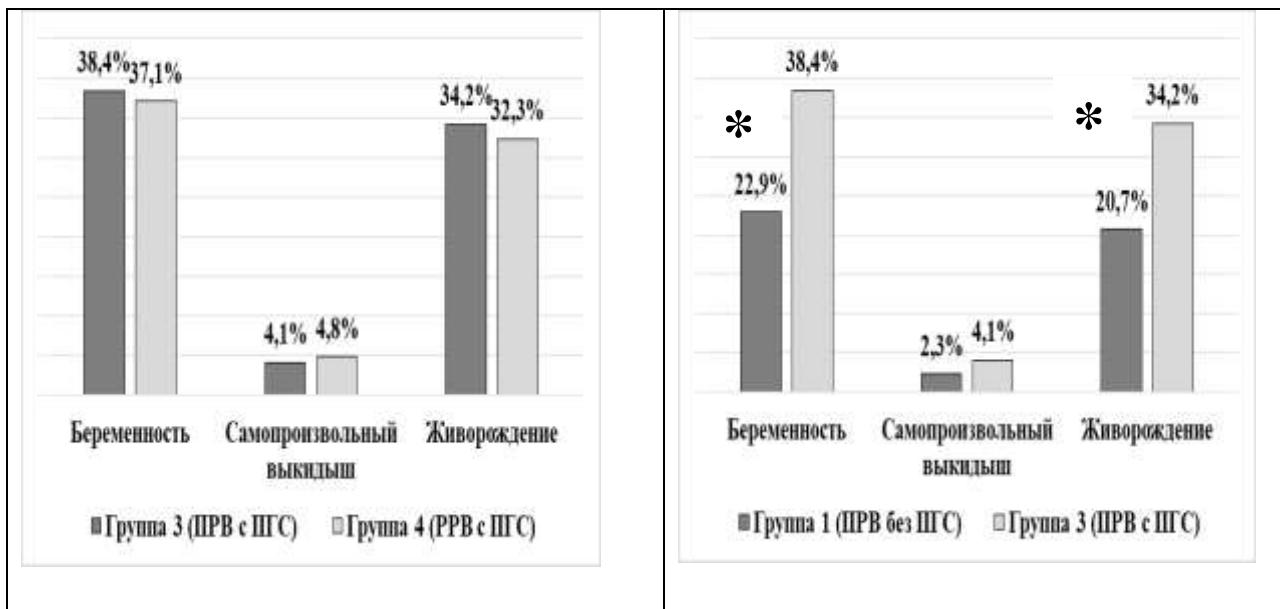


Рисунок 3. Исходы программ ВРТ у пациенток групп 1,3 и 4, * $p<0,05$

На настоящий момент данные о влиянии ПГС на эффективность программ ЭКО у пациенток ПРВ противоречивы. 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 увеличивало эффективность программ ВРТ. Частота наступления беременности в возрастной группе женщин от 36 до 39 лет при проведении ПГС была максимальной (ОШ = 2,6; 95% ДИ: 1,05; 6,4) (Рисунок 4). Мы объясняем снижение эффективности ЭКО с ПГС в 2,6 раз у пациенток 40 лет и старше малым числом полученных эмбрионов и отмены переноса эмбрионов после ПГС по причине выявления анеуплоидии, а также маточным фактором бесплодия вследствие многочисленных выскабливаний полости матки после неудачных беременностей. Действительно, в нашем исследовании у пациенток 40 лет и старше отмечалось значимо большее

число беременностей за счет искусственных абортов по сравнению с пациентками 36-39 лет. А отмена переноса эмбрионов у пациенток старше 40 лет по причине выявления анеуплоидии всех эмбрионов была зарегистрирована у 47% пациенток, а у пациенток 36-39 лет - лишь у 18% ($p=0,0080$).

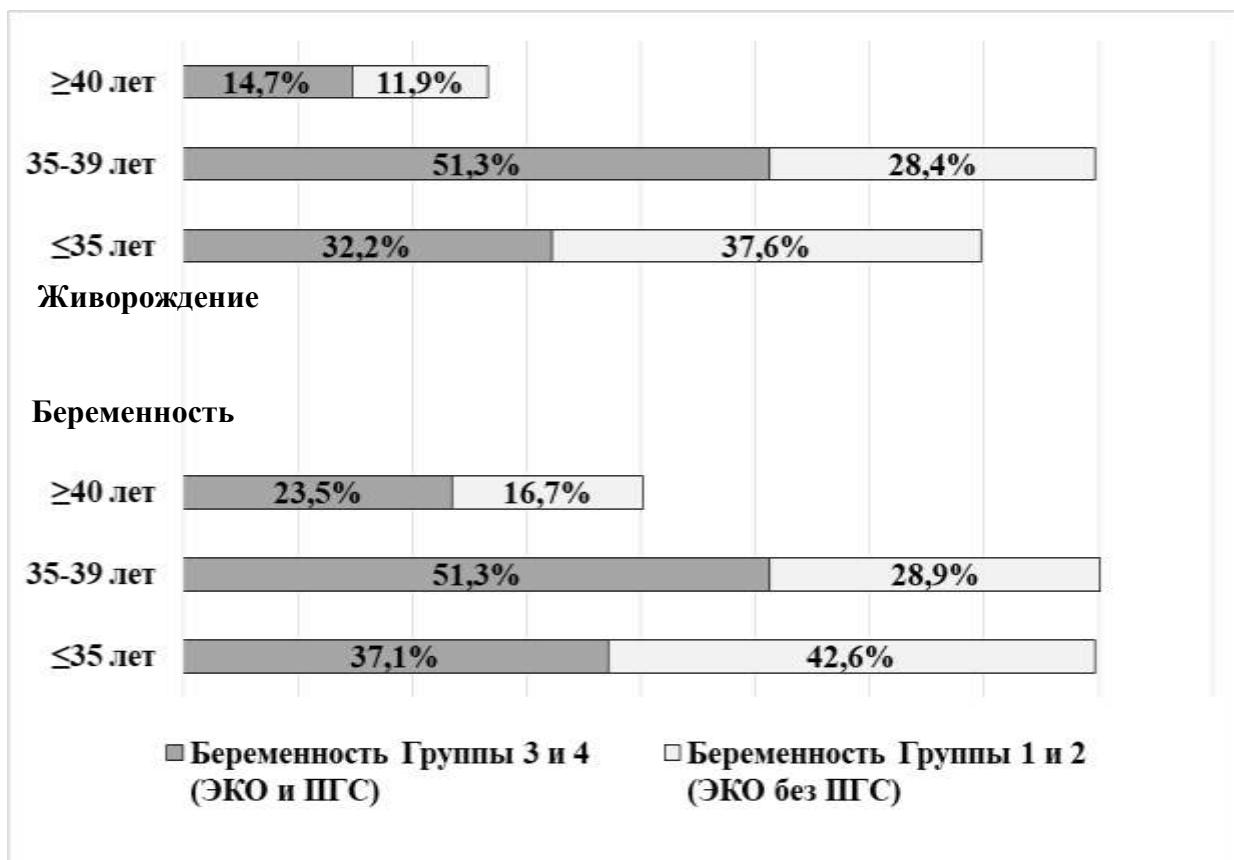


Рисунок 4. Частота наступления беременности у пациенток различных возрастных групп в зависимости от проведения ПГС.

Был произведен расчет необходимого числа 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

бластроцист в связи с высоким уровнем анеуплоидии эмбрионов в этой группе пациенток. Таким образом, пациенткам 40 лет и старше можно рекомендовать проведение ПГС в случае получения достаточного числа зигот и бластроцист. 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 (Таблица 4).

Таблица 4
Число зигот, бластроцист и эуплоидных эмбрионов в различных возрастных группах пациенток

Возраст (лет)	число пациенток	число зигот	число бластроцист	число эуплоидных эмбрионов	число эуплоидных эмбрионов / число зигот	число бластроцист / число зигот	число эуплоидных эмбрионов / число зигот	число эуплоидных эмбрионов / число зигот
≥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	

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 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 от пациенток с отсутствием эуплоидных эмбрионов ($7,1 \pm 3,7$ и $8,9 \pm 6,7$, $p=0,3239$). Корреляционный анализ также продемонстрировал прямую корреляционную зависимость числа полученных эуплоидных эмбрионов с уровнем АМГ. То есть пациентки старше 40 лет с более высоким уровнем АМГ имеют более высокую вероятность получения эуплоидных эмбрионов ($r=0,3767$, $p=0,0317$) и, следовательно, им можно рекомендовать проведение ПГС как эффективной стратегии (Рисунок 5).

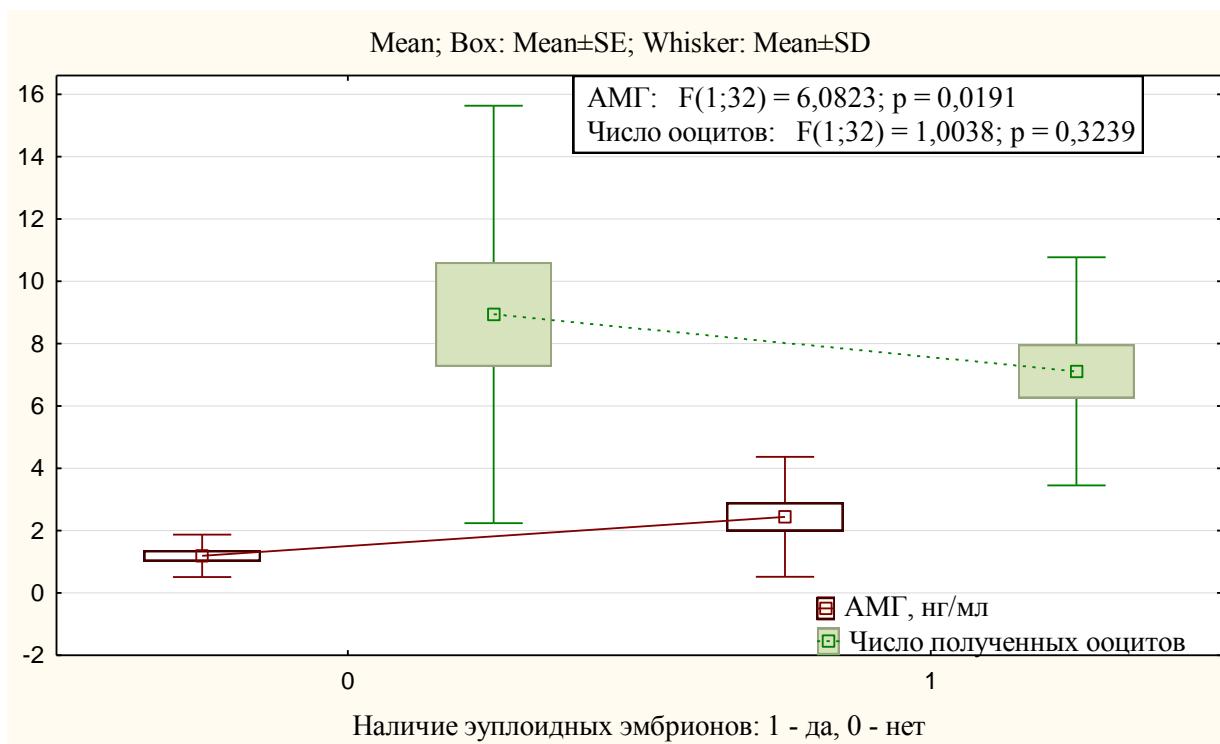


Рисунок 5. Зависимость эуплоидии эмбрионов от овариального резерва пациенток 40 лет и старше.

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 (ОШ беременности = 3,1; 95% ДИ = 1,2; 8,1; ОШ живорождения = 3,1; 95% ДИ = 1,3; 7,6) (Рисунок 6). Это связано с тем, что при биопсии бластомера на 3-й день культивирования и исследовании методом FISH может быть недооценено общее число нормальных эмбрионов. Анеуплоидии могут быть выявлены при исследовании методом FISH в ядрах хорошего качества, что может привести за собой ошибочный диагноз в ядрах не очень хорошего качества. Есть вероятность того, что процент нетестируемых методом FISH хромосом может быть выше в подгруппе пациенток старше 40 лет.

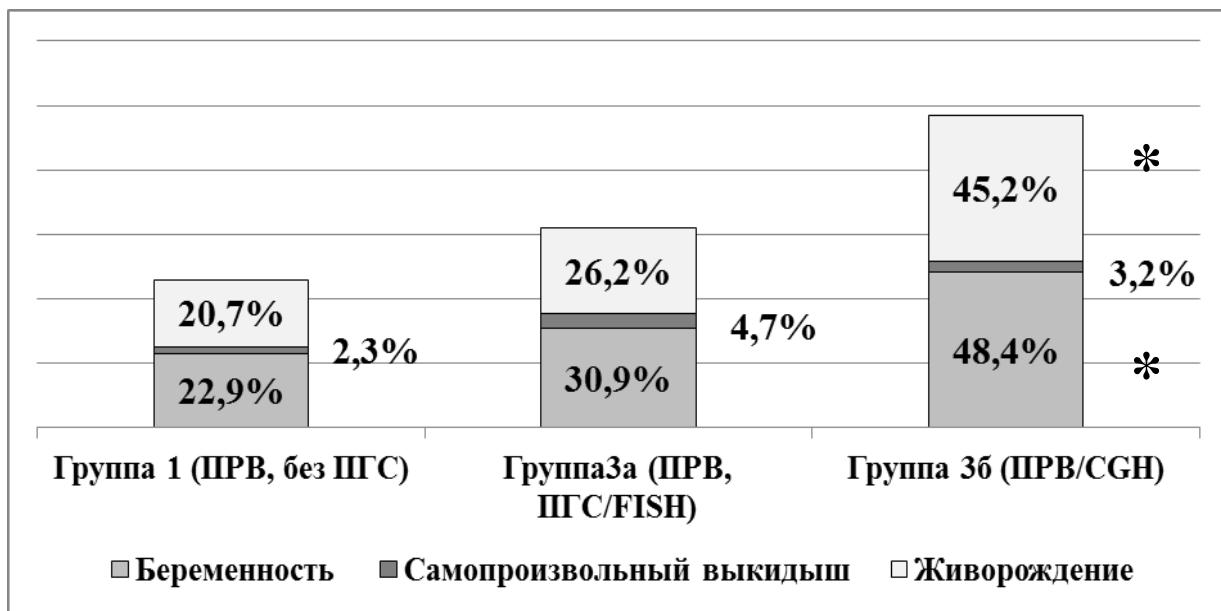


Рисунок 6. Эффективность программ ВРТ у пациенток ПРВ в зависимости от проведения и вида ПГС, * $p<0,05$

При проведении клинико-экономического анализа эффективности ЭКО с ПГС в группе пациенток старше 35 лет, не было получено данных об экономической выгоде в данной возрастной группе. Стоимость лечения бесплодия методом ЭКО/ПГС в расчете на одно живорождение была на 5% больше, по сравнению со стоимостью лечения бесплодия методом ЭКО (Таблица 5).

Таблица 5
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 аCGH

При проведении аналогичного анализа в группе пациенток старше 36-39 лет было выявлено, что в данной возрастной группе стоимость лечения бесплодия методом ЭКО в расчете на одно живорождение была на 18% больше, по сравнению со стоимостью лечения бесплодия методом ЭКО/ПГС.

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 (Таблица 6, Рисунок 7).

Таблица 6
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

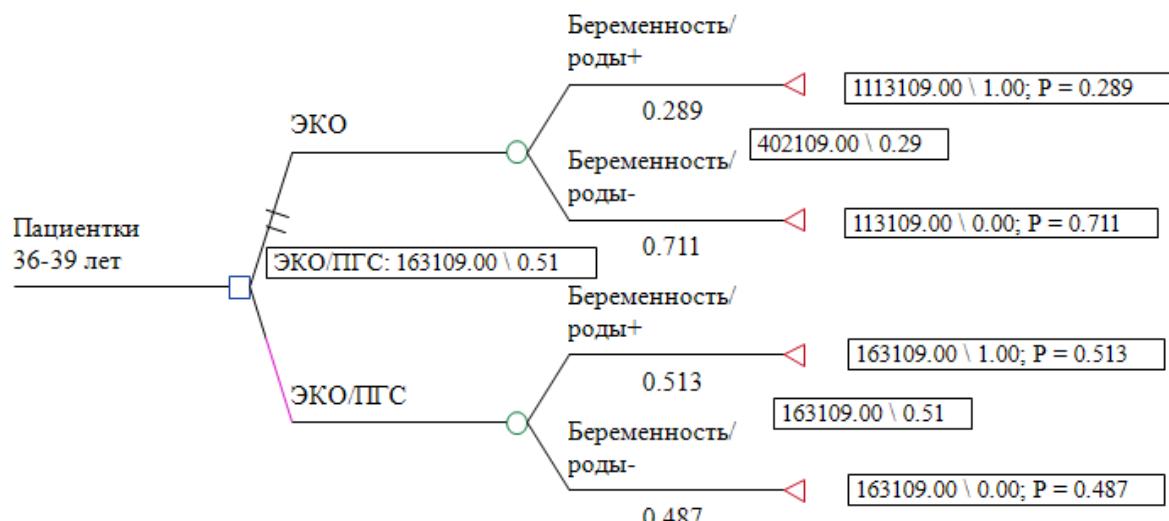


Рисунок 7. Дерево решений для модели эффективности ЭКО по сравнению с ЭКО/ПГС методом аCGH на 5-е сутки культивирования эмбрионов у пациенток ПРВ (36-39 лет).

На основании полученных данных, был разработан алгоритм дифференцированного назначения ПГС пациенткам различного возраста программ ВРТ. Пациенткам ПРВ 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 8).

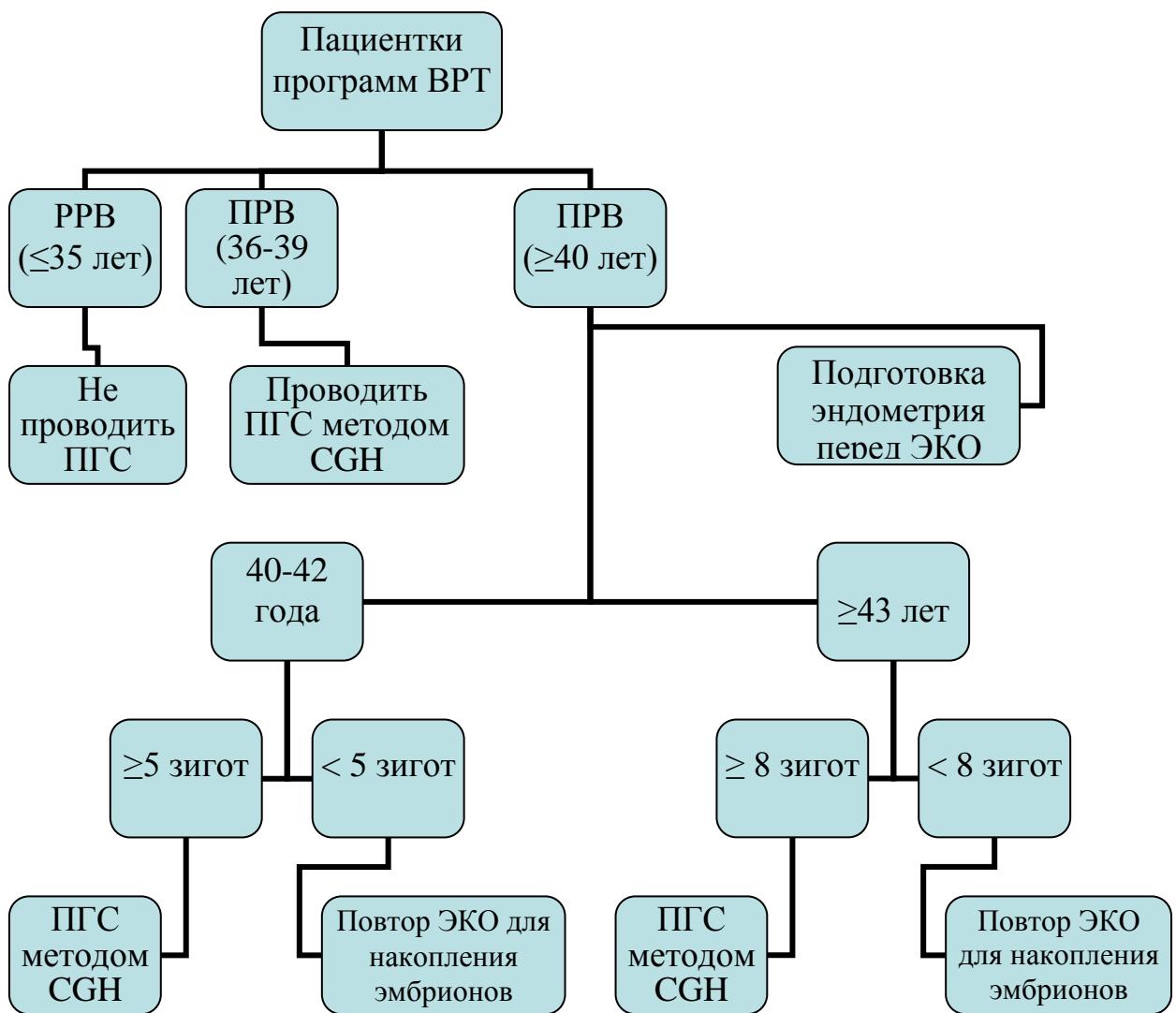


Рисунок 8. Алгоритм дифференцированного назначения ПГС пациенткам различного возраста программ ВРТ.

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 euploidных 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 CGH на 5-е сутки культивирования эмбрионов с исследованием трофэктомермы бластоцисты. Шансы наступления беременности и живорождения при применении ПГС методом

aCGH 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 aCGH 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 aCGH 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 ≥ 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 ≥ 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Клинико-экономический анализ эффективности преимплантационного генетического скрининга у пациенток позднего репродуктивного возраста / Долгушина Н.В., Коротченко О.Е., **Бейк Е.П.**, Абдурахманова Н.Ф., Ильина Е.О., Кулакова Е.В. // **Акушерство и гинекология.** - 2017. - № 11. - С. 56-61.
2. Дифференцированное применение преимплантационного генетического скрининга у пациенток с привычным невынашиванием беременности в анамнезе / Коротченко О.Е., **Бейк Е.П.**, Гвоздева А.Д., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. // Материалы XII Международного конгресса по репродуктивной медицине. – М., 2018. - С.441-442.
3. Роль преимплантационного генетического скрининга в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста / **Бейк Е.П.**, Коротченко О.Е., Гвоздева А.Д., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. // **Акушерство и гинекология.** - 2018. - № 4 - С. 78-84.

4. Эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста / **Бейк Е.П.**, Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. // **Гинекология.** - 2018. – Т. 20, № 1 - С. 109-112.

5. Поиск маркеров персонального «окна имплантации» у женщин в программе экстракорпорального оплодотворения с помощью определения транскрипционного профиля генов / Бурменская О.В, Боженко В.К., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Корнеева И.Е., Межеветинова Е.А., Донников А.Е., **Бейк Е.П.** // **Акушерство и гинекология.** - 2017. - № 5 - С. 72-80.