

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

На правах рукописи

КОРОЛЬКОВА
Анна Игоревна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ
РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У ПАЦИЕНТОК ПОЗДНЕГО
РЕПРОДУКТИВНОГОВОЗРАСТА НА ОСНОВАНИИ ОЦЕНКИ
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА И
ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА
ЭМБРИОНОВ**

14.01.01. - акушерство и гинекология

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Научные руководители:
доктор медицинских наук Мишиева Н.Г.
доктор биологических наук Трофимов Д.Ю.

Москва 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. Проблемы реализации репродуктивной функции в группе пациенток старше 35 лет (обзор литературы).	11
1.1. Медико-социальные аспекты репродуктивного здоровья пациенток старших возрастных групп	11
1.2. Возрастное снижение репродуктивного потенциала	15
1.3. Возрастное снижение качества ооцитов и хромосомные aberrации.	19
1.4. Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А) эмбрионов	24
1.5. Митохондриальный потенциал ооцитов и эмбрионов	27
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования	38
2.1. Дизайн исследования	38
2.2. Критерии включения, невключения и исключения	40
2.3. Определение бѐма выборки	42
2.4. Методы исследования	43
2.4.1. Общеклинические методы исследования	46
2.4.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза	47
2.4.3. Гормональное исследование пациенток	48
2.4.4. Исследование эякулята партнеров	48
2.4.5. Протокол программы ЭКО	49
2.4.6. Эмбриологический этап в программе ЭКО с ПГТ-А	51
2.4.7. Преимплантационный генетический тестирование на анеуплоидии	53
2.4.8. Определение копийности мтДНК в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы	54
2.4.9. Подготовка эндометрия для переноса размороженных эмбрионов	55
2.4.10. Ведение посттрансферного периода и диагностика наступления беременности	56
2.5. Статистическая обработка полученных данных	56
ГЛАВА 3. Результаты исследований	58

3.1. Клинико-anamнестические данные пациенток позднего репродуктивного возраста	58
3.2. Данные лабораторных исследований пациенток	63
3.3 Особенности лечения в программе ЭКО с ПГТ-А у пациенток позднего репродуктивного возраста	64
3.4 Характеристика оогенеза и раннего эмбриогенеза	64
3.1.1. Клинико-anamнестические данные исследуемых групп	66
3.2.1. Данные лабораторных исследований пациенток в когортах исследуемых групп	72
3.3.1. Особенности лечения в программе ЭКО с ПГТ-А у пациенток позднего репродуктивного возраста в когортах исследуемых групп	73
3.4.1 Характеристика оогенеза и раннего эмбриогенеза возрастных групп	74
ГЛАВА 4. Эффективность программ ЭКО в зависимости от копийности мтДНК в клетках кумулюса и трофэктодермы	76
4.1. Изучение копийности митохондриальной ДНК в кумулюсных клетках, полученных из ооцит-кумулясных комплексов пациенток позднего репродуктивного возраста	76
4.2 Анализ эффективности программ ЭКО на основании определения копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов	80
ГЛАВА 5. Обсуждение полученных результатов	89
ВЫВОДЫ	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106
ПРИЛОЖЕНИЕ	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Реализация репродуктивной функции у пациенток позднего репродуктивного возраста - один из наиболее сложных и нерешенных вопросов в области репродуктивных технологий. В последние годы резко увеличилось число женщин старше 35 лет, обращающихся для лечения бесплодия.

Пациентки позднего репродуктивного возраста имеют ряд особенностей, усложняющих реализацию репродуктивной функции. Основной из которых является снижение овариального резерва у женщин старше 35 лет, после 40 лет скорость атрезии фолликулов увеличивается вдвое [1,2]. Также эта группа женщин часто имеет отягощенный гинекологический анамнез. И даже при нормальном овариальном резерве риск анеуплоидии ооцитов и, в последующем, эмбрионов увеличивается, что также снижает вероятность наступления беременности у пациенток старше 35 лет [3].

Оценка качества эмбрионов является ключевой составляющей успеха в программах ВРТ. Существующие методы селекции эмбрионов основаны на детальной морфологической, а также генетической оценке эмбрионов при помощи преимплантационного генетического скрининга (ПГС). Однако эффективность программ ВРТ составляет около 50-60% на цикл переноса размороженных эмбрионов [4]. Поэтому, необходимы дополнительные методы идентификации жизнеспособных эмбрионов. В этой связи большое значение в последние годы придается митохондриальному потенциалу гамет и эмбрионов.

Митохондрии участвуют в регуляции многих важных процессов, таких как апоптоз, синтез аминокислот, гомеостаз кальция и генерация энергии в

виде АТФ путем процесса окислительного фосфорилирования. Митохондриальная ДНК (мтДНК) играет прямую роль в клеточном метаболизме. Ранние эмбрионы человека характеризуются отсутствием репликации мтДНК. Их энергетический потенциал определяется исключительно функциональной компетентностью митохондрий ооцитов. Возобновление транскрипции мтДНК у эмбриона человека начинается одновременно с активацией собственного генома, что соответствует 72 часам после оплодотворения. Полноценная репликация мтДНК начинается в период преимплантационного развития на стадии бластоцисты, когда эмбрионы требуют адекватных уровней энергии для успешного деления. Существующие данные свидетельствуют о том, что правильная функция митохондрий ооцитов имеет определяющее значение на ранних этапах эмбриогенеза [5,6,7].

Таким образом, нарушение процессов накопления энергии в клетке, вследствие дезорганизации работы митохондрий, может быть одним из возможных патогенетических механизмов сниженного потенциала развития эмбрионов. Изучение числа копий мтДНК в кумулюсных клетках (КК) и клетках трофэктодермы (ТЭ) позволит оценить качество ооцитов и эмбрионов, и оптимизировать исходы программ ВРТ в различных группах пациентов, в том числе в группе пациенток позднего репродуктивного возраста.

В связи с вышеизложенным, **целью** исследования является: повышение эффективности лечения бесплодия у пациенток позднего репродуктивного возраста в программах ВРТ путем переноса эуплоидных эмбрионов с нормальным митохондриальным потенциалом.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Изучить клинико-лабораторные и эмбриологические факторы эффективности программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста.

2. Оценить связь копийности митохондриальной ДНК (мтДНК) в кумулюсных клетках у пациенток, вошедших в исследование, с возрастом и овариальным резервом, качеством полученных ооцитов, морфологической оценкой и плоидностью эмбрионов.
3. Выявить связь уровня мтДНК в трофэктодерме эмбрионов с возрастом, овариальным резервом пациенток, а также исследовать копийность мтДНК в трофэктодерме в зависимости от плоидности и качества эмбрионов у пациенток позднего репродуктивного возраста.
4. Изучить выявленные корреляционные связи (из задач № 2 и № 3) для определения порогового возраста изменения митохондриального биогенеза.
5. Провести анализ эффективности программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста при переносе эуплоидных эмбрионов с нормальным митохондриальным потенциалом.
6. На основании полученных данных разработать алгоритм ведения пациенток позднего репродуктивного возраста в программах ВРТ с ПГС методом сравнительной геномной гибридизации и применением оценки митохондриального потенциала эмбрионов.

Научная новизна исследования

В настоящей работе представлены клинико-анамнестические и лабораторные данные пациенток позднего репродуктивного возраста, при исследовании которых были определены факторы риска неудач программ вспомогательных репродуктивных технологий данной когорты пациенток. На основании результатов преимплантационного генетического тестирования эмбрионов, был определен пороговый возраст пациенток, при превышении которого значительно снижалась доля эуплоидных эмбрионов и, соответственно, частота наступления беременности и живорождения. Также, изучен митохондриальный потенциал ооцитов и эмбрионов путем

определения уровня мтДНК в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы. В ходе данного этапа исследования были получены новые важные результаты, свидетельствующие о связи копийности мтДНК в клетках кумулюса и трофэктодермы бластоцист с возрастом и овариальным резервом пациенток, а также уровня мтДНК в трофэктодерме с плоидностью и имплантационным потенциалом эмбрионов.

Данные результаты позволили определить эффективность использования полногеномного генетического скрининга методом сравнительной геномной гибридизации на микрочипах в сочетании с определением уровня мтДНК в клетках трофэктодермы для повышения частоты наступления беременности в программах ВРТ у женщин позднего репродуктивного возраста.

Практическая значимость исследования

На основании полученных данных выявлены факторы риска снижения эффективности программ ЭКО с преимплантационным генетическим тестированием на анеуплоидии, а также разработан и внедрен в клиническую практику алгоритм ведения пациенток позднего репродуктивного возраста в программах ВРТ на основании переноса эуплоидных эмбрионов в зависимости от уровня мтДНК в трофэктодерме бластоцист для повышения эффективности лечения бесплодия в данной когорте пациенток.

Положения, выносимые на защиту

1. Среди когорты пациенток старше 35 лет, возраст 39 лет является пороговым, выше которого происходит значимое снижение эффективности программ ЭКО, в том числе с проведением преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии, что выражается в увеличении

доли анеуплоидных эмбрионов в 2,3 раза, снижении частоты наступления беременности в 3,3 раза, и частоты живорождения в 4,8 раза по сравнению с пациентками до 39 лет.

2. Снижение копийности мтДНК в кумулюсных клетках ассоциировано с пороговым возрастом старше 39 лет и уровнем АМГ менее 1 нг/мл, что свидетельствует о снижении овариального резерва. Низкая копийность мтДНК и митохондриальный потенциал кумулюсных клеток не является определяющим фактором в развитии анеуплоидий.

3. Определение копийности мтДНК в трофэктодерме бластоцисты в совокупности с проведением преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии, является надежным методом селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом, позволяющим увеличить эффективность лечения бесплодия в программах ЭКО. Пороговое значение копийности мтДНК в ТЭ, превышение которого, позволяет прогнозировать неудачу имплантации является 0,004 о.е. Пациентки старше 39 лет имели в 4,1 раза большее число эуплоидных бластоцист с надпороговым уровнем мтДНК в трофэктодерме, т.е. эмбрионов с низким имплантационным потенциалом, по сравнению с пациентками в возрасте до 39 лет.

Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовала в выборе темы диссертационной работы, поиске и мониторинге данных литературы по теме диссертации, определении целей и задач исследования, разработке индивидуальной анкеты для сбора анамнеза и добровольного информированного согласия на проведение исследования, изучении анамнеза, результатов клиничко-лабораторного обследования пациенток. Автор лично принимала участие в ведении пациенток, включенных в исследование, на всех этапах программ ЭКО с ПГТ-А и программ переноса

размороженных эмбрионов. Автор лично участвовал в сборе материала, получении, анализе и интерпретации экспериментальных данных, их обобщении и статистической обработке, также автор осуществляла подготовку публикаций по выполненной работе.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Апробация работы

Основные положения диссертации и результаты работы доложены на XII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (г. Москва, ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ, 6–19 января 2018), и 35th Annual Meeting of ESHRE (Vienna, Austria, 23-26 June 2019), .

Работа обсуждена на межклинической конференции сотрудников 1 гинекологического отделения (20.06.2019г.) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (02.09.2019г., протокол № 9).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практическую работу 1 гинекологического отделения и лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 8 научных трудов, из которых 4 статьи – в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 115 страницах, состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа содержит 11 рисунков, 29 таблиц. Список литературы включает 92 работы, в том числе 17 отечественных и 75 работ зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ПРОБЛЕМЫ РЕАЛИЗАЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ В ГРУППЕ ПАЦИЕНТОК СТАРШЕ 35 (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Медико-социальные аспекты репродуктивного здоровья пациенток старших возрастных групп

Фертильность представляет собой естественную способность иметь потомство и измеряется с использованием коэффициента рождаемости, то есть число живорожденных детей на 1000 женщин. В демографическом или социально-экономическом контексте рождаемость измеряется с помощью общего индекса рождаемости, который представляет собой общее число детей на одну женщину в течение всей ее жизни [8]. Учитывая данные демографического прогноза воспроизводства населения и рождаемости РФ существует угроза сокращения численности женщин репродуктивного возраста на 23,9% [9]. Хорошо известно, что способность женщины реализовать свою репродуктивную функцию строго зависит от ее возраста. Пик рождаемости приходится на период от 20 до 30 лет, уменьшаясь в последующих десятилетиях. При этом отмечается резкое снижение фертильности после 35 лет, а после 40 лет скорость атрезии фолликулов увеличивается вдвое [1,2]. Статистический анализ рождаемости, проведенный Smith et al. показал, что 38 лет является пограничным возрастом, при достижении которого, частота живорождения снижается в два раза по сравнению с этим показателем у женщин моложе 35 лет [1]. Однако в последние годы отмечается резкое увеличение числа женщин позднего репродуктивного возраста, желающих реализовать свою репродуктивную функцию. Так, по данным Dyer et al. (2016), Centers for Disease Control and Prevention (National Summary Report, США, 2014) около 20% циклов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ)

выполнялись среди женщин в возрасте 35-37, 19%- среди женщин в возрасте 38-40 лет, 11% -в возрасте 41-42 года, 5% среди женщин в возрасте 43-44 лет и 1% среди женщин старше 44 лет [10,11]. По данным отечественных авторов общая доля пациенток позднего репродуктивного возраста (старше 35 лет) составляет около 40%, с тенденцией к увеличению данной группы женщин, обращающихся в клиники ВРТ для лечения бесплодия [2]. По результатам статистических данных Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (European Society of Human Reproduction and Embryology – ESHRE, 2017) процент пациенток клиник ВРТ в возрасте 35-39 лет составляет приблизительно 36%, в возрасте 40 лет и старше- 17% [12].

Тенденция роста данной группы пациенток связана с инверсией социального положения женщин в большинстве стран мира. Так, получение высшего образования, карьерный рост, достижение финансовой независимости и общественного статуса становятся приоритетными целями современных женщин, что приводит к отсроченному деторождению. В век глобализации изменено отношение к браку в целом, что проявляется в увеличении возраста вступления в брак и высокой частотой разводов. При этом повторный брак является одной из основных причин обращения в центры ВРТ женщин старшего возраста и составляет 42% [13]. Также в 40% случаев имеет место длительное неэффективное лечение бесплодия в течение 10 лет и более, что приводит к увеличению числа пациенток позднего репродуктивного возраста. Кроме того, 5% составляют женщины, потерявшие единственного ребенка [13].

Однако реализация репродуктивной функции с возрастом имеет ряд сложностей. Например, по данным Российской Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ, отчет за 2015г) частота наступления беременности в программах ЭКО в группе пациенток 35 – 39 лет составляла 29,8%, в программах ICSI- 27,7%, в то время как в группе пациенток 34-х лет и моложе - 35,9% и 33,8% соответственно [14]. Частота наступления

беременности в группе женщин ≥ 40 лет была ниже в 2 раза, в программах ЭКО составляла 14,1%, в программах ICSI - 14,4%. Кроме того, закономерно наблюдалось снижение частоты родов в программах ЭКО и ICSI в группе 35-39 лет (20,9% и 20,1%) по сравнению с группой пациенток ≤ 34 лет (27,2% и 25,3%). Частота завершения беременностей родами в группе ≥ 40 лет была в 3 раза ниже и составляла 8,2% и 8,4% соответственно. Стоит отметить, что при использовании программы ЭКО в криоцикле частота наступления беременности во всех возрастных группах была выше, чем в «свежем» цикле [14]. Схожие данные были получены по результатам отчета ESHRE у пациенток в возрасте 35-39 лет показатели наступления беременности при проведении программ ЭКО составили 25,2%, в программе ICSI-24,4%, в возрасте ≤ 34 лет- 29,6% и 29,3%, соответственно. Частота наступления беременности в возрастной группе 40 лет и старше также была в 2 раза ниже (13,5% и 12,6%). Показатели живорождения для группы пациенток в возрасте 35-39 лет составили 18,1% при проведении программ ЭКО, ICSI- 16,6%. В возрастной группе ≤ 34 лет- 22,7% и 21,7%, соответственно. Коэффициент рождаемости в возрастной группе ≥ 40 лет после проведения программ ЭКО, составила 8,1%, после проведения программ ICSI- 6,7%, что также в 3 раза ниже показателей живорождения по сравнению с более молодыми возрастными группами [12]. Частота живорождения по результатам исходов программ ЭКО, опубликованным Управлением по Оплодотворению и Эмбриологии человека (Human Fertilization and Embryology Authority, HFEA): 12,7%-для 40-42 лет, 5,1% для 43-44-летнего возраста и 1,5% для женщин в возрасте 45 лет и старше [15]. Стоит отметить, что близкие по значению результаты были получены Centers for Disease Control and Prevention (National Summary Report, США, 2014). Кроме того, в национальном отчете США процент наступления беременности и родов в старшей возрастной группе практически не увеличивался с течением времени: 11,6 и 6,5% в 2008 г., 13,5 и 7,5% в 2009 г., 11,7 и 6,6% в 2010 г. [11]. Данные, полученные в 2014 году Обществом

по вспомогательным репродуктивным технологиям США (SART) показали незначительное увеличение циклов ЭКО у женщин старше 42 лет с собственными ооцитами, по сравнению с 2013 годом, 8,4% и 6,6% соответственно [16]. Низкие показатели программ ЭКО с собственными клетками у данной группы пациенток отражают резистентность к лечению бесплодия. Скептицизм по поводу использования аутологичных ооцитов в возрасте старше 42 лет понятен, учитывая, что показатели живорождения по данным SART варьируются от 1% до 2%, а по данным Американского Общества Репродуктивной Медицины (ASRM)- менее 1% [16]. Поскольку низкий коэффициент рождаемости считается нерентабельным, женщинам в возрасте старше 42 лет часто отказывают в проведении программы ЭКО за счет средств страховых компаний или государства.

Представленные данные наглядно показывают, что эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у женщин в возрасте до 35 лет гораздо выше, чем в позднем репродуктивном возрасте.

Основные причины снижения эффективности программ ВРТ в группе пациенток позднего репродуктивного возраста условно можно разделить на «ооцит-независимые» и «ооцит-зависимые» [17].

К «ооцит-независимым» факторам относятся отягощенный соматический или гинекологический анамнез. Имплантация эмбриона, децидуальная трансформация и плацентация напрямую зависят от состояния эндометрия. Доказана роль гипоксических процессов в эндометрии женщин старшего репродуктивного возраста, в связи с чем наблюдается тенденция к компенсаторной плацентарной гипертрофии [16]. Кроме того, зачастую у пациенток старшего репродуктивного возраста встречаются такие патологические состояния как эндометриоз (наружный генитальный эндометриоз, аденомиоз), а также гиперпластические процессы в эндометрии и миома матки.

В зависимости от размера эндометриоидных кист яичников и состояния овариального резерва пациентки определяется тактика лечения

бесплодия. При кистах диаметром до 3 см, стоит отказаться от хирургического лечения, с целью сохранения овариального резерва [2]. Аналогичной тактике стоит придерживаться при обнаружении миом матки малых размеров, не деформирующих ее полость, так как через 8-12 месяцев после проведенного оперативного вмешательства отмечается снижение овариального резерва [2].

Кроме того, стоит учитывать накопленные с возрастом соматические заболевания. Доля пациенток с экстрагенитальными заболеваниями составляет 24,8% в возрасте 35-39 лет, в 40 лет и старше - от 44,9% до 79,8%. Среди них важное значение для исходов программ ВРТ имеет нарушение жирового обмена, сахарный диабет 2 типа, а также патология сердечно-сосудистой системы, в том числе гипертоническая болезнь [18].

Однако, несомненно, ведущими причинами снижения эффективности программ ВРТ у женщин старшего возраста являются «ооцит-зависимые» факторы, к которым относится снижение овариального резерва, качества ооцитов и, как следствие, эмбрионов [19].

1.2 Возрастное снижение репродуктивного потенциала

Собственно, уменьшение числа ооцитов — это непрерывный процесс, который начинается сразу же после создания пула во время внутриутробного развития плода. Известно, что приблизительно на двадцати недельном сроке беременности яичники плода женского пола содержат около 6-7 миллионов ооцитов, однако это число неуклонно снижается. При рождении остается в общей сложности 1-2 миллиона ооцитов, к периоду полового созревания — 300000 - 500000 клеток [1]. Однако в репродуктивном возрасте овулирует приблизительно 500 ооцитов, в то время как остальные клетки подвергаются апоптозу. Соответственно у женщин в перименопаузе остается несколько сотен (750-1000) ооцитов [20]. С потерей фолликулярного пула яичников у женщин наблюдается

укорочение менструального цикла, бесплодие и, наконец, менопауза. Изменения регулярности цикла наблюдаются примерно за 6-10 лет до начала менопаузы [21].

По данным зарубежных авторов после 35 лет регистрируется первое статистически значимое повышение базального уровня ФСГ, ассоциированное с уменьшением общего числа фолликулов: уровень ингибина В, секретлируемого антральными фолликулами, снижается, и по принципу отрицательной обратной связи повышается базальный уровень ФСГ. Кроме того, уменьшение секреции ингибина В приводит к более быстрой селекции доминантного фолликула, овуляция происходит раньше, фолликулярная фаза цикла у женщин позднего репродуктивного возраста сокращается. При этом авторы отмечают, что продолжительность лютеиновой фазы не претерпевает существенных изменений, и укорочение менструального цикла происходит преимущественно за счет фолликулярной фазы [22].

Таким образом, для определения тактики лечения бесплодия, прогнозирования исходов программ ВРТ, общей функциональной оценки репродуктивной системы необходимо определить состояние овариального резерва пациенток позднего репродуктивного возраста. Известно, что маркерами овариального резерва является возраст, регулярность менструального цикла, уровни ФСГ, АМГ, объем яичников и количество антральных фолликулов (КАФ) в них [2]. На сегодняшний день отечественные и зарубежные авторы отмечают важное значение определения уровня АМГ как маркера возрастного снижения овариального пула, наиболее точно прогнозирующего угасание функции репродуктивной системы [2, 23]. В ряде исследований отмечалось, что наиболее чувствительным маркером снижения пула антральных фолликулов является АМГ, концентрация которого первой начинает снижаться, так у пациенток старшего репродуктивного возраста, даже при наличии нормальных значений ингибина В и ФСГ, в 28% случаев отмечается снижение АМГ [2].

Антимюллеров гормон (АМГ) представляет собой димерный гликопротеин надсемейства трансформирующего фактора роста- β (TGF- β), продуцируемого непосредственно гранулезными клетками преантральных и ранних антральных фолликулов диаметром до 5-6 мм [25]. Синтез АМГ впервые был описан почти 35 лет назад Hutson et al. [6]. Этот гормон определяется на 36-й неделе внутриутробного развития, постепенно снижается в период полового созревания, и не определяется в менопаузе [6]. Во время менструального цикла уровень АМГ в сыворотке меняется незначительно, соответственно измерение возможно в любой день цикла. Основная физиологическая роль АМГ, по-видимому, ограничивается ингибированием ранних стадий развития фолликулов и предотвращением рекрутирования не доминантных фолликулов [26]. АМГ используется в качестве маркера резерва яичников во многих странах с 2002 года, однако, сохраняется тактика возрастного ограничения лечения бесплодия за счет средств государства [1].

Так, некоторые скандинавские страны уже после 40-41 лет ограничивают возможность квотирования программ вспомогательных репродуктивных технологий [1]. Однако, по мнению Norbert Gleicher, Vitaly A Kushnir et al., показатели наступления беременности и живорождения в группе женщин позднего репродуктивного возраста выше, по сравнению с приведенными данными национальных обществ [16]. Авторы провели анализ исходов программ ЭКО 128 пациенток в возрасте $40,8 \pm 4,1$ года с крайне низким овариальным резервом (среднее ФСГ $15,7 \pm 11,1$ мМЕ / мл, среднее АМГ $0,2 \pm 0,1$ нг / мл). Несмотря на данные мировой литературы, авторы отметили более высокие показатели клинической и биохимической беременности, которые составили 7,9% от начала цикла (95% ДИ: 4,9-11,9) и 15,6% (95% ДИ: 9,8-23,1) по результатам трех циклов. Примечательно, что в данном исследовании возраст 43-х лет являлся пограничным возрастом наступления беременности, так пациентки в возрасте до 43 лет имели показатели беременности 14,3%, а в возрасте старше 43 - всего 3,4%. Таким

образом, клиническая беременность ($P = 0,013$) и коэффициент рождаемости ($P = 0,036$) были значительно ниже у женщин в возрасте старше 43 лет. Однако, несмотря на низкие показатели беременности и рождаемости в исследовании, приведенные результаты значительно превышали широко цитируемые 1-2% живорождения по данным SART и ASRM [16].

По данным ретроспективного исследования Weghofer et al. [27] коэффициент количества родов у пациенток 42 лет составил 1,7% за цикл. Причем показатель АМГ $\leq 0,4$ нг / мл являлся пограничным для наступления беременности. По результатам Łukaszuk et al., среди женщин с низким АМГ ($\leq 0,4$ нг / мл), которые прошли цикл ЭКО по “длительному” протоколу, было зафиксировано 5,6% клинической беременности и 2,8% живорождения в группе женщин старше 39 лет [28].

В исследовании Kedem A, Haas J et al. из 48 циклов пациенток в возрасте > 42 лет и уровнем АМГ $\leq 0,2$ нг / мл беременностей не наблюдалось. В том же исследовании у женщин с уровнем АМГ в диапазоне 0,2-1,0 нг/мл зарегистрировано 3 клинических беременности из 192 циклов (1,6%) [29].

Reicheman et al. обнаружили 3,9% случаев клинической беременности у женщин с АМГ $< 0,17$ нг/мл и > 42 года [30]. Seifer et al. провели самое крупное исследование в этой области, проанализировав концентрации АМГ более чем 5000 циклов из базы данных системы отчетов об итогах клинических исследований в области вспомогательных репродуктивных технологий за 2012-2013 гг. По их данным, пациентки с уровнем АМГ ниже 0,16 нг/мл имели наибольший риск отмены цикла ЭКО [31].

Важно отметить, что авторам не удалось установить определённый пороговый уровень АМГ, ниже которого беременность была бы исключена. Разница в результатах вышеприведенных исследований может быть частично объяснена применением различных методов оценки концентрации АМГ [26,31]. К сожалению, имеющиеся методы оценки не позволяют надежно предсказать исход лечения бесплодия у пациенток позднего

репродуктивного возраста с низкими значениями АМГ, особенно у женщин старше 42 лет. Однако, точная статистика исходов циклов ЭКО у женщин в позднем возрасте, имеет важное значение для принятия решения о возможности проведения лечения бесплодия с использованием собственных ооцитов, в том числе за счет средств страховых компаний или государства. Необходим комплексный подход для определения тактики ведения данной группы пациенток, с учетом известных маркеров в скрининговой оценке овариального резерва, однако, не стоит забывать о качестве ооцитов, которое прогрессивно снижается с возрастом. Соответственно важны исследования, позволяющие сначала оценить качественный состав гамет, затем выделить ключевые звенья возрастных изменений, с последующем нивелированием найденных патологических состояний.

1.3 Возрастное снижение качества ооцитов и хромосомные aberrации

Хромосомные аномалии могут возникать, как в процессе гаметогенеза, так и при аномалии оплодотворения, а также быть следствием нарушения митотического деления самого эмбриона. При этом изменения числа хромосом могут быть либо кратными, либо некратными гаплоидному набору.

Нарушение процесса оплодотворения приводит к таким численным нарушениям кратным гаплоидному набору, как триплоидия ($3n = 69$). Например, когда ооцит оплодотворяется двумя сперматозоидами- диандрия, или исходно в ооците имеет место лишний гаплоидный набор материдигиния. Также, встречаются численные хромосомные аномалии кратные гаплоидному набору, возникающие во время последовательного митотического деления эмбриона – тетраплоидия ($4n=92$). Например, возникновение полной тетраплоидии при нарушении первого клеточного деления, либо формирование мозаицизма на этапе второго митотического деления эмбриона после образования зиготы [32,33].

Численные хромосомные аномалии некратные гаплоидному набору или анеуплоидии возникают в результате нарушения сегрегации хромосом в митозе или в мейозе и являются одной из основных причин потерь беременности, нарушения развития плода, множественных неэффективных попыток экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), привычного невынашивания беременности (ПНБ) и врожденных дефектов. В основе механизма развития хромосомных патологий гамет лежат ошибки на различных стадиях мейоза, приводящие к патологическому расхождению хромосом [34,35].

Несомненно, эмбриональный набор хромосом напрямую зависит от хромосомного состава, как ооцита, так и сперматозоида, их морфологических и качественных характеристик. Однако наиболее важной составляющей возникновения генетических аномалий эмбриона является анеуплоидия именно женских половых клеток, в основе развития которой лежат два ключевых процесса нарушения мейотического деления: преждевременное расхождение хроматид и нарушение расхождения хромосом в анафазе I [36]. Возможно, это связано с тем, что ошибкам мейоза более подвержен оогенез, чем сперматогенез. В основе мейоза как женских, так и мужских половых клеток лежит репликация ДНК исходных клеток (оогонии, сперматогонии), затем происходит первое и второе мейотическое деление (мейоз I, II), которые приводят к образованию гаплоидных гамет. В профазе I происходит конъюгация, то есть каждая хромосома сближается с гомологичной, образуя бивалент. Точки соединения гомологичных хромосом (бивалентов) называются хиазмы. Затем происходит обмен идентичными участками хромосом – кроссинговер, в результате которого образуются новые комбинации генетического материала. В конце профазы дезинтегрирует ядерная оболочка и начинается образование веретен деления. В метафазе I биваленты, выстраиваясь в экваториальной плоскости, образуют метафазную пластинку, а к центромерам (точки соединения хромосом) бивалентов прикрепляются нити веретена деления.

Анафаза I начинается с расхождения гомологичных хромосом к разным полюсам клетки, при этом центромеры не делятся как при митозе, и, каждая хромосома состоит из двух неидентичных хроматид, образовавшиеся в результате кроссинговера. Соответственно, в результате мейоза I, разошедшиеся к противоположным полюсам веретена деления, гомологичные хромосомы образуют 2 гаплоидных набора с новыми генными комбинациями за счет неидентичных хроматид. Второе деление (мейоз II), по структуре сходно с митотическим делением. В профазе II формируются нити веретена деления, в ходе метафазы II образуется метафазная пластинка, нити веретена деления прикрепляются к центромерам хромосом. В анафазе II происходит разделение центромер хромосом, с расхождением сестринских хроматид к противоположным полюсам. В результате образуется четыре гаплоидные клетки, а каждая хромосома состоит из одной хроматиды.

Мейотическое деление в процессе сперматогенеза начинается с полового созревания, весь цикл занимает приблизительно 72 дня и продолжается в течение всей жизни мужчины. Кроме того, имеет место естественный процесс селекции генетически неполноценных гамет. По результатам различных методов исследования у здоровых мужчин частота обнаружения сперматозоидов, несущих хромосомную аномалию, варьируется от 1-2% до 10% [33,37,38]. Также, не выявлено статистически значимой корреляции между исходами программ ВРТ и возрастом мужчин, что нельзя сказать о роли возраста женщины. [33,39]. Во время сегрегации хромосом в анафазе выделяют такие критические моменты, как завершение репликации, выстраивание хромосом в экваториальной плоскости, прикрепление веретена деления. В процессе сперматогенеза при нарушении одного из этих процессов происходит блок дальнейшего цикла и элиминация всего клона анеуплоидных клеток [40].

Данные о частоте хромосомных aberrаций в процессе оогенеза приближительны, учитывая особенности созревания ооцитов и методы

исследования 1-гои 2-го полярных телец. Анализируя данные мировой литературы от 20-30% до 70% ооцитов преимущественно стадии МII имеют те или иные хромосомные аберрации [33,41]. Все исследователи сходятся во мнении о прямой связи между возрастом и долей спонтанной анеуплоидии ооцитов [37,38,39,41,42]

В отличие от сперматогенеза, который является непрерывным процессом, оогенез растянут во времени. В женском организме имеет место длительный интервал между началом мейоза, еще во время развития женского эмбриона, затем наступает длительный период покоя, и возобновлением мейоза уже в зрелом организме во время овуляторных циклов, а заканчивается созревание ооцита лишь при оплодотворении, когда завершается второе мейотическое деление. Изначально во время внутриутробного развития (приблизительно 12-13 неделя гестации) первичные женские половые клетки – оогонии активно делятся митозом, затем часть оогониев прекращает циклы митотического деления, и вступают в период роста, трансформируясь в ооциты [33]. Так, в первое мейотическое деление вступают примордиальные зародышевые клетки, затем происходит остановка мейоза на стадии профазы I. Таким образом, в отличие от мужского мейоза, при оогенезе за профазой не наступает метафаза. Возобновляется первое мейотическое деление в ооците под действием пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) при достижении полового созревания. При этом часть оогониев, а также ооцитов, находящихся в профазе I, постоянно подвергаются апоптозу, причина запрограммированной гибели клеток не выяснена. Однако, как было сказано выше, к рождению ребенка женского пола остается около 1-2 миллиона ооцитов, а к периоду полового созревания - 300 000-500 000 клеток, из которых овулирует приблизительно 500 ооцитов, остальные подвергаются апоптозу. Соответственно, у женщин имеется ограниченный пул незрелых клеток, который не обновляется и находится в длительном временном промежутке до созревания. По всей видимости, именно данный длительный

временной интервал является наиболее вероятной причиной частых хромосомных нарушений в ооцитах по сравнению со сперматозоидами. Кроме того, в процессе оогенеза первое мейотическое деление протекает независимо от дефектов формирования веретена деления или других патологических состояний, и селекции гамет с хромосомными аномалиями не происходит [43]. Механизм патологического расхождения хромосом (нерасхождение материнских хромосом, преждевременное расхождение хроматид) в течение мейоза женских гамет до конца не изучен. По данным одних авторов в основе лежат нарушения кроссинговера в профазе I, неверное расположение хиазм относительно центромера, нарушение образования веретена деления, аномальная связь сестринских хроматид посредством потери их когезиновых белков [44]. Другим возможным механизмом является нарушение ориентации и запаздывание одной из хромосом в анафазе I мейоза, соответственно хромосома не попадает в дочернюю клетку [45]. Также, авторы выделяют влияние исходного мозаицизма гонад, когда наряду с эуплоидными половыми клетками, присутствуют гаметы с анеуплоидным числом хромосом. Возникает гонадный мозаицизм при нарушении митоза на ранних этапах эмбриогенеза женского организма [46,47].

Кроме того, частота спонтанных хромосомных aberrаций в ооцитах прогрессивно увеличивается с возрастом женщины и составляет приблизительно более 50% ооцитов, завершивших первое мейотическое деление. [4,48,49]. Таким образом, большая часть не способна дать начало развитию жизнеспособных эмбрионов, хотя многие из этих ооцитов оплодотворяются и завершают второе мейотическое деление, сохраняя высокие показатели хромосомные aberrации [33].

В отечественной и зарубежной литературе описано, достаточно большое количество различных гипотез, объясняющих возрастное снижение качества ооцитов [50,51]. Согласно одной гипотезе качество ооцитов определяется на стадии эмбриогенеза, и в последующем ооциты, менее

подверженные нерасхождению хромосом, овулируют первыми, в то время как ооциты низкого качества овулируют в более позднем периоде жизни женщины [52]. Согласно другой гипотезе, с возрастом увеличивается частота воздействия таких повреждающих факторов, как окислительный стресс, нарушение микроциркуляции, гипоксические процессы в фолликулярной жидкости [53]. Также существует гипотеза неблагоприятного воздействия возрастных гормональных колебаний, ускоряющие процесс созревания ооцитов, что приводит к аномальной сегрегации хромосом. Многие исследования продемонстрировали, что возрастное снижение качества ооцитов ассоциировано с митохондриальной дисфункцией [7]. Предполагается, что мутации митохондриальной ДНК, накапливаясь с возрастом, способствуют увеличению количества свободных радикалов в то время, как синтез АТФ снижается. Соответственно, снижается активность АТФ-зависимых ферментов мейотического деления. Данные процессы более подробно будут рассмотрено в Главе 1.5.

1.4 Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А) эмбрионов

По данным зарубежных авторов Tsutsumi M., Fujiwar R. et al. (2014) уровень хромосомных аномалий среди диагностированных самопроизвольных выкидышей у женщин моложе 35 лет составляет около 50%, в то время как у женщин старше 35 лет - 75% [54]. Данные Lukaszuk K. et al. (2016), Gwo-Chin Ma et al. (2016) свидетельствуют о том, что у женщин старшего репродуктивного возраста до 80% эмбрионов анеуплоидны [3,20,55]. Учитывая высокую частоту анеуплоидий эмбрионов данной группы пациенток, можно сделать вывод, что ключевую роль для успешного исхода планируемой беременности в группе женщин позднего репродуктивного возраста играет выбор эмбриона для имплантации. Преимплантационный генетический скрининг (ПГС) или

преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ)- синонимичный термин, введенный в 2017г., позволяет осуществить селекцию эуплоидных эмбрионов, что, в свою очередь, повышает эффективность программ ЭКО в различных группах пациенток, в том числе и в группе пациенток позднего репродуктивного возраста [3,20,55-57]. Однако, несмотря на последние достижения в области молекулярно-генетических технологий, на сегодняшний день не существует единого мнения о преимущественном способе скрининга эмбрионов в циклах ЭКО и о селекции наиболее компетентных эмбрионов для переноса.

До недавнего времени в мире широко использовался метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), посредством которого преимплантационному скринингу подвергалось лишь ограниченное число хромосом (5-12) и частота ошибок составляла 5-15%, что зачастую приводило к неблагоприятным исходам беременности [56,57]. Современной альтернативой FISH является метод микроматричной сравнительной геномной гибридизации (Array Comparative Genomic Hybridization, aCGH), который позволяет протестировать все 23 пары хромосом (1-22, XY) одновременно, провести анализ множества генов и целых геномов. Установлено, что риск ложноположительного и ложноотрицательного результата при использовании aCGH не превышает 1% [3,20,55]. Помимо этого, в практику был введен метод высокопроизводительного секвенирования (New Generation Sequencing, NGS), показавший высокие диагностические результаты, в том числе повышение точности диагностики мозаичных анеуплоидий [20,55,58,59].

Zhihong Yang, James Lin и соавторы (2015), проведя сравнительный анализ данных методов, пришли к выводу, что NGS и aCGH сопоставимы по чувствительности и специфичности [56]. На первом этапе исследования в общей сложности 164 продукта полногеномной амплификации (WGA) подверглись анализу обоими методами. WGA продукты были получены от 38 пациенток в возрасте $35,2 \pm 3,4$ года после биопсии трофэктодермы (ТЭ)

бластоцист. По результатам исследования специфичность высокопроизводительного секвенирования составила 100% (95% ДИ:95,32%-100%), чувствительность 100% (95% ДИ:98,16%-100%). Таким образом, как положительная, так и отрицательная прогностическая значимость скрининга методом NGS составила 100%. Данные результаты сопоставимы с результатами скрининга методом сравнительной геномной гибридизации. Однако, метод aCGH в отличие от NGS не позволяет идентифицировать несбалансированные перестройки за границей разрешения (точечные мутаций, делеции и дупликации ниже границы чувствительности), а также ограничена возможность идентификации полиплоидии и мозаицизма низкого уровня (25-30%) [56]. На втором этапе исследования 172 пациентки (в возрасте $35,2 \pm 3,5$ лет) были рандомизированы на 2 группы. В первую группу (А) вошли эмбрионы 86 пациенток, исследованные методом высокопроизводительного секвенирования, во вторую группу (В) - эмбрионы 86 пациенток, которым провели скрининг методом сравнительной геномной гибридизации. По результатам данного этапа исследования не было существенных различий в частоте наступления клинической беременности между группами А и В (75,9% vs 71,8%, соответственно, $p > 0,05$), а также в показателях прогрессирующей беременности (74,7% vs 69,2%, соответственно $> 0,05$). Кроме того, не было никаких существенных различий в частоте прерывания беременности между группами А и В (1,3% и 2,6%, соответственно, $p > 0,05$) [56].

Позднее Łukaszuk et al. (2016) в своем исследовании, целью которого было изучение связи возраста женщин с частотой и типом анеуплоидий на основании результатов ПГС, подтвердил высокую специфичность и чувствительность высокопроизводительного секвенирования, в том числе в отношении обнаружения мозаицизма и несбалансированных перестроек [3]. По результатам первого этапа исследования трофэктодермы 198 бластоцист женщин различных возрастных групп (<31 , 31-35, 36-38, 39-40 и > 40),

значительное увеличение частоты анеуплоидий наблюдалось в возрасте 39 лет и старше. Соответственно, по мнению авторов, 38 лет является пограничным возрастом, при достижении которого резко снижается эффективность лечения бесплодия. На втором этапе исследования в 29% случаев были обнаружены единичные моносомии, в 22%- единичные трисомии, а также в 25% случаев- другие аномалии, такие как двойные моносомии и трисомии.

Yang Z, Liu J et al. (2013) показали аналогичные результаты, используя метод aCGH. В 36% случаев были обнаружены единичные моносомии, 21% составили единичные трисомии и в 29%-двойные моносомии и трисомии [60]. Результаты Yang Z. сильно отличались в количестве обнаруженных комплексных анеуплоидий - 14,7% против 23,9% в исследовании Łukaszuk et al. (2016). Тем не менее, после исключения комплексных нарушений, считающихся нарушениями митотического происхождения, частота единичных и двойных анеуплоидий в исследовании Łukaszuk et al. (2016) составила 66,3%-67,4, по сравнению с результатами, полученными в исследовании Yang Z, Liu J et al. (2013) - 32,5-33,7%, соответственно. Различия в обнаружении комплексных хромосомных аномалий могут быть результатом особенностей проведения данных методик.

Таким образом, нет сомнений, что в ближайшем будущем метод NGS будет введен в широкое практическое использование в силу его преимуществ.

1.5 Митохондриальный потенциал ооцитов и эмбрионов

В настоящее время в мировой литературе широко обсуждается вопрос о роли копийности митохондриальной ДНК ооцитов и бластоцист, как дополнительного метода селекции жизнеспособных эмбрионов.

Митохондрии являются цитоплазматическими двухмембранными органеллами эукариотических клеток, имеющими свою собственную ДНК.

Митохондриальная ДНК (мтДНК) представляет собой двухцепочечный циркулярный геном, который составляет приблизительно 16,6kb и находится в митохондриальном матриксе. Митохондриальная ДНК кодирует основные белки цепи переноса электронов, которая генерирует подавляющее большинство клеточного АТФ путем окислительного фосфорилирования (OXPHOS) [7,61].

Митохондрии состоят из внешней и внутренней мембраны, межмембранного пространства и матрикса, который ограничивает внутреннюю мембрану. Внешняя мембрана более гладкая, внутренняя образует многочисленные гребневидные складки, формирующие кристы, тем самым увеличивая площадь. Ферментные комплексы, которые осуществляют перенос электронов и синтез аденозинотрифосфата (АТФ) располагаются во внутренней мембране. Ферменты цикла Кребса (цикла трикарбоновых кислот), цикла мочевины, белок-синтезирующий аппарат и митохондриальная ДНК локализуются в матриксе. В межмембранном пространстве располагаются ферменты антиоксидантной защиты (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза) и компоненты дыхательной цепи (цитохром С, проапоптогены). Митохондрии являются единственными органеллами, имеющими свою собственную ДНК. Митохондриальная ДНК человека состоит из тяжелой (H) и легкой (L) – цепей, различающихся по нуклеотидному составу, и включает 37 структурных генов, участвующих в процессе выработки энергии в дыхательной цепи. Из них 13 кодируют субъединицы комплексов окислительного фосфорилирования, 22- синтез транспортных РНК (тРНК) и 2-синтез большой субъединицы рибосом, 16S рибосомальной РНК (рРНК), и малой, 12S рРНК. Остальные белки дыхательных комплексов кодируются ядерным геномом и при помощи транспортной системы поставляются в митохондрии (Рисунок 1).

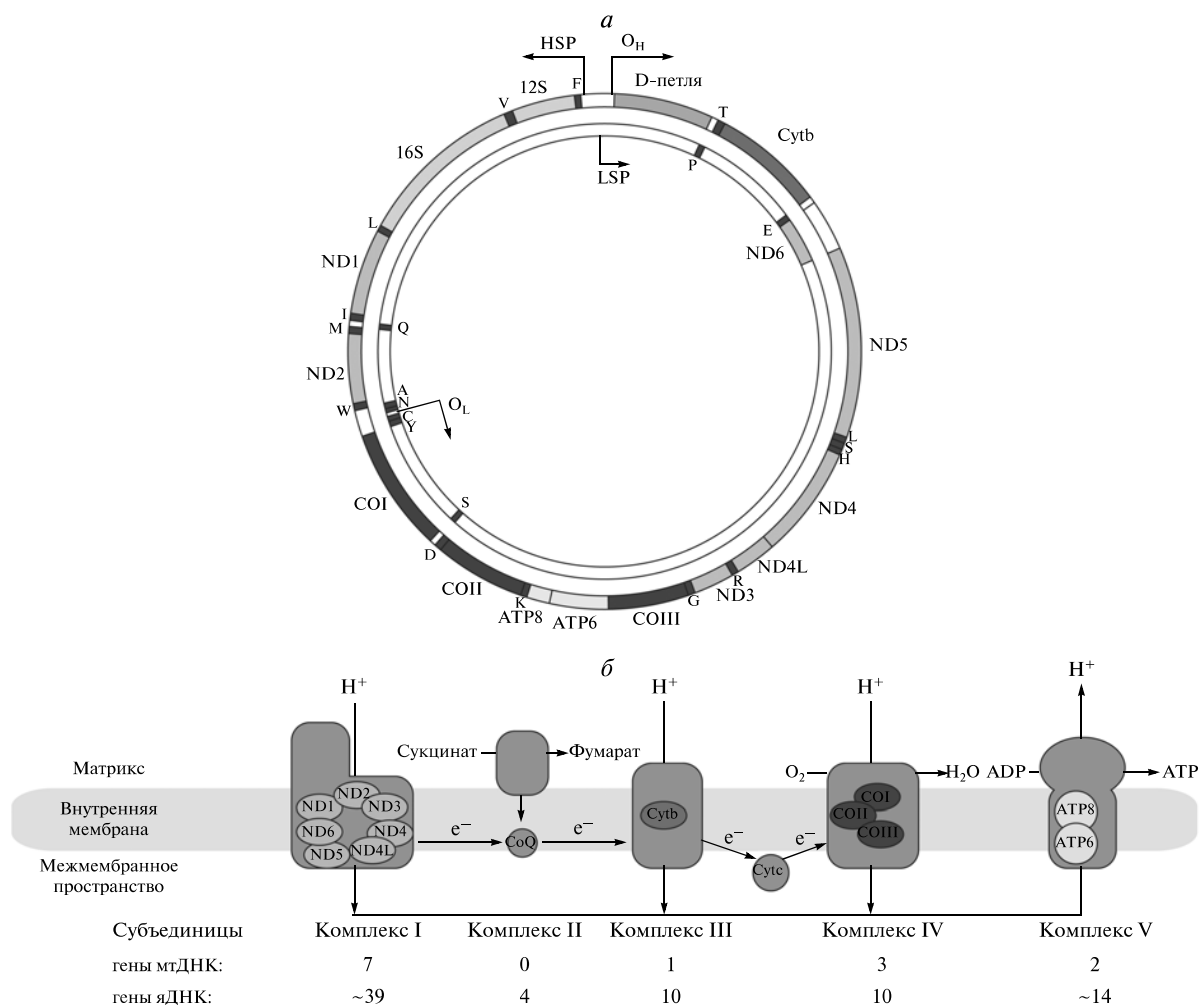


Рисунок 1. Схема человеческого митохондриального генома (*a*) и окислительного фосфорилирования (*б*). Геном включает 37 генов, из них 13 (*ND1–ND6*, *ND4L*, *Cytb*, *COI–COIII*, *ATP6*, *ATP8*)-кодируют субъединицы комплексов окислительного фосфорилирования, 2 гена (*12S* и *16S*) – рРНК, 22 гена (заглавные английские буквы) – тРНК. D петля – трехцепочечный участок контрольного региона мтДНК, который образуется в процессе репликации, в нём находятся точки инициации транскрипции тяжелой (HSP) и легкой (LSP) цепи и точка инициации трансляции тяжелой цепи (OH). Точка инициации трансляции легкой цепи (OL) находится вне контрольного региона. Система окислительного фосфорилирования включает пять комплексов: комплекс I состоит из 46 субъединиц (семь кодируются мтДНК и 39-яДНК); комплекс II состоит из четырех субъединиц (яДНК); комплекс III-из 11 субъединиц (одна-мтДНК и 10 -яДНК); комплекс IV - из 13 субъединиц (три-мтДНК и 10-яДНК); комплекс V -из 16 субъединиц (две-мтДНК и 14-яДНК); и два специфических переносчика электронов, CoQ и Cytc. По мере движения электронов по дыхательной цепи, протоны переносятся из матрикса в межмембранное пространство комплексами I, III и IV, а затем, через комплекс V, возвращаются в матрикс. Комплекс V синтезирует ATP из ADP [62].

Основной функцией митохондрий является синтез молекул аденозинтрифосфата (АТФ), то есть генерация клеточной энергии путем окисления органических субстратов и фосфорилирования аденозиндифосфата (АДФ). Также, данные органеллы регулируют кальциевый гомеостаз, соответственно, контролируют клеточный метаболизм, пролиферацию и процессы апоптоза как в соматических, так и в половых клетках.

Энергия в форме АТФ образуется в митохондриях в процессе тесно взаимосвязанных реакций, протекающих в цикле трикарбоновых кислот и дыхательной цепи. Восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДН) и восстановленный флавинадениндинуклеотид (ФАДН₂), образующиеся в цикле Кребса, поставляют электроны на ферменты дыхательной цепи (комплексы дыхательной цепи I-V). Комплексы I и II обеспечивают перенос электронов на кофермент Q10, далее электроны последовательно переходят на комплекс III, цитохром C, комплекс IV и до конечного звена- кислорода. Одновременно происходит выкачивание положительно заряженных протонов из митохондриального матрикса, вследствие чего создается электрохимический протонный градиент на внутренней мембране митохондрий, который, в свою очередь, активирует комплекс V (H⁺-АТФ-синтетаза), обеспечивающий синтез АТФ из АДФ [26, 63].

Кроме того, в процессе реакций дыхательной цепи образуется незначительное количество супероксидного радикала. Предполагается, что данная активная форма кислорода (АФК) является побочным продуктом дыхательных комплексов. В митохондриях с сохраненной функциональной активностью и компетентной антиоксидантной системой происходит предотвращение повреждения элементов митохондрий, которые особенно подвержены воздействию свободных радикалов, то есть липидов, белков, окислительно-восстановительных ферментов и, что особенно важно, мтДНК. Однако с возрастом эффективность антиоксидантной системы

снижается, и формируется дисбаланс между энергопродуцирующей функцией митохондрий и образованием АФК, что может лежать в основе дисфункции митохондрий и накопления мутаций в мтДНК. Собственно, данный дисбаланс приводит к широко обсуждаемому процессу окислительному стрессу [63,64,65].

Патологическое действие окислительного стресса состоит из активации перекисного окисления липидов с последующим повреждением клеточных и митохондриальных мембран. Вследствие чего повышается их проницаемость и увеличивается уровень внутриклеточного и внутри митохондриального Ca^{2+} . В свою очередь повышение концентрации Ca^{2+} приводит к разобщению процессов окислительного фосфорилирования и клеточного дыхания, что приводит к элевации количества коферментов и субстратов в восстановленной форме, а также создаются условия для дополнительной генерации АФК. В итоге окислительный стресс запускает интенсивный распад фосфолипидов клеточных и митохондриальных мембран, приводит к открытию неспецифического канала, проходящего через обе митохондриальные мембраны. Открытие данной митохондриальной поры нивелирует электрохимический градиент и снижает синтез АТФ. Предполагается, что данный механизм играет важную роль в основе возрастного снижения качества ооцитов и их репродуктивного потенциала [66].

В условиях дефицита энергии нарушаются процессы оогенеза и созревания ооцитов, а в последующем и эмбрионов. Стоит отметить, что митохондриальный биогенез в соматических клетках и гаметах не имеет принципиальных отличий. Однако митохондрии зрелых ооцитов имеют более сферическую форму, меньший размер, более электронно плотный матрикс. Также ооциты содержат большее количество митохондрий и копий митохондриальной ДНК, что связано с высокой энергозатратностью фолликулогенеза [67]. Кроме того, эмбрионы млекопитающих, в том числе и человека, наследуют митохондрии от

матери, в то время как митохондрии сперматозоида, которые попадают в ооцит, подвергаются деградации и утилизации аутофагосомами [68]. Соответственно, исходное количество мтДНК ооцитов определяет энергетический потенциал ранних эмбрионов в течение первых трех дней преимплантационного развития, так как на данной стадии развития отсутствует репликация мтДНК, а энергетический метаболизм происходит по анаэробному пути (гликолиз, пентозофосфатный путь)[62,71,72,73]. Возобновляется транскрипция митохондриального генома при активации собственного генома эмбриона, то есть приблизительно на стадии 4-8 бластомеров, через 72 часа после оплодотворения. Полноценная репликация мтДНК начинается на стадии бластоцисты (пятидневного эмбриона), когда необходим адекватный уровень энергии для успешного деления. Митохондрии более вытянуты в длину, кристы становятся глубже. На данном этапе происходит переход от анаэробного пути метаболизма энергии к аэробному (окислительное фосфорилирование) [26,49,69,70].

По данным ряда зарубежных авторов (Gael L., Cagnone M., Te-Sha Tsai et al., 2014, 2016; Ogino M., Tsubamoto H., 2016; Fragouli E., Spath K., 2015; Boucret L, dela Varca JM. et al., 2015) существует прямая связь между копийностью мтДНК ооцитов/эмбрионов и их качеством [6,7,49,74]. Особенно тщательно мтДНК исследовалась на животных моделях (ооциты мышей, свиней). Было доказано, что успешно оплодотворялись те ооциты, которые содержали большее количество мтДНК, чем ооциты со сниженной копийностью мтДНК. Стоит отметить, что по данным ранее проведенных исследований, высокий уровень мтДНК в трофэктодерме бластоцист, наоборот, был сопряжен со сниженным потенциалом к имплантации, анеуплоидией и плохим морфологическим качеством эмбрионов что, видимо, связано с особенностями репликации мтДНК [25,49,75]. Однако определение митохондриального потенциала ооцитов человека для прогнозирования результатов оплодотворения имеет как этические, так и технические ограничения. В связи с чем Ogino M., Tsubamoto H. et al. (2016)

предположили, что количественное определение мтДНК в кумулюсных клетках и клетках периферической крови может коррелировать с митохондриальным потенциалом ооцитов и являться достоверным прогностическим маркером получения эмбрионов хорошего качества в программах ВРТ [7]. В ходе исследования были проанализированы 60 образцов кумулюсных клеток тридцати женщин, восемнадцати из них были взяты образцы крови. Для 30 пациенток со средним возрастом 37 лет и индексом массы тела $21,4 \pm 2,0$, установлена высокая корреляция между уровнем мтДНК в кумулюсных клетках и клетках периферической крови (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,900$, $p < 0,0001$). мтДНК в кумулюсных клетках ооцитов из которых в последующем образовались эмбрионы хорошего качества было выше, чем в кумулюсных клетках ооцитов, при оплодотворении которых формировались эмбрионы низкого качества. Данные уровни мтДНК составили 140 и 57 копий на клетку соответственно ($p < 0,0001$). Содержание мтДНК в клетках периферической крови женщин, с последующим получением эмбрионов хорошего качества, также было выше, чем в клетках периферической крови пациенток, с последующим получением эмбрионов низкого качества, и составляло 36 и 13 копий на клетку соответственно ($p = 0,604$). При построении модели логистической регрессии единственно значимым параметром было содержание мтДНК в кумулюсных клетках, а не в клетках периферической крови ($p = 0,020$). По мнению авторов, низкая чувствительность и специфичность метода количественного определения мтДНК в клетках периферической крови для прогноза получения эмбрионов хорошего качества в данном исследовании связана с небольшим размером выборки и, соответственно, необходимы последующие исследования. Таким образом, по данным Ogino M., Tsubamoto H. et al. (2016) уровень мтДНК в кумулюсных клетках является надежным диагностическим инструментом для прогнозирования качества эмбрионов. Площадь под ROC-кривой (AUC) составляет 0,823, что указывает на высокую прогностическую силу [7].

Ранее, в 2015 году Fragouli E., Spath K. и соавторы провели исследование, которое выявило четкую связь между количеством мтДНК в клетках трофэктодермы и способностью человеческого эмбриона к имплантации [6]. Цель работы состояла в оценке биологической и клинической значимости определения уровня митохондриальной ДНК эмбрионов. В частности, исследовалась взаимосвязь между уровнем мтДНК и возрастом женщины, хромосомным набором эмбрионов, потенциалом к имплантации. Кроме того, была проведена количественная оценка мтДНК, детальный анализ полиморфизма митохондриального генома, поиск мутаций, делеций. Цитогенетически были протестированы 39 ранних эмбрионов (эмбрионы стадии дробления) и 340 бластоцист. Из них клетки трофэктодермы 302 бластоцист проанализированы методом микроматричной сравнительной геномной гибридизации (aCGH), 38 - методом секвенирования нового поколения (NGS). В свою очередь из 302 бластоцист- 123 были определены как анеуплоидные (99 с помощью aCGH и 24 с помощью NGS), в то время как остальные 217 были охарактеризованы как эуплоидные (203 с помощью aCGH и 14 с помощью NGS). Произвели перенос 131 эуплоидной бластоцисты и 39 нормальных эмбрионов на стадии дробления. В последующем оценивали число копий мтДНК. Было проведено сравнение 148 бластоцист из группы женщин со средним возрастом 34,8 лет (26-37 лет) и 154 бластоцисты женщин со средним возрастом 39,8 лет (38-42 лет) с использованием real-time PCR (полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени, ПЦР-РВ). Анализ данных ПЦР в режиме реального времени показал статистически значимое увеличение количества мтДНК в клетках трофэктодермы бластоцист женщин позднего репродуктивного возраста ($P = 0,003$). Кроме того, образцы трофэктодермы анеуплоидных бластоцист ($n = 99$) содержали значительно больше мтДНК во всех возрастных группах, по сравнению с эуплоидными ($n = 203$) ($P = 0,025$). В ходе исследования был определен порог жизнеспособности эуплоидных бластоцист по уровню

мтДНК. Ретроспективный анализ биоптатов трофэктодермы перенесенных эмбрионов с известным исходом показал, что 42/42 (100%) бластоцист, которые привели к клинической беременности имели относительный уровень количества мтДНК ниже, чем 0,003 о.е. (пороговый уровень). Кроме того, 14/14 (100%) эмбрионов с относительным количественным уровнем мтДНК выше, чем 0,003, были неспособны к имплантации. Также, было проанализировано 23 образца трофэктодермы методом NGS для дальнейшей оценки связи между повышенным уровнем мтДНК и неудачами имплантации. Все эмбрионы были эуплоидными и ранее проанализированы с помощью метода ПЦР в режиме реального времени. Клинический исход после переноса был известен у 21 из соответствующих бластоцист. Семь из них привели к беременности, тогда как остальные 14 -нет. Из 14 эмбрионов, которые не имплантировались, методом real-time PCR идентифицированы 9, содержащие количество мтДНК выше, чем 0,003 о.е. Анализ NGS подтвердил результаты метода ПЦР в реальном времени, показав увеличение уровня мтДНК у неимплантированных эмбрионов по сравнению с имплантированными. Повышенное количество мтДНК также наблюдалось еще в 3-х образцах трофэктодермы, для которых клинический результат не был известен.

После установления порога жизнеспособности по уровню мтДНК в бластоцисте на основании ретроспективного анализа данных, было проведено слепое проспективное исследование для оценки прогностической ценности предложенной модели. Результаты проспективного слепого исследования, с использованием того же порогового уровня мтДНК, что и в ретроспективном исследовании, подтвердили, что все бластоцисты, индуцировавшие жизнеспособную беременность, содержали количество мтДНК ниже порогового значения, и ни одна бластоциста с уровнем мтДНК выше этого значения не привела к клинической беременности.

Соответственно, все эуплоидные бластоцисты с надпороговыми уровнями мтДНК в трофэктодерме не имплантировались (100%).

Бластоцисты с уровнем мтДНК в нормальном диапазоне имплантировались в 59% случаев, что контрастирует с 38% для группы в целом (т.е. где не исследовали уровень мтДНК методом ПЦР в режиме реального времени). Полученные данные показывают, что нарушение развития эмбрионов, связанное с повышенным уровнем мтДНК, объясняет до одной трети неудач имплантации эуплоидных бластоцист. По мнению авторов оценка количества мтДНК в клетках трофэктодермы эмбрионов может стать простым, недорогим и широко применяемым клиническим исследованием, позволяющим повысить эффективность лечения бесплодия [6]. Учитывая представленные результаты, можно сделать предположение, что бластоцисты с повышенными уровнями мтДНК либо испытывают некоторую форму клеточного стресса и требуют дополнительной энергии, либо увеличение митохондрий и мтДНК представляет собой компенсационный механизм, запускающийся при нарушении функционирования существующих митохондрий, в связи с накоплением мутаций в митохондриальном геноме. Представленные данные согласуются с гипотезой о роли митохондриального биогенеза в имплантационном потенциале эмбрионов. Гипотеза «тихого эмбриона», предложенная Leese (2002), которая предполагает, что жизнеспособный эмбрион имеет относительно низкий или «тихий метаболизм» в то время, как эмбрионы, находящиеся под влиянием стресса, и со сниженным потенциалом развития, как правило, метаболически более активны [76]. Большинство хромосомных аномалий происходят из-за ошибок, возникающих в процессе оогенеза (мейоза), но нарушение сегрегации хромосом также часто встречается в течение первых клеточных делений после оплодотворения (митотическое деление) [33]. Однако, причины высоких уровней ошибок мейоза и митоза все еще до конца не изучены. Исходя из полученных данных, можно сделать предположение, что изменение количества или функциональности мтДНК может иметь влияние на точность сегрегации хромосом. Таким образом, изучение копийности мтДНК ооцитов и эмбрионов может стать

дополнительным достоверным предиктором исходов программ ВРТ в различных группах пациентов, в том числе в группе пациенток позднего репродуктивного возраста. Кроме того, необходимы дальнейшие исследования для более полного понимания нарушений метаболических процессов в ооцитах и эмбрионах с целью разработки методов их коррекции.

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). На базе 1-го гинекологического отделения (руководитель - к.м.н. Абубакиров А.Н.) осуществлялся набор пациенток, вошедших в исследование. Лабораторные исследования проводились в лаборатории молекулярно-генетических методов исследования (руководитель - д.б.н., профессор РАН Д.Ю. Трофимов).

В исследование была включена 161 супружеская пара, подписавшая добровольное информированное согласие на участие в исследовании. 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" [77].

2.1. Дизайн исследования

При решении поставленных задач на первом этапе исследования были изучены клиничко-лабораторные и эмбриологические данные 161 пациентки позднего репродуктивного возраста. В качестве предполагаемых факторов риска неудачных исходов программ ЭКО рассматривались возраст пациенток, овариальный резерв: гормональные характеристики (уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), тестостерона, эстрадиола, антимюллерового гормона (АМГ)) и число антральных фолликулов; суммарная доза вводимых гонадотропинов.

Была проведена оценка параметров оогенеза и раннего эмбриогенеза: число полученных ооцитов; частота оплодотворения ооцитов;

доля эмбрионов, остановившихся в развитии; доля бластоцист различного качества по Гарднеру; ploидность эмбрионов. На основании результатов ПГТ-А, сравнив доли полученных в ходе исследования эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов и проведя ROC-анализ, был определен пороговый возраст, при превышении которого увеличивалась доля анеуплоидных эмбрионов. В связи с чем все пациентки были разделены на 2 группы в зависимости от найденного порогового возраста:

- Группа А- пациентки в возрасте <39 лет.
- Группа Б- пациентки в возрасте ≥ 39 лет.

На следующем этапе настоящего исследования было отобрано 67 пациенток позднего репродуктивного возраста, для исследования уровня мтДНК в кумулюсных клетках ($n=454$).

Конечными точками данной части исследования были:

- доля анеуплоидных эмбрионов;
- средние значения уровня мтДНК в КК в группах фертилизированных и нефертилизированных ооцитов;
- средние значения копийности мтДНК в КК в группах бластоцист разного качества по Гарднеру;
- средние значения копийности мтДНК в КК в группах эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов;
- корреляционный анализ средних значений копийности мтДНК в КК в зависимости от возраста и овариального резерва пациенток;

На третьем этапе работы исследовался уровень мтДНК в трофэктодерме 473 бластоцист в когортах изучаемых групп (324 эмбриона пациенток в возрасте <39 лет-группа А; 149 эмбрионов пациенток в возрасте ≥ 39 лет-группа Б). Конечные точки данного этапа исследования:

- Пороговое значение числа копий мтДНК, влияющее на эффективность программ ВРТ (ROC-анализ).
- ОШ клинической беременности в зависимости от ПЭ с различным числом копий мтДНК (первичная конечная точка).

- ОШ биохимической беременности в зависимости от ПЭ с различным числом копий мтДНК.
- ОШ самопроизвольного выкидыша в 1-ом триместре в зависимости от ПЭ с различным числом копий мтДНК (Рисунок 2).



Рисунок 2. Дизайн исследования.

2.2. Критерии включения, невключения и исключения из исследования

Критерии включения пациенток в исследование:

- возраст: 35 - 43 лет;
- регулярный менструальный цикл (21 - 35 дней);
- ИМТ пациенток: 18 - 29 кг/м²;
- уровень ФСГ на 2-3 день менструального цикла ≤ 15 МЕ/мл;

- нормальный кариотип супругов;
- фертильная или субфертильная сперма партнера;
- информированное согласие на участие в исследовании;
- проведение преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А) всем полученным эмбрионам;
- перенос 1 эуплоидного эмбриона в полость матки.

Критерии невключения в исследование:

- наличие противопоказаний к ВРТ;
- генитального эндометриоза III-IV степени;
- миомы матки больших размеров;
- хронического эндометрита;
- опухолевых и опухолевидных образований яичников;
- пороков развития гениталий;
- наличие тяжелой формы патозооспермии у мужчины (концентрация сперматозоидов менее 6×1000000 /мл, наличие менее 4% морфологически нормальных сперматозоидов по критериям Крюгера, а также наличие азооспермии);
- тяжелая экстрагенитальная патология;
- синдром поликистозных яичников (СПКЯ);
- курение.

Критерии исключения пациенток из исследования:

- развитие синдрома гиперстимуляции яичников средней или тяжелой степени на фоне стимуляции функции яичников в изучаемом цикле ЭКО;
- другие осложнения при проведении ЭКО (кровотечение в брюшной полости, воспалительные осложнения);
- вспомогательные репродуктивные технологии с использованием донорской яйцеклетки или суррогатной матери.

2.3. Определение объема выборки

Расчет объема выборки был произведен с помощью программы STATISTICA 10 (США).

Для задач №1, 3, 4 и 5 по оценке эффективности применения метода оценки числа копий мтДНК в ТЭ расчет объема выборки был основан на данных литературы о частоте имплантации бластоцист с числом копий мтДНК $<0,003$ (Fragouli E, Spath K, Alfarawati S et al. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential. PLoS Genet 2015;11(6):e1005241). Для получения валидных данных при принятии уровня альфа 0,05, мощности исследования 90%, эффективности имплантации при ПЭ с числом копий мтДНК в ТЭ $<0,003$ 59%, эффективности имплантации при ПЭ без определения мтДНК в ТЭ 38%, достаточно включить в исследование минимум 151 пациентку.

Для задач №2 по оценке мтДНК в КК и ТЭ расчет объема выборки был основан на данных литературы о числе копий мтДНК в КК пациенток с различным овариальным резервом (Bouclet L, de la Barca JM, Morinière C, Descamps P et al. Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells. Hum Reprod 2015;30(7):1653-64). Для получения валидных данных при принятии уровня альфа 0,05, мощности исследования 90%, числе копий мтДНК в КК пациенток со сниженным овариальным резервом (146 ± 41), числе копий мтДНК в КК пациенток с нормальным овариальным резервом (167 ± 31), достаточно включить в исследование минимум 30 ооцитов и, соответственно, бластоцист в группу, всего 60 ооцитов/бластоцист. На основании данных Ogino M, Tsubamoto H, Sakata K et al. Mitochondrial DNA copy number in cumulus cells is a strong predictor of obtaining good-quality embryos after IVF. J Assist Reprod Genet 2016;33(3):367-71 для получения валидных данных при принятии уровня альфа 0,05, мощности исследования 90%, числе копий

мтДНК в КК эмбрионов хорошего качества 140, эмбрионах плохого качества - 57, достаточно включить в исследование минимум 9 эмбрионов в группу, всего 36 эмбрионов (9 эмбрионов отличного качества, 9 эмбрионов плохого качества, 9 эуплоидных эмбрионов, 9 анеуплоидных эмбрионов в группах пациенток позднего репродуктивного возраста). Соответственно, для решения задачи № 2 достаточно включить в исследование минимум 37 ооцитов/бластоцист.

2.4. Методы исследования

Перед началом проведения программы ЭКО супружеским парам было проведено предварительное клинико-лабораторное обследование в амбулаторных условиях согласно приказу Минздрава Российской Федерации № 107н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению" от 23 августа 2012 г. [77]. Данное обследование включало как обязательные, так и специальные методы исследования (Таблица 1).

К обязательным методам исследования для обоих супругов относилось:

- определение в крови антител к бледной трепонеме (RW), антител класса М/Г к вирусу иммунодефицита человека 1,2 (ВИЧ 1,2), к антигенам вирусного гепатита В и С (HBs-Ag, HCV);
- микроскопическое исследование отделяемого половых органов на аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, *Candida*, трихомонаду;
- исследование соскоба методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на хламидии, микоплазму, уреаплазму, ВПГ I и II типов, ВПЧ, ЦМВ;
- определение кариотипа супругов, медико-генетическое консультирование.

Обязательные исследования для женщин:

- клинический анализ крови;
- биохимический анализ крови;
- коагулограмму с D-димером;
- определение группы крови и резус-фактора;
- клинический анализ мочи;
- определение в крови антител М и G к TORCH-инфекциям: *Toxoplasma gondii*, вирус краснухи, цитомегаловирус, вирус простого герпеса I и II типов, методом;
- цитологическое исследование эндо- и экзоцервикса;
- УЗИ органов малого таза (5-8 день менструального цикла);
- УЗИ молочных желез и маммографию (для пациенток старше 35 лет);
- УЗИ щитовидной железы;
- гормональное исследование крови (на 2-3 день менструального цикла): ФСГ, ЛГ, эстрадиол, тиреотропный гормон (ТТГ), свободный тироксин (Т4св), дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГАЭС), пролактин, соматотропный гормон (СТГ), кортизол, тестостерон, антимюллеров гормон (АМГ), прогестерон (22 день цикла);
- флюорография;
- электрокардиография;
- заключение терапевта или других специалистов, по показаниям, о наличии или отсутствии противопоказаний для проведения программы ЭКО;

Исследования по показаниям [77]:

- ультразвуковая доплерография (УЗДГ) вен нижних конечностей;
- исследование проходимости маточных труб и состояния матки, (гистеросальпингография, гистероскопия и лапароскопия);
- консультация смежных специалистов (маммолога, эндокринолога, уролога и др.)

Обязательные исследования для мужчин:

- анализ эякулята.

Специальные методы исследования:

- определения копийности мтДНК в клетках кумулюса ооцитов и в трофэктодерме метод ПЦР в режиме реального времени;
- преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А) методом сравнительной геномной гибридизации на чипе (aCGH).

Таблица 1

Схема обследования пациентов во время проведения исследования

	Перед проведением программы ЭКО	ТВП	3 сутки после ТВП	5-е сутки после ТВП	2 недели после ЭП	3-5 недель после ЭП
Обязательные методы обследования	X					
Морфологическая оценка ооцитов, отбор кумулюса для исследования		X				
Морфологическая оценка эмбрионов			X	X		
ПГТ-А и определение копийности мтДНК в КК и ТЭ				X		
β-ХГ					X	
УЗИ						X

2.4.1. Общеклинические методы исследования

Всем пациенткам производили сбор анамнестических данных при первичном консультировании. Изучали данные семейного анамнеза с целью определения наличия наследственных генетических, сердечно-сосудистых, эндокринных, онкологических и др. заболеваний у родственников. Также детально производили сбор личного анамнеза для получения информации об антропометрических данных: рост, масса тела, ИМТ (расчет ИМТ: $\text{ИМТ} = \text{масса тела} / \text{рост}^2$, кг/м²), артериальное давление, пульс; возрасте; семейном положении; наличии «вредных привычек»; образовании; инфекциях и заболеваниях в детском возрасте; о ранее перенесенных и настоящих соматических и инфекционных заболеваниях, оперативных вмешательствах; об особенностях аллергоанамнеза. Тщательно изучали акушерско-гинекологический анамнез: менструальная функция (возраст менархе, регулярность, длительность, наличие или отсутствие нарушений менструального цикла); паритет, особенности течения и исходы предыдущих беременностей (наличие медицинских аборт, неразвивающихся беременностей, самопроизвольных прерываний беременностей на различных сроках гестации, антенатальной гибели плода, преждевременных, оперативных родов, оперативных вмешательств). Выясняли наличие перенесённых оперативных вмешательств на органах малого таза и гинекологических заболеваний. Тщательно собирали информацию о продолжительности бесплодия, проведенных диагностических и лечебных мероприятиях. При наличии программ ВРТ в анамнезе, уточнялись их характер и особенности проведения (протокол стимуляции функции яичников, количество и качество полученных ооцитов и эмбрионов, наличие витрифицированных эмбрионов, исход программы). В ходе гинекологического осмотра оценивалось развитие и анатомические особенности наружных половых органов, состояние влагалища и шейки матки при осмотре в зеркалах. При бимануальном влагалищно-

абдоминальном исследовании органов малого таза оценивались размеры, консистенция, форма и подвижность тела матки, состояние придатков матки. Также собирался анамнез бесплодия у мужчин: наличие детей в предыдущих браках, длительность и методы лечения бесплодия.

2.4.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза

Всем пациенткам выполнялось экспертное УЗИ органов малого таза в I фазе менструального цикла (5-8 день), который предшествовал циклу начала программы ЭКО, в отделении функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (заведующий - профессор А.И. Гус) или по месту жительства. Оценивались размеры, форма и положение тела матки, структура миометрия, наличие внутреннего эндометриоза, миомы матки, рубцовых изменений, структура и толщина эндометрия, объем яичников, определяли наличие объемных образований, жидкости в малом тазу, число антральных фолликулов. Затем ультразвуковое исследование проводилось на 2-3 день менструального цикла перед началом стимуляции суперовуляции. Также в процессе стимуляции функции яичников с целью УЗ-мониторинга роста фолликулов, эндометрия и своевременной коррекции дозы гонадотропинов: для определения дня введения антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (антГнРГ), обычно на 6-й день стимуляции, затем для определения дня введения триггера овуляции. Далее под контролем УЗИ проводилась трансвагинальная пункция яичников и перенос эмбрионов в полость матки. При положительном результате β -ХГ ультразвуковое исследование производилось через 21 день после ПЭ с целью определения плодного яйца в полости матки.

2.4.3. Гормональное исследование

Перед проведением программы ЭКО, с целью определения состояния эндокринной системы, овариального резерва пациенток, исследовались уровни гормонов в сыворотке крови на 2-3 дни менструального цикла. Определялась концентрация следующих гормонов: ФСГ, ЛГ, Е2, прогестерона, пролактина, тестостерона, ДГЭА-С, кортизола, ТТГ, Т4св, 17-ОП, СТГ, АМГ (Таблица 2). Использовались тест-системы «Hoffmann La Roche, Ltd.» Швейцария).

Таблица 2

Нормативные показатели концентрации гормонов в плазме крови

Показатель	Норма	Единицы измерения
ФСГ	3,0-10,0	МЕ/л
ЛГ	3,0-8,0	МЕ/л
Е2	150-450	пмоль/л
	280-740	пмоль/л
Тестостерон	1,0-2,5	нмоль/л
Пролактин	120-500	мМЕ/л
ДГЭА-С	0,9-11,7	мкмоль/л
Кортизол	200-500	нмоль/л
Прогестерон (I фаза)	1,8-2,2	нмоль/л
Прогестерон (II фаза)	9,0-83,0	нмоль/л
ТТГ	0,4-2,5	мМЕ/л
Т4св.	10,0-25,0	пмоль/л
17-ОП	0,3-3,0	нмоль/л
СТГ	0,15- 13,0	мМЕ/л

2.4.4. Исследование эякулята

Всем пациентам проводилось исследование эякулята, который собирался в стерильный пластмассовый контейнер после 3-5 дней полового воздержания (Таблица 3).

Таблица 3

Показатели спермограммы (ВОЗ, 2012)

Показатель	Норма
Общий объем эякулята, мл	1,5 (1,4-1,8)
pH	$\geq 7,2$
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	15 (12-17)
Общее число сперматозоидов, млн	39 (32-46)
Время разжижения, мин	<60
Подвижность сперматозоидов, %	40 (38-42)
Сперматозоиды с прогрессивным движением, %	32 (31-34)
Число нормальных сперматозоидов, %	4 (3-4)
Число живых сперматозоидов, %	58 (55-63)
Концентрация лейкоцитов, млн/мл	<1
Антиспермальные антитела, %	<50
MAR-тест, %	<50

Критерии патологии эякулята:

- аспермия – отсутствие эякулята;
- азооспермия – отсутствие сперматозоидов в эякуляте;
- олигозооспермия – снижение концентрации сперматозоидов ниже <15 млн/мл;
- астенозооспермия – снижение подвижности сперматозоидов ниже нормальных значений (общая подвижность <40%, сперматозоиды с прогрессивным движением <32%);
- тератозооспермия – число сперматозоидов с нарушением морфологии >96%.

2.4.5. Протокол программы ЭКО

Для стимуляции функции яичников применялся протокол с антагонистами ГнРГ (антГнРГ) с использованием препаратов рекомбинантного ФСГ (рФСГ) или человеческого менопаузального гонадотропина (чМГ). Введение гонадотропинов начинали с 2-3 дня менструального цикла. В случае проведения модифицированного протокола изначально, до начала стимуляции суперовуляции гонадотропинами, вводили препарат антГнРГ для синхронизации фолликулярного пула.

Подбор дозы осуществлялся по стандартной схеме, исходя из параметров овариального резерва, возраста и анамнеза пациентки, ее конституции. Дозу корректировали в процессе стимуляции функции яичников в зависимости от диаметра растущих фолликулов. При достижении диаметра 13-14мм, с целью профилактики эндогенных паразитарных пиков ЛГ, вводился антГнРГ (цетрореликс 0,25мг).

Введение антГнРГ осуществлялось ежедневно, включая день введения триггера овуляции.

Триггер овуляции вводился при наличии в яичниках фолликулов диаметром ≥ 17 мм, за 35-36 часов до планируемой трансвагинальной пункции яичников (ТВП). В качестве триггера использовались: человеческий хорионический гонадотропин (ЧХГ) в дозе 10000 МЕ, либо агонист ГнРГ (аГнРГ) в дозе 0,2 мг.

ТВП яичников производилась в асептических условиях под УЗ-контролем, в условиях кратковременной внутривенной анестезией в малой операционной 1 гинекологического отделения. Фолликулярная жидкость с ооцитами аспирировалась под отрицательным давлением (90-100 мм водного столба) в стерильные подогретые пробирки с помощью однопросветных пункционных игл. Пробирки передавались врачу-эмбриологу для идентификации ооцит-кумулюсного комплекса и морфологической оценки полученных ооцитов.

2.4.6. Эмбриологический этап в программе ЭКО с ПГТ-А

Оценка аспирированной фолликулярной жидкости производилась эмбриологом при помощи стереомикроскопа. После определения числа ооцит-кумулюсных комплексов и отмывания от крови и фолликулярной жидкости, ооциты инкубировались 2-3 часа в стерильных планшетах с культуральной средой IVF (Cook, Австралия). Затем кумулюсные клетки (КК) отделялись от ооцит-кумулюсных комплексов при помощи тонких игл, помещались в пробирку типа эппендорф и замораживались при -80°C для последующего анализа копийности мтДНК.

В ходе проведения оплодотворения ооцитов методом ИКСИ оценивалась зрелость ооцитов:

GV (от *англ.* - *germinal vesicle*) - зародышевый пузырек, незрелая диплоидная яйцеклетка(2n) в профазе первого деления мейоза, характеризующаяся наличием большого ядра с 1-2 нуклеолями;

MI - ооцит – незрелый ооцит в метафазе первого деления мейоза. Не определяются ядро и полярное тельце;

MII - ооцит – зрелая гаплоидная яйцеклетка на стадии второго деления мейоза (метафаза II). В цитоплазме определяется ядро и одно полярное тельце.

Учитывая, что при оплодотворении путем инсеминации спермы мужа(партнера), сперматозоиды остаются на *zona pellucida* и, в последующем, при проведении биопсии трофэктодермы эмбрионов для ПГТ-А повышается риск контаминации биоптатов генетическим материалом оставшихся сперматозоидов, все ооциты оплодотворялись посредством ИКСИ (инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита). После оплодотворения ооциты оставались в культуральной среде IVF (Cook, Австралия) до следующего дня. Через 16-18 часов после ИКСИ наличие в

цитоплазме двух четко различимых, симметричных по размеру пронуклеусов (2PN) свидетельствовало о нормальном оплодотворении ооцита. При содержании 1-го или 3-х и более PN оплодотворение считалось аномальным. Если ооцит не имел пронуклеусов, то считался неоплодотворенным. Оплодотворенные ооциты переносились в среду Cleavage (Cook, Австралия). На третьи сутки культивирования эмбрионы переносились в среду Blast Assist Medium (Cook, Австралия).

На 3-и и на 5-е сутки после процедуры оплодотворения осуществляли морфологическую оценку эмбрионов. При отсутствии морфологических аномалий у эмбрионов третьих суток развития присваивалась максимальная оценка в 3,5 балла. Морфологическая оценка снижалась на 0,5 баллов при каждом отклонении от нормальных параметров.

Эмбрионы 5-х суток развития оценивались по классификации Гарднера (степень зрелости бластоцист, качество внутриклеточной массы (ВКМ) и качество трофэктодермы):

- 1 - Ранняя бластоциста: бластоцель составляет менее 1/2 от объема всей бластоцисты.
- 2 - Ранняя бластоциста: бластоцель составляет более 1/2 объема всей бластоцисты.
- 3 - Полностью развитая бластоциста, большая бластоцель.
- 4 - Экспандированная бластоциста - более чем полностью развитая бластоциста, истончение zona pellucida (ZP).
- 5 - Бластоциста, начавшая хетчинг, то есть трофэктодерма бластоцисты начинает проникать через ZP.
- 6 - Бластоциста, закончившая хетчинг, то есть покинувшая ZP.

Классификация ВКМ происходила следующим образом:

- A- Большое количество плотно упакованных клеток визуализируемой ВКМ;
- B- Свободная группировка небольшого числа клеток визуализируемой ВКМ;
- C- незначительное количество клеток ВКМ.

Классификация трофэктодермы:

А- много клеток, формирующие эпителиальный слой;

В- немного клеток, формирующие неплотный эпителиальный слой;

С- незначительное количество клеток трофэктодермы.

В настоящем исследовании, учитывая морфологические характеристики, эмбрионы были разделены на 3 группы:

отличного качества- бластоцисты с ВКМ категории А и качеством ТЭ категории А-В;

хорошего качества- бластоцисты с ВКМ категории В и качеством ТЭ категории В-С;

плохого качества - ранние бластоцисты, бластоцисты с ВКМ категории С и качеством ТЭ категории С, которые не подвергались ПГТ-А.

Процедура витрификации и размораживания эмбрионов проводилась по стандартному протоколу Kitazato.

2.4.7. Преимплантационный генетический тестирование на анеуплоидии

Биопсия трофэктодермы эмбрионов 5-6-й суток развития осуществлялась с помощью микрохирургических инструментов ТРС (США). Для рассечения zona pellucida использовалась лазер Остах (Япония). Для аспирации клеток трофэктодермы использовались микропипетки Cook (Австралия). Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии проводилось методом сравнительной геномной гибридизации на чипе (aCGH). aCGH генетического материала эмбриона проводили на оборудовании фирмы “Agilent” (США). Полногеномную амплификацию клеточной ДНК методом WGA-PCR (Whole Genome Amplification–Polymerase Chain Reaction) выполняли с помощью набора PicoPlex SingleCell WGA Kit (“Rubicon Genomics”, США) и набора GenetiSure Pre-Screen Amplification and Labeling Kit (“Agilent”, США) в случае MDA (Multiple Displacement Amplification). Качество и количество полученной ДНК

контролировали с помощью электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле. Ампликоны метили с использованием набора SureTag DNA labeling Kit (“Agilent”) согласно инструкции фирмы. Меченые ампликоны наносили на биочип Sure Print G3 8x60 aCGH Agilent, гибридизировали в течение 16 ч, после чего отмывали и сканировали на сканере биологических чипов SureScan Microarray Scanner. Интерпретацию результатов проводили с помощью программного продукта Agilent CytoGenomics. Затем, полученные ампликоны разводились в соотношении 1:50 и передавались для измерения копийности мтДНК в трофэктодерме.

2.4.8. Определение копийности мтДНК в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы

Относительная количественная оценка копийности мтДНК в клетках кумулюса и трофэктодерме бластоцист проводилась с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В реакции использованы специально разработанные олигонуклеотиды и TaqMan-пробы для амплификации и количественного определения специфических фрагментов мтДНК (ген *MT-ND2* - mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2 и ген *MT-ND4* - mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4). Нормировка осуществлялась на геномную ДНК (ген *LTC4S* - leukotriene C4 synthase). Использование олигонуклеотидов (праймеров) к гену *MT-ND2* позволило оценить содержание тотального пула митохондриальной ДНК (mtDNA^{total}), а праймеров к гену *MT-ND4* - содержание пула полноразмерной митохондриальной ДНК, лишенной делеций (mtDNA^{del-}), включающих ген *MT-ND4*, например del mtDNA4977, mtDNA7436, mtDNA7345, mtDNA8041.

TaqMan-пробы для фрагментов митохондриальной и геномной ДНК были помечены разными флуорофорами (FAM и HEX), что позволило проводить реакцию в одной пробирке (мультиплексная ПЦР) в двух

повторах для каждого образца. Для обеспечения «горячего старта» использован парафин. В работе использованы реактивы и детектирующие амплификаторы «ДТпрайм» (ООО «ДНК-Технология», Россия) в соответствии с Инструкциями и рекомендациями производителя. Режим амплификации: 80 °С в течение 1 мин, инкубирование при 95 °С в течение 1 мин, а затем 50 циклов: 94 °С в течение 15с и 64°С в течение 20с с измерением уровня флуоресценции на каждом цикле.

Количество мтДНК относительно геномной определяли методом сравнения пороговых циклов ($2^{\Delta C_p}$) и представляли в относительных единицах (о.е.) по формуле 1:

$$\text{mtDNA/gDNA} = 2^{C_p \text{ gDNA} - C_p \text{ mtDNA}},$$

где $C_p \text{ gDNA}$ - значение порогового цикла амплификации геномной ДНК, $C_p \text{ mtDNA}$ - значение порогового цикла амплификации митохондриальной ДНК.

Содержание мтДНК в трофэктодерме измерялось после проведения полногеномной амплификации. Для образцов трофэктодермы содержание митохондриальной ДНК измерялось по формуле 2:

$$\text{mtDNA Ig} = (45 - C_p \text{ mtDNA})/3,4,$$

где $C_p \text{ mtDNA}$ - значение порогового цикла амплификации митохондриальной ДНК.

Пороговые значения мтДНК установлены с использованием ROC-анализа при сравнении образцов трофэктодермы имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов.

2.4.9. Подготовка эндометрия для переноса размороженных эмбрионов

Перед переносом размороженных эмбрионов в полость матки проводили подготовку эндометрия циклической гормональной терапией. С 4-5-го дня менструального цикла назначался эстрадиола валерат в дозе 4-6-8 мг/сут., по данным УЗИ на 9-10 день менструального цикла проводилась коррекция дозы

эстрогенов. После очередного контрольного УЗ-мониторинга, при достижении М-эха 8-10мм и четкой трехслойной структуры, назначался микронизированный прогестерон в дозе 600-800 мг/день. На 6-й день приема гестагенов производился перенос размороженных эмбрионов в полость матки.

2.4.10. Ведение посттрансферного периода и диагностика наступления беременности

В асептических условиях по УЗ – контролем производился перенос эмбриона в полость матки при помощи гибких одноразовых катетеров Cook (Австралия). В настоящем исследовании производился перенос 1 размороженного зуплоидного эмбриона в полость матки 5-6 суток развития. Поддержка посттрансферного периода осуществлялась по принятым в клинической практике протоколам. Уровень β -ХГ в сыворотке крови определялся через 14 дней после переноса эмбриона. Положительным считался тест при уровне β -ХГ $>$ 20 МЕ/л. Ультразвуковое исследование проводилось через 21 день после ПЭ, клиническая беременность регистрировалась при визуализации плодного яйца в полости матки.

2.5. Статистическая обработка полученных данных

Статистическая обработка данных выполнена с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и программы «IBM SPSS Statistics 22.0» (США).

После определения вида распределения количественных данных, нормальное или ненормальное, были определены средние значения со стандартным отклонением ($M \pm SD$) с применением параметрической статистики (t-тест), или медианы с интерквартильным размахом ($Me(Q1;Q3)$) с применением методов непараметрической статистики (тест Манна-Уитни). Тест χ^2 , с поправкой на непрерывность (поправка Йетса) для бинарных данных, были применены для сравнения групп по качественным признакам. Также, для сравнения бинарных данных мерой ассоциации было

отношение шансов (ОШ) с доверительным интервалом 95% (95% ДИ). С целью контроля кофаундеров рассчитывалось ОШ и применялся метод логистической регрессии с расчетом площади под кривой (AUC, Area Under the Curve).

Связь между изучаемыми количественными показателями оценивалась по результатам корреляционного анализа с вычислением коэффициента корреляции Пирсона для нормального распределения и Спирмена для распределения отличного от нормального. При коэффициенте равном 0,1-0,3 – корреляционная связь считалась слабой, 0,3-0,6 – средней, от 0,6 и выше – сильной.

ROC-кривые с применением индекса Йодена использовались для определения пороговых значений клинико-лабораторных, эмбриологических показателей, а также уровня мтДНК в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы. Проводилась оценка информативности диагностических критериев – чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной прогностической значимости. Статистически значимыми считались результаты при уровне $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Клинико-анамнестические данные пациенток позднего репродуктивного возраста

Для решения поставленных задач в исследование была включена 161 пациентка позднего репродуктивного возраста ($37,9 \pm 2,8$ лет), обратившиеся для проведения программы экстракорпорального оплодотворения с преимплантационным генетическим тестированием эмбрионов на анеуплоидии. При анализе антропометрических данных - средний рост пациенток составил $166,5 \pm 5,6$ см, индекс массы тела - $22,3 \pm 1,9$ кг/м². Характеристика менструального цикла пациенток, вошедших в исследование, представлена в таблице 4.

Таблица 4

Характеристика менструальной функция пациенток, включённых в исследование

Параметры	Пациентки позднего репродуктивного возраста (n = 161)
Возраст менархе, лет*	$13,1 \pm 1,2$
Длительность менструального цикла, дней*	$26,6 \pm 1,3$
Продолжительность менструального кровотечения, дней*	$4,8 \pm 1,1$
Регулярный цикл**	94,4% (152)
Нерегулярный цикл**	5,6% (9)
Безболезненный цикл**	67% (108)
Болезненный цикл**	33% (53)
Скудное менструальное кровотечение**	12,4% (20)
Умеренное менструальное кровотечение**	77,6% (125)
Обильное менструальное кровотечение**	10% (16)

В общей структуре экстрагенитальных заболеваний всех пациенток, включенных в исследование, наиболее часто встречались заболевания сердечно-сосудистой системы – вегетососудистая дистония по гипертоническому типу и аллергические заболевания – аллергические реакции на лекарственные препараты, проявляющиеся сыпью по типу крапивницы, поллиноз и атопический бронхит. Заболевания мочевыделительной системы - хронический цистит, хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь; эндокринной системы - в основном представлены аутоиммунным гипотиреозом; заболевания желудочно-кишечного тракта - хроническим гастритом и хроническим некалькулезным холециститом; заболевания дыхательных путей были представлены в основном хроническим тонзиллитом, хроническим бронхитом и трахеитом. На момент проведения программы ЭКО, все заболевания были в стадии ремиссии или медикаментозной компенсации (Таблица 5).

Таблица 5

Структура и частота соматических заболеваний у пациенток

Показатели	Пациентки позднего репродуктивного возраста (n = 161)
Заболевания сердечно-сосудистой системы	14,3% (9)
Аллергические заболевания	16,8% (27)
Заболевания мочевыделительной системы	10% (16)
Эндокринные заболевания	10,5% (17)
Заболевания желудочно-кишечного тракта	10% (16)
Заболевания дыхательных путей	6,2% (4)

Оперативные вмешательства по поводу экстрагенитальных заболеваний (острый аппендицит, калькулезный холецистит и др.) были проведены 7 пациенткам (4,3%).

Среди перенесенных гинекологических заболеваний преобладали воспалительные инфекции, передаваемые половым путем (ИППП) и заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), 46,6% и 31%, соответственно. Также, значительную долю в структуре перенесенных гинекологических заболеваний занимала патология эндометрия (полип эндометрия, гиперплазия эндометрия без атипии) – 37,8%. Учитывая, что в исследование включены исключительно пациентки позднего репродуктивного возраста, представленный высокий процент данной патологии вполне объясним.

Таблица 6

Перенесенные гинекологические заболевания

Показатели	Пациентки позднего репродуктивного возраста (n = 161)
ВЗОМТ	31% (50)
ИППП	46,6% (75)
Патология эндометрия	37,8% (61)
Наружный генитальный эндометриоз I-IIст.	21,1% (34)
Внутренний генитальный эндометриоз I-IIст.	7,4% (12)
Миома матки малых размеров	21,7% (35)
Доброкачественные заболевания шейки матки	9,9% (16)

Данные анализа частоты оперативных вмешательств на органах малого таза представлены в таблице 7.

Таблица 7

Частота и структура перенесенных оперативных вмешательств на органах малого таза

Оперативное вмешательство	Пациентки позднего репродуктивного возраста (n = 161)
Тубэктомия	19,2% (31)
Сальпингоовариолизис	58,4% (54)
Резекция яичников	17,4% (28)
Коагуляция очагов НГЭ	11,2% (18)
Миомэктомия	8,0% (13)
Гистероскопия, РДВ (в том числе диагностическая)	41% (31)

У пациенток позднего репродуктивного возраста, включенных в исследование, превалировало вторичное бесплодие над первичным. Соотношение первичного и вторичного бесплодия представлено в таблице 8.

Таблица 8

Соотношение первичного и вторичного бесплодия

Бесплодие	Пациентки позднего репродуктивного возраста (n = 161)
Первичное	36,6% (59)
Вторичное	63,4% (102)

Среди факторов бесплодия ведущее место занимал трубно-перитонеальный фактор (таблица 9).

Таблица 9

Распределение факторов бесплодия

Факторы бесплодия	Пациентки позднего репродуктивного возраста (n = 161)
Трубно- перитонеальный	30,4% (49)
Мужской	26,1% (42)
Сочетанный	25,5% (41)
Неясного генеза	18% (29)

Данные оценки акушерского анамнеза пациенток позднего репродуктивного возраста с вторичным бесплодием представлены в таблице 10.

Таблица 10

Акушерский анамнез пациенток с вторичным бесплодием

Исходы беременностей	Пациентки позднего репродуктивного возраста (n = 161)
Трубная беременность	18,6% (30)
Самопроизвольное прерывание беременности до 12 недель	17,4% (28)
Медицинский аборт	7,5% (12)
Роды	19,9% (32)

У большинства пациенток, включенных исследование, текущая программа ЭКО была второй или третьей, и лишь у 11,8% - первой (Таблица 11).

Таблица 11

Число попыток ЭКО/ИКСИ в анамнезе

Попытка ЭКО/ИКСИ	Пациентки позднего репродуктивного возраста (n = 161)
Первая	11,8% (19)
Вторая	44,1% (71)
Третья и более	44,1% (71)

3.2. Данные лабораторных исследований пациенток позднего репродуктивного возраста

Перед проведением программы ЭКО с ПГТ-А супружеским парам было проведено полное клинико-лабораторное обследование, согласно приказу №107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению". Противопоказаний для проведения программы ЭКО ни у одной из исследуемых пар выявлено не было.

С целью оценки репродуктивного потенциала пациенток, включенных в исследование, было проведено определение параметров исходного гормонального статуса в период ранней фолликулярной фазы (3-5 день менструального цикла) (Таблица 12).

Таблица 12

Гормональный статус пациенток

Показатели	Пациентки позднего репродуктивного возраста (n = 161)
АМГ, нг/мл	2,0±0,5
ФСГ, МЕ/л	8,7±2,1
ЛГ, МЕ/л	5,0±2,4
Эстрадиол, пмоль/л	115,6±38,5
ТТГ, мЕд/л	1,8±0,8
Тироксин, пмоль/л	14,0±2,9
Пролактин, мЕд/л	335,1±113,4
17-ОП, нмоль/л	2,1±1,5
ДГЭАС, мкмоль/л	5,0±2,2
Тестостерон, нмоль/л	1,4±0,8
Кортизол, нмоль/л	334,5±84,6
СТГ, мМЕ/л	3,6±2,6

3.3. Особенности лечения в программе ЭКО с ПГТ-А у пациенток позднего репродуктивного возраста

Всем пациенткам, включенным в исследование, был проведен протокол с антагонистами ГнРГ. При анализе данных протоколов стимуляции функции яичников не было выявлено статистически значимых различий в назначении человеческого менопаузального и рекомбинантных гонадотропинов. Средняя суммарная доза гонадотропинов составила $2105,3 \pm 298,5$ МЕ. Продолжительность лечения - $10,4 \pm 1,2$ дней.

3.4. Характеристика оогенеза и эмбриогенеза пациенток позднего репродуктивного возраста

В таблице 13 представлены параметры оогенеза и эмбриогенеза пациенток позднего репродуктивного возраста, включенных в исследование.

Таблица 13

Особенности оогенеза и эмбриогенеза

Параметры	Пациентки позднего репродуктивного возраста (n = 161)
Общее количество ооцитов *	$6,9 \pm 1,8$
Среднее число ооцитов МП *	$6,4 \pm 1,5$
Среднее число нормально оплодотворившихся ооцитов (2PN)*	$5,8 \pm 1,5$
Частота оплодотворения (%)**	75,7%
Морфологическая оценка эмбрионов на 3-и сутки (баллы) *	$2,5 \pm 0,6$
Среднее число бластоцист на пациентку *	$4,2 \pm 1,0$
Среднее число бластоцист отличного/ хорошего качества, пригодных для биопсии*	$3,0 \pm 0,8$
Среднее число эуплоидных эмбрионов*	$2,2 \pm 0,6$

По результатам преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на анеуплоидии в когорте пациенток позднего репродуктивного возраста из 473 эмбрионов, 252 бластоцисты были диагностированы как эуплоидные, 221- как анеуплоидные.

Проведя сравнение доли полученных в ходе исследования эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов, был определён пороговый возраст, при превышении которого увеличивалась доля анеуплоидных эмбрионов в 2,3 раза. Площадь под ROC кривой составила 0,675, с чувствительностью 61,2% и специфичностью 77,0% (Рисунок 3). ОШ анеуплоидии бластоцист составило ОШ 2,3 (95%ДИ: 1,57, 3,48), $p < 0,001$.

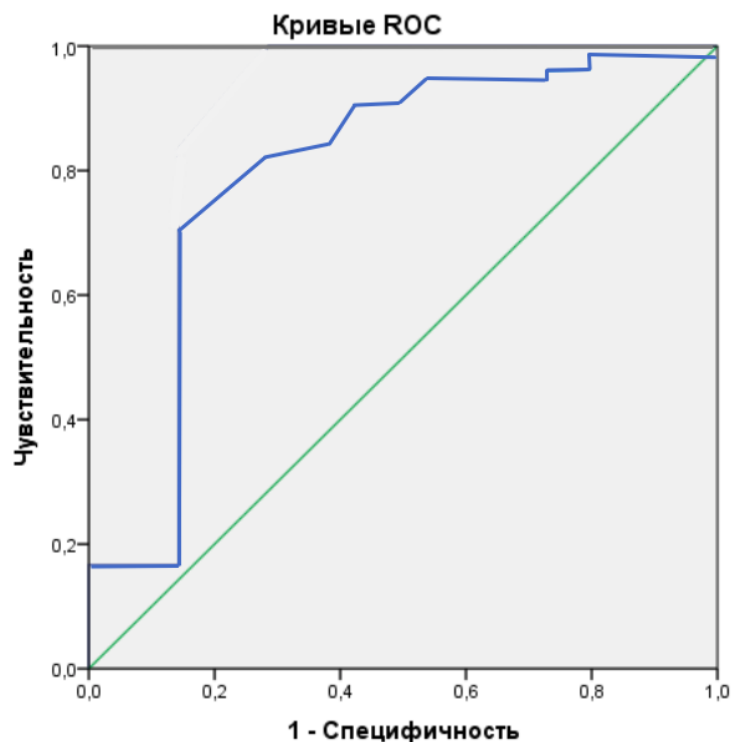


Рисунок 3. ROC-кривая вероятности увеличения доли анеуплоидных эмбрионов у пациенток старше 39 лет.

Таким образом, было принято решение о делении пациенток позднего репродуктивного возраста на 2 группы:

- Группа А- пациентки в возрасте < 39 лет.
- Группа Б- пациентки в возрасте ≥ 39 лет.

Клинико-anamнестические и лабораторные данные пациенток в когортах групп, а также характеристика оогенеза и эмбриогенеза, представлены ниже, в главах 3.1.1. - 3.4.1.

3.1.1. Клинико-anamнестические данные исследуемых групп

Все пациентки, включенные в настоящее исследование, были сопоставимы по росту, индексу массы тела. Возраст, антропометрические данные пациенток представлены в таблице 14.

Таблица 14

Общая характеристика пациенток

Показатели	Группа А (n = 93)	Группа Б (n = 68)	p
Возраст (лет)	36,6±1,5	40,8±1,4	0,04
Индекс массы тела, кг/м ²	21,6±1,7	22,9±2,1	0,631
Рост, см	166,8±5,7	166,3±5,4	0,949

Среднее±стандартное отклонение, t-тест

Данные о менструальной функции (возраст менархе, продолжительность менструального цикла, количество дней менструального кровотечения, частота нарушений менструального цикла) представлены в таблице 15. Менструальная функция не отличалась у пациенток обеих групп.

Таблица 15

Характеристика менструальной функция исследуемых групп пациенток

Параметры	Группа А (n = 93)	Группа Б (n = 68)	р
Возраст менархе, лет*	12,9±1,0	13,2±1,5	0,868
Длительность менструального цикла, дней*	28,2±1,4	25,1±1,2	<u>0,09</u>
Продолжительность менструального кровотечения, дней*	5,0±1,2	4,6±1,0	0,798
Регулярный цикл**	96% (89)	92% (63)	0,406
Нерегулярный цикл**	4% (4)	8% (5)	
Безболезненный цикл**	68% (63)	66% (45)	0,835
Болезненный цикл**	32% (30)	34% (23)	
Скудное менструальное кровотечение**	11% (10)	15% (10)	0,285
Умеренное менструальное кровотечение**	81% (75)	73% (50)	
Обильное менструальное кровотечение**	8% (8)	12% (8)	

*Среднее±стандартное отклонение, t-тест

**Данные представлены как % и абсолютные значения, χ^2 -тест

Данные о частоте встречаемости и структуре экстрагенитальных заболеваний у пациенток, включенных в исследование, представлены в таблице 16. Не было выявлено разницы между группами пациенток. Как описано выше (глава 3.1), в настоящем исследовании наиболее распространенными соматическими заболеваниями были заболевания сердечно-сосудистой системы – вегетососудистая дистония по гипертоническому типу и аллергические заболевания – аллергические

реакции на лекарственные препараты, проявляющиеся сыпью по типу крапивницы, поллиноз и атопический бронхит. Заболевания мочевыделительной системы были представлены хроническим циститом, хроническим пиелонефритом, мочекаменной болезнью; эндокринной системы - в основном аутоиммунным гипотиреозом; заболевания желудочно-кишечного тракта - хроническим гастритом и хроническим некалькулезным холециститом; заболевания дыхательных путей были представлены в основном хроническим тонзиллитом, хроническим бронхитом и трахеитом. На момент проведения программы ЭКО, все заболевания были в стадии ремиссии или медикаментозной компенсации

Таблица 16

Структура и частота соматических заболеваний пациенток обеих групп

Показатели	Группа А n = 93	Группа Б n = 68	p
Заболевания сердечно-сосудистой системы	9,6% (9)	20,5% (14)	0,051
Аллергические заболевания	15% (14)	19,1% (13)	0,496
Заболевания мочевыделительной системы	6,4% (6)	14,7 % (10)	0,084
Эндокринные заболевания	9,6% (9)	11,7% (8)	0,671
Заболевания желудочно-кишечного тракта	7,5% (7)	13,2% (9)	0,232
Заболевания дыхательных путей	4,3% (4)	8,8% (6)	0,241

Данные представлены как % и абсолютные значения, χ^2 -тест

Оперативные вмешательства по поводу экстрагенитальных заболеваний (острый аппендицит, калькулезный холецистит и др.) были проведены в обеих группах. Из группы А – у 3 (3,2%) пациенток, из группы Б – у 4 (5,8%) пациенток ($p = 0,415$).

Структура перенесенных гинекологических заболеваний представлена в таблице 17. Как описано ранее, преобладали воспалительные инфекции, передаваемые половым путем (ИППП) и заболевания органов малого таза (ВЗОМТ). Доля ИППП в анамнезе составила 45,1% в группе А, 48,5% в группе Б. Доля пациенток с ВЗОМТ составила с 30,1% в группе А и 32,3% в

группе Б. Также, значительную долю в структуре перенесенных гинекологических заболеваний занимала патология эндометрия (полип эндометрия, гиперплазия эндометрия без атипии): в группе А - у 29 (31,1%) пациенток, в группе Б - у 32 (47%), высокий процент данной патологии объясняется когортой пациенток позднего репродуктивного возраста, включенных в исследование.

Таблица 17

Структура и частота перенесенных гинекологических заболеваний

Показатели	Группа А n = 93	Группа Б n = 68	p
ВЗОМТ	30,1% (28)	32,3% (22)	0,762
ИППП	45,1% (42)	48,5(33)	0,673
Патология эндометрия	31,1% (29)	47% (32)	0,04
Наружный генитальный эндометриоз I-IIст.	20,4% (19)	22% (15)	0,803
Внутренний генитальный эндометриоз I-IIст.	7,5% (7)	7,3% (5)	0,967
Миома матки малых размеров	17,2% (16)	27,9% (19)	0,103
Доброкачественные заболевания шейки матки	9,6% (9)	10,2% (7)	0,898

% и абсолютные значения, χ^2 -тест

При анализе частоты оперативных вмешательств на органах малого таза статистически значимых различий между группами не было выявлено. Исключением было проведение гистероскопии и отдельного диагностического выскабливания, в группе Б частота проведения гистероскопии и РДВ в анамнезе была статистически выше, чем в группе А ($p = 0,02$). Данные представлены в таблице 18.

Частота и структура перенесенных оперативных вмешательств на органах малого таза

Оперативное вмешательство	Группа А (n = 93)	Группа Б (n = 68)	p
Тубэктомия	20,4% (19)	17,6% (12)	0,659
Сальпингоовариолизис	58% (54)	59% (40)	0,924
Резекция яичников	17,2% (16)	17,6% (12)	0,942
Коагуляция очагов НГЭ	11,8% (11)	10,2% (7)	0,761
Миомэктомия	5,3% (5)	11,7% (8)	0,142
Гистероскопия, РДВ (в том числе диагностическая)	33,3% (31)	51,4% (35)	0,02

% и абсолютные значения, χ^2 -тест

Продолжительность бесплодия между группами статистически значимо не различалась и составляла $6,3 \pm 3,2$ в группе А, и $7,5 \pm 4,7$ в группе Б ($p = 0,8$). В обеих исследуемых группах превалировало вторичное бесплодие над первичным. Соотношение первичного и вторичного бесплодия между группами статистически значимо не отличалось ($p > 0,05$) (таблица 19).

Таблица 19

Соотношение первичного и вторичного бесплодия

Бесплодие	Группа А (n = 93)	Группа Б (n = 68)
Первичное	38,7% (36)	33,8% (23)
Вторичное	61,3% (57)	66,2% (45)

Не было выявлено статистически значимой разницы между факторами бесплодия исследуемых групп (Таблица 20).

Распределение факторов бесплодия

Факторы бесплодия	Группа А (n = 93)	Группа Б (n = 68)	<i>p</i>
Трубно- перитонеальный	29(31,2%)	20(29,4%)	0,810
Мужской	24 (25,8%)	18 (26,5%)	0,925
Сочетанный	25 (26,9%)	16(23,5%)	0,630
Наружный генитальный эндометриоз, I-IIст	9(9,7%)	10(14,7%)	0,329
Неясного генеза	15(16,1%)	14(20,8%)	0,883

% и абсолютные значения, χ^2 -тест

При оценке акушерского анамнеза пациенток с вторичным бесплодием, выявлена статистически значимая разница в показателях самопроизвольных выкидышей на ранних сроках в группе Б по сравнению с группой А ($p=0,03$). Подробно данные акушерского анамнеза представлены в таблице 21.

Таблица 21

Акушерский анамнез пациенток с вторичным бесплодием

Исходы беременностей	Группа А (n=93)	Группа Б (n=68)	<i>p</i>
Трубная беременность	33,3% (19)	25% (11)	0,328
Самопроизвольное прерывание беременности до 12 недель	19,2% (11)	37,7% (17)	0,03
Медицинский аборт	15,7% (9)	6,6% (3)	0,156
Роды	31,5% (18)	31,1% (14)	0,960

% и абсолютные значения, χ^2 -тест

В группе А настоящая попытка ЭКО в 52,6% случаев являлась второй, что статистически выше, чем в группе Б – 32,3% ($p=0,01$). Лечение в третьем и более протоколе ЭКО/ИКСИ начали 55,9% пациенток группы Б, что

говорит о статистически значимой разнице по сравнению с группой А - 35,4% ($p=0,02$). Первый протокол стимуляции проходили лишь 12% пациенток из группы А и 11,8% - из группы Б (таблица 22).

Таблица 22

Число попыток ЭКО/ИКСИ в анамнезе

Попытка ЭКО/ИКСИ	Группа А (n=93)	Группа Б (n=68)	<i>p</i>
Первая	12% (11)	11,8% (8)	0,991
Вторая	52,6% (49)	32,3% (22)	0,01
Третья и более	35,4% (33)	55,9% (38)	0,02

% и абсолютные значения, χ^2 -тест

3.2.1. Данные лабораторных исследований пациенток в когортах исследуемых групп

Перед проведением программы ЭКО с ПГТ-А супружеским парам было проведено полное клинико-лабораторное обследование, согласно приказу №107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению". Противопоказаний для проведения программы ЭКО ни у одной из исследуемых пар выявлено не было.

С целью оценки репродуктивного потенциала пациенток, включенных в исследование, было проведено определение параметров исходного гормонального статуса в период ранней фолликулярной фазы (3-5 день менструального цикла) (Таблица 23). Пациентки группы Б имели более низкий уровень АМГ, также отмечалась тенденция к более высокому уровню базального ФСГ в группе Б.

Гормональный статус пациенток

Показатели	Группа А (n=93)	Группа Б (n=68)	<i>p</i>
АМГ, нг/мл	2,4±0,6	0,9±0,3	0,02
ФСГ, МЕ/л	7,3±2,4	12,5±2,0	<u>0,09</u>
ЛГ, МЕ/л	4,7±2,3	5,4±2,0	0,818
Эстрадиол, пмоль/л	130,1±40,5	92,7±35,4	0,487
ТТГ, мЕд/л	1,6±0,7	2,01±0,89	0,717
Тироксин, пмоль/л	14,2±2,9	13,8±3,1	0,925
Пролактин, мЕд/л	331,0±115,2	298,1±109,6	0,836
17-ОП, нмоль/л	2,3±1,6	2,0±1,3	0,884
ДГЭАС, мкмоль/л	5,0±2,3	4,9±2,2	0,974
Тестостерон, нмоль/л	1,6±0,8	1,2±0,7	0,707
Кортизол, нмоль/л	374±89,6	291±76,6	0,482
СТГ, мМЕ/л	3,5±2,6	3,7±2,8	0,958

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест

3.3.1. Особенности лечения в программе ЭКО с ПГТ-А у пациенток позднего репродуктивного возраста в когортах исследуемых групп

При анализе данных лечебного цикла не было выявлено статистически значимых различий в назначении человеческого менопаузального и рекомбинантных гонадотропинов как внутри группы, так и между группами. Средняя суммарная доза гонадотропинов была выше во группе Б (≥ 39 лет), чем в группе А (<39 лет), $2601 \pm 370,6$ МЕ и $1620,3 \pm 262,1$ МЕ, соответственно, ($p=0,03$). Продолжительность лечения в группе А была статистически значимо ниже, чем во группе Б, $9,5 \pm 1,2$ и $12,8 \pm 1,1$ дней, соответственно, $p=0,04$.

3.4.1. Характеристика оогенеза и раннего эмбриогенеза возрастных групп

В таблице 24 представлены параметры оогенеза исследуемых групп. Показатели общего числа ооцитов, полученных в день трансвагинальной пункции яичников, были статистически значимо выше в группе А по сравнению с группой Б ($p=0,04$). Также, наблюдалась значимая разница в числе зрелых ооцитов (МП) между группами ($p=0,02$). Количество нормально оплодотворившихся ооцитов было статистически выше в группе А, по сравнению с группой Б, $8,1\pm 1,9$ и $3,3\pm 1,0$, соответственно ($p=0,02$). При морфологической оценке эмбрионов третьих суток развития не было выявлено статистически значимых различий между исследуемыми группами.

Таблица 24

Особенности оогенеза и эмбриогенеза исследуемых групп

Параметры	Группа А (n=93)	Группа Б (n=68)	<i>p</i>
Общее количество ооцитов *	$9,7\pm 2,2$	$4,7\pm 1,2$	0,04
Среднее число ооцитов МП *	$9,0\pm 2,0$	$3,9\pm 1,1$	0,02
Среднее число нормально оплодотворившихся ооцитов (2PN)*	$8,1\pm 1,9$	$3,3\pm 1,0$	0,02
Частота оплодотворения (%)**	78,4%	72,6%	0,328
Морфологическая оценка эмбрионов на 3-и сутки (баллы) *	$2,7\pm 0,3$	$2,2\pm 0,7$	0,512
Среднее число бластоцист на пациентку *	$5,3\pm 1,1$	$2,1\pm 0,6$	0,012
Среднее число бластоцист отличного/хорошего качества, пригодных для биопсии*	$4,2\pm 0,9$	$1,5\pm 0,6$	0,01
Среднее число эуплоидных эмбрионов*	$3,1\pm 0,8$	$0,7\pm 0,3$	0,005

*Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение на 1 пациентку, t-тест.

** Данные представлены как %, χ^2 -тест

Общее количество бластоцист было статистически выше в группе А (пациентки <39 лет), чем в группе Б (пациентки ≥39 лет), $5,3 \pm 1,1$ и $2,1 \pm 0,6$, соответственно ($p=0,012$). Также, количество бластоцист отличного/хорошего качества, которых подвергали биопсии трофэктодермы с целью проведения ПГТ-А, было выше в группе А по сравнению с группой Б, $4,2 \pm 0,9$ и $1,5 \pm 0,6$, соответственно ($p=0,01$). Число эуплоидных эмбрионов 5-6 суток развития превалировало в группе пациенток <39 лет: в группе А - $3,1 \pm 0,8$ и в группе Б - $0,7 \pm 0,3$ ($p=0,005$).

Представленные результаты позволяют сделать вывод о том, что возраст 39 лет является пороговым, выше которого происходит значимое снижение полученных ооцитов, а также количества, морфологического качества и плоидности бластоцист. Для изучения генеза возрастного влияния на качество и количество ооцитов, а также эмбрионов, нами было проведено исследование копийности мтДНК в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы пациенток позднего репродуктивного возраста.

ГЛАВА 4. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОГРАММЫ ЭКО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОПИЙНОСТИ мтДНК В КЛЕТКАХ КУМУЛЮСА И ТРОФЭКТОДЕРМЫ

4.1. Изучение копииности митохондриальной ДНК в кумулюсных клетках, полученных из ооцит-кумулюсных комплексов пациенток позднего репродуктивного возраста

Для решения задачи 2 было изучено 454 ооцит-кумулюсных комплексов, полученных у 67 пациенток позднего репродуктивного возраста, средний возраст, которых составил $37,8 \pm 2,1$ лет. Среднее значение уровня антимюллерова гормона (АМГ) в крови составило $2,66 \pm 1,09$. Более подробно когорта пациенток, вошедших в исследование, описана в таблице 25.

Таблица 25.

Общая характеристика пациенток (n = 67)

Возраст (лет)	$37,8 \pm 2,1$
Индекс массы тела, $\text{кг}/\text{м}^2$	$22,3 \pm 1,5$
Базальный уровень ФСГ, мЕд/мл	$6,5 \pm 3,0$
Базальный уровень ЛГ, мЕд/мл	$4,7 \pm 3,0$
Базальный уровень E2, пмоль/л	$116,4 \pm 135$
АМГ, нг/мл	$2,66 \pm 1,09$
Средняя суммарная доза гонадотропинов, МЕ	$2778,5 \pm 835,3$
Продолжительность лечения (дней)	$10 \pm 1,8$

Среднее \pm стандартное отклонение

Результаты, полученные с использованием праймеров к генам МТ-ND2 и МТ-ND4, были полностью идентичны, что свидетельствует об отсутствии в кумулюсных клетках, исследуемой когорты пациенток, крупных *del* mtDNA, включающих ген МТ-ND4.

Была выявлена отрицательная корреляция между средним уровнем мтДНК в КК и возрастом пациенток ($r = - 0,542$, $p = 0,008$) (Рисунок 4). Соответственно, по мере увеличения возраста отмечалось снижение копийности мтДНК в КК. Стоит отметить, что в нашем исследовании возраст 39 лет являлся пороговым возрастом, при котором копийность мтДНК в КК снижалась в 1,5 раза, по сравнению с пациентками в возрастном диапазоне 35 – 38 лет. Средний уровень мтДНК в КК пациенток <39 лет ($n=34$) составил 340 ± 38 , средний уровень мтДНК в КК пациенток ≥ 39 лет ($n=33$) составил 251 ± 23 , разница между группами была статистически значима ($p=0,03$)

Кроме того, относительные показатели копийности мтДНК в КК коррелировали с уровнем АМГ в сыворотке крови ($r = 0,639$, $p = 0,003$) (Рис.8). Учитывая, что корреляция уровня мтДНК в КК с уровнем АМГ была сильнее, было принято решение разделить группы не по возрасту, а по уровню АМГ. При разделении выборки по группам в соответствии со значением АМГ, не наблюдалось статистически значимых различий в распространенности экстрагенитальных и гинекологических заболеваний, ИМТ, возрасте, суммарной дозе гонадотропинов, продолжительности лечения (таблица 16). Уровень АМГ в группе I составил $3,2\pm 1,1$ нг/мл, в группе II- $0,7\pm 0,3$ нг/мл ($p = 0,02$) (таблица 26). Копийность мтДНК в КК, полученных у пациенток с уровнем АМГ более 1 нг/мл была статистически значимо выше, чем в группе II ($369(203;696)$ и $210(98;597)$ в группе I и II, соответственно, $p=0,001$) (Рисунок 5). Число зрелых ооцитов было ниже в группе II по сравнению с группой I ($4,2\pm 0,8$ и $6,5\pm 0,5$ в группе I и II, соответственно, ($p = 0,01$).

Сравнительная характеристика пациенток между группами по уровню АМГ крови.

Показатели	Группа I - АМГ>1 (n = 251)	Группа II- АМГ<1 (n = 203)	p
Возраст (лет)	36,1 ±1,3	38,9±1,8	p = 0,2*
Индекс массы тела, кг/м ²	22,5±3,5	22,1±1,7	p = 0,9*
Средняя суммарная доза гонадотропинов, МЕ	2862,9±838,6	2396,6±708,6	p = 0,6**
Продолжительность лечения (дней)	10,4±1,8	9,5±1,5	p = 0,7*
Базальный уровень ФСГ, мЕд/мл	5,2±1,1	9,1±1,6	p = 0,04*
Базальный уровень ЛГ, мЕд/мл	5,0±2,8	7,9±2,3	p = 0,4**
Базальный уровень Е2, пмоль/л	187,8±92,7	134,1±63,2	p = 0,6**
Число зрелых ооцитов	6,5±0,5	4,2±0,8	p = 0,01*
АМГ, нг/мл	3,2±1,1	0,7±0,3	p = 0,02**

Данные представлены как среднее ±стандартное отклонение, *t-тест; ** U-тест Манна-Уитни

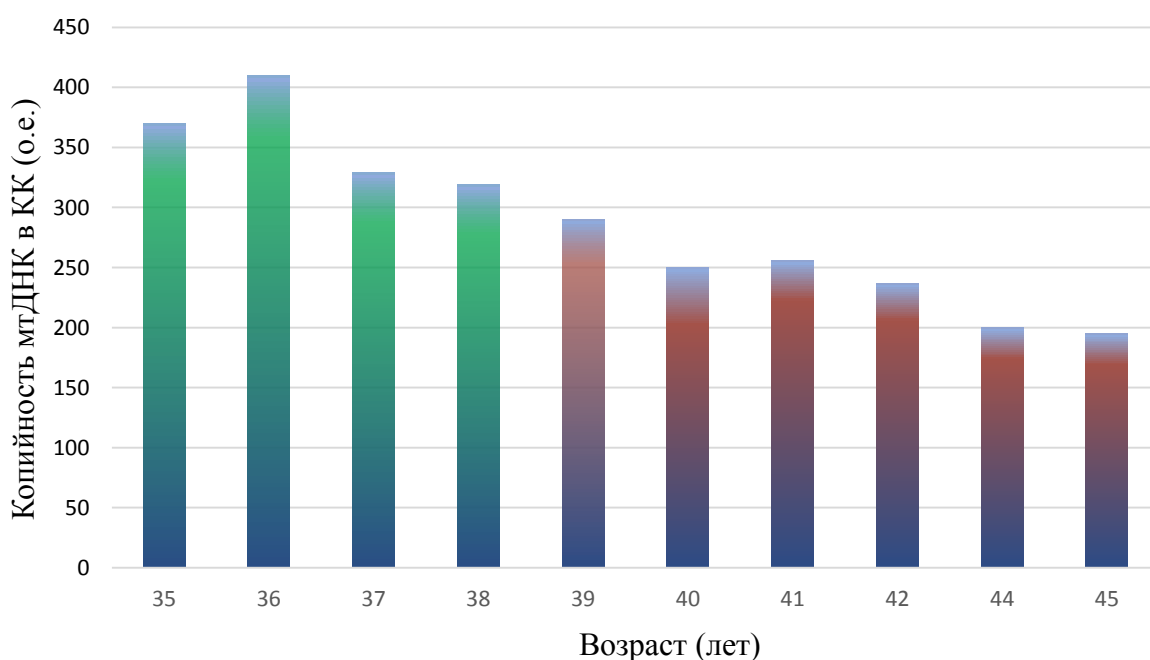


Рисунок 4. Корреляция уровня мтДНК в КК с возрастом пациенток.

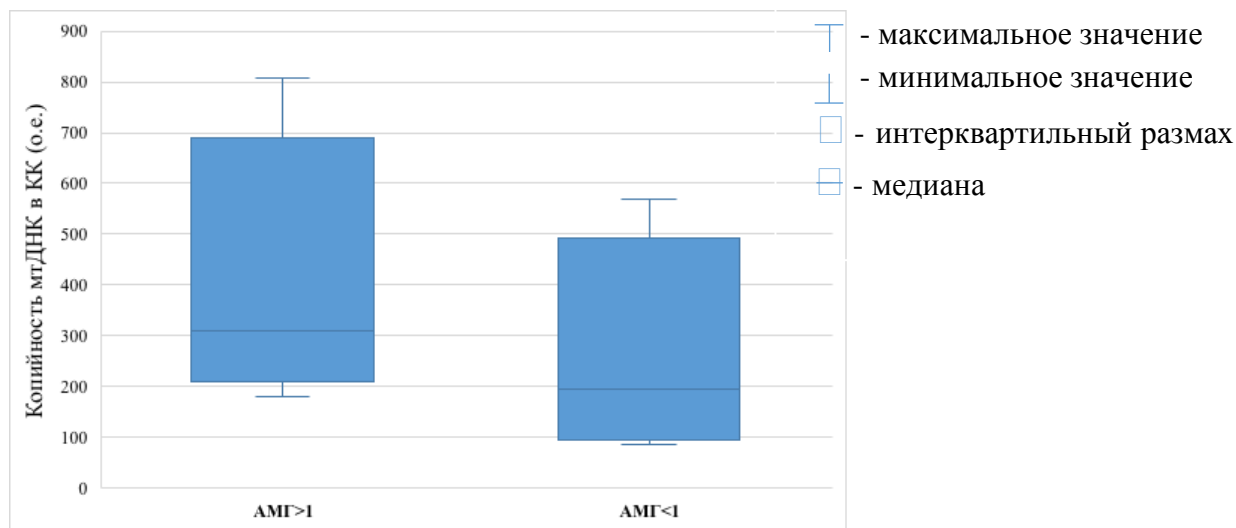


Рисунок 5. График, отражающий зависимость среднего уровня мтДНК в КК (о.е.) от показателей АМГ(нг/мл).

В данном исследовании не обнаружена связь между содержанием мтДНК КК и зрелостью или частотой оплодотворения ооцитов. Также, в нашем исследовании не было выявлено статистически значимой связи между уровнем мтДНК в КК и морфологической оценкой эмбрионов 5-6 суток развития ($p = 0,7$). Кроме того, не наблюдалось различий в уровнях мтДНК в КК и плоидностью эмбрионов: 3560.е. и 325 о.е., для эуплоидных и анеуплоидных бластоцист, соответственно ($p > 0,05$) Однако была выявлена тенденция к снижению копийности мтДНК между группой имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов, 390 ± 40 и 299 ± 32 , соответственно ($p = 0,08$).

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что снижение копийности мтДНК в кумулюсных клетках ассоциировано с пороговым возрастом старше 39 лет и уровнем АМГ менее 1 нг/мл, и свидетельствует о снижении овариального резерва.

4.2 Анализ эффективности программ ЭКО на основании определения копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов

Для решения задач 3,4, и 5 была включена в исследование 161 пациентка позднего репродуктивного возраста. Как сообщалось в главе 3.4., где подробно описана когорта женщин, вошедших в исследование, все пациентки были разделены на 2 группы: группа А пациентки в возрасте <39 лет (n=93) и группа Б - пациентки в возрасте ≥ 39 лет (n=68). В общей когорте пациенток при проведении генетического анализа 473 эмбрионов методом aCGH, 252 бластоцисты были диагностированы как эуплоидные, 221- как анеуплоидные. Из 324 эмбрионов группы А, 194 (59,8%) бластоцисты были диагностированы как эуплоидные, и 130 как анеуплоидные (40,2%). В группе Б из 149 эмбрионов, лишь 58 (39%) были эуплоидными и 91(61%)-анеуплоидными. Таким образом, в группе А число эуплоидных бластоцист в 2,3 раза выше, чем в группе Б (ОШ 2,3 (95%ДИ: 1,57; 3,48), $p < 0,001$).

По результатам исследования была выявлена положительная корреляционная связь относительного уровня мтДНК в трофэктодерме эмбрионов с возрастом пациенток ($r=0,483$, $p=0,003$). Также, выявлена статистически значимая разница в копийности мтДНК трофэктодермы между группами. В группе А уровень мтДНК был ниже, чем в группе Б, 0,003 (0,000495; 0,01) и 0,004 (0,001; 0,02), соответственно ($p=0,03$). (Рисунок 6)

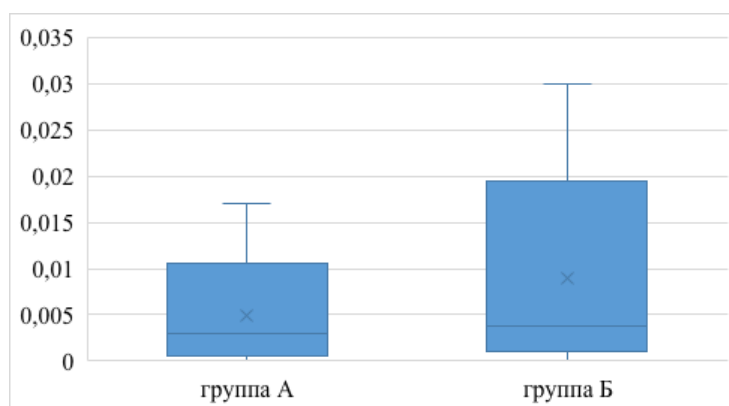


Рисунок 6. График, отражающий зависимость среднего уровня мтДНК в трофэктодерме (о.е.) от возраста (лет) исследуемых группах пациенток. Линия в середине «ящика» - медиана (50-й процентиль), границы «ящика» - первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля). Концы «усов» соответствуют минимальному и максимальному значениям, $p=0,03$ (тест Манна-Уитни).

Кроме того, помимо положительной корреляции уровня мтДНК в трофэктодерме с возрастом, была выявлена статистически значимая отрицательная связь копийности мтДНК с уровнем АМГ ($r=-0,567$, $p=0,006$) (Рисунок 7).

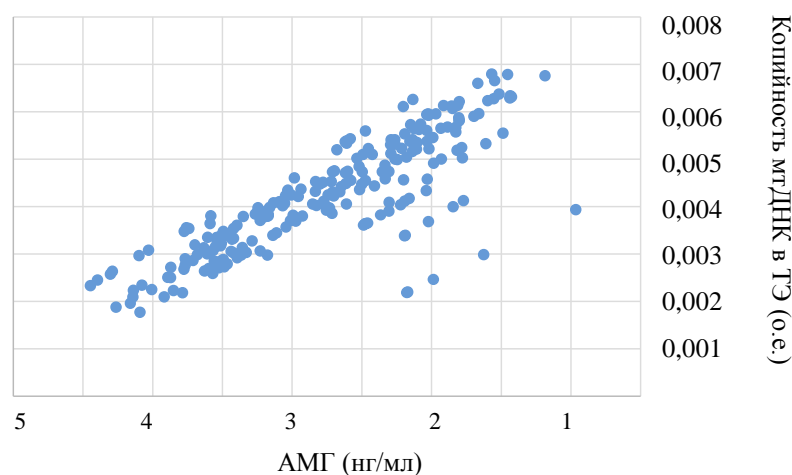


Рисунок 7. Корреляция копийности мтДНК в ТЭ (о.е.) и уровня АМГ крови (нг/мл).

Однако, не было выявлено корреляции между уровнем мтДНК в трофэктодерме бластоцист и их морфологической оценкой согласно классификации Гарднера ($p=0,192$). Также, не наблюдалось статистически значимых различий в уровнях мтДНК между эмбрионами мужского и женского пола ($p=0,623$).

Оценив уровни мтДНК в трофэктодерме бластоцист методом ПЦР в режиме реального времени было выявлено, что среди анеуплоидных эмбрионов ($n=221$) уровень мтДНК был статистически выше – $0,00459 \pm 0,0005$, чем в трофэктодерме эуплоидных бластоцист ($n=252$) – $0,00246 \pm 0,0003$ ($p=0,003$) (Рисунок 8).

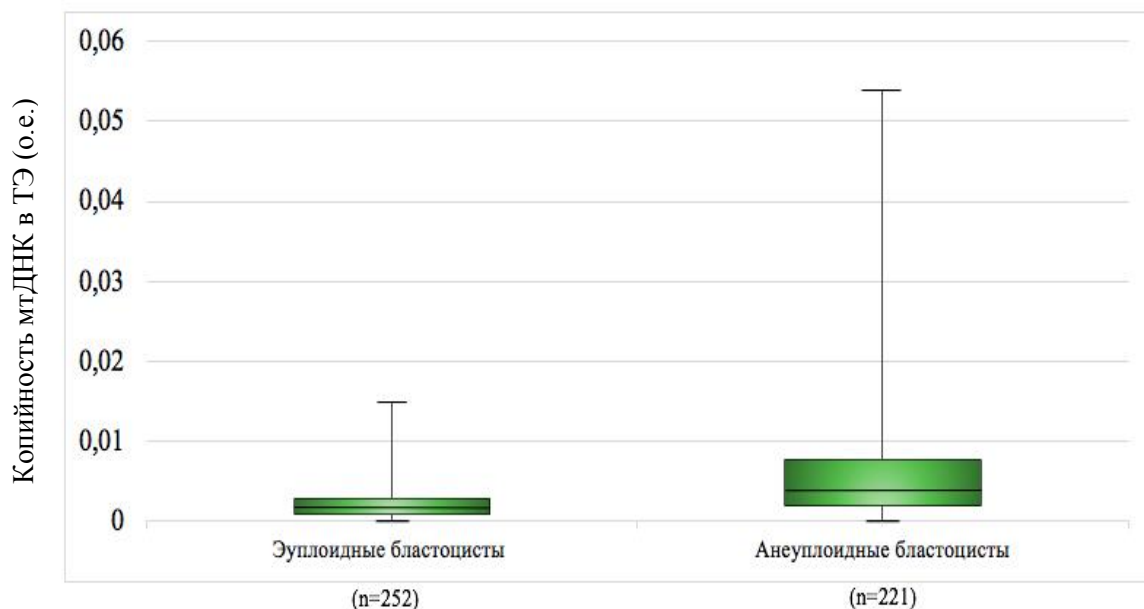


Рисунок 8. Коробочный график, отражающий средний уровень мтДНК (о.е.) в трофэктодерме эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов.

Важно отметить, что в настоящем исследовании копияность мтДНК изменялась с возрастом как в трофэктодерме эуплоидных, так и анеуплоидных эмбрионов (Рисунок 9). Средняя копияность мтДНК в ТЭ эуплоидных эмбрионов ($n=194$) группы группа А составила $0,00259$ ($0,00012$), в то время как уровень мтДНК в ТЭ эуплоидных эмбрионов ($n=58$) группы Б- $0,00308$ ($0,00018$), что является статистически значимой

разницей ($p=0,02$). Среди анеуплоидных эмбрионов ($n=91$) группы Б наблюдалась тенденция к более высоким показателям копийности мтДНК в ТЭ по сравнению с генетически аномальными эмбрионами ($n=130$) группы А, $0,00397(0,00078)$ и $0,00608(0,0008)$, соответственно ($p=0,06$).

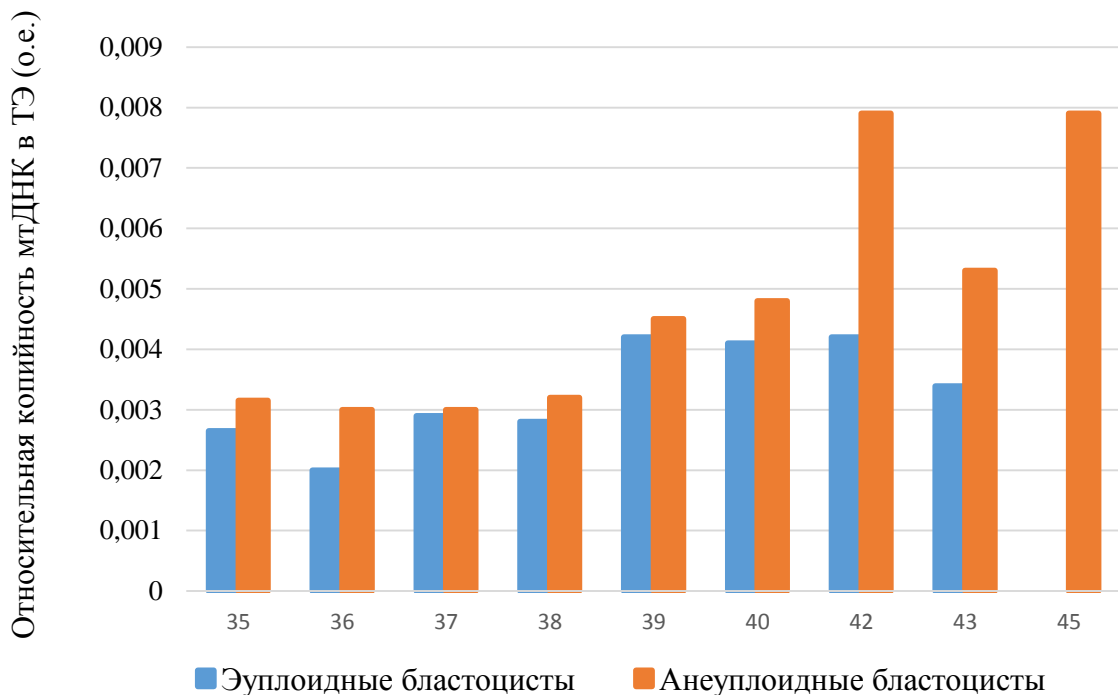


Рисунок 9. Копийность мтДНК (о.е.) в зависимости от возраста (лет) пациенток и плоидности эмбрионов.

Важным этапом настоящей работы была оценка исходов программ ВРТ на основании ПГТ-А и определения копийности мтДНК.

Произведен перенос 186 эуплоидных бластоцист в полость матки. Из них 99 привели к беременности (99/186), частота наступления клинической беременности составила 53,2%. Доля прерванных беременностей до 12 недель гестации - 12 (12,1%). На момент исследования 81 (43,5%) беременности закончились родами. Было зафиксировано 6 (3,2%) биохимических беременностей.

При применении ROC анализа было установлено пороговое значение уровня мтДНК, составившее 0,004о.е., превышение которого предвещало неудачу имплантации с чувствительностью 80,5% и специфичностью 100%,

площадь под ROC- кривой составила 0,857, что говорит о высокой прогностической силе (Рисунок 10).

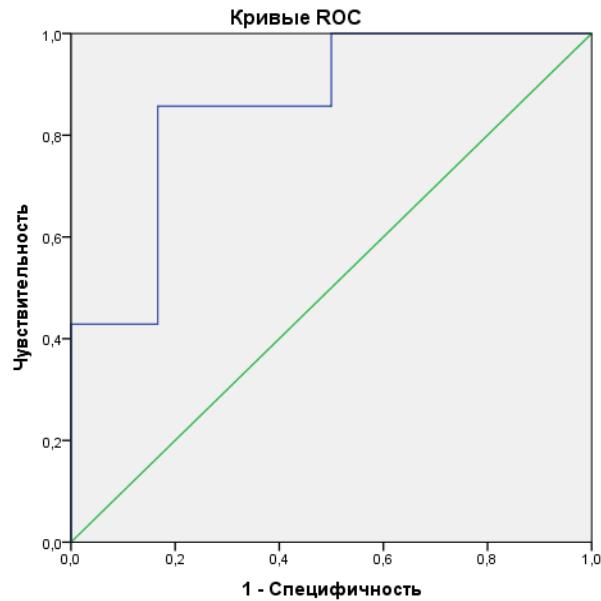


Рисунок 10. ROC-кривая вероятности отсутствия имплантации эуплоидных бластоцист с надпороговым значением мтДНК в ТЭ.

Из общего числа перенесенных эмбрионов у 123 бластоцист уровень мтДНК был ниже выявленного порогового значения, таким образом, частота имплантации для эуплоидных эмбрионов с подпороговым уровнем мтДНК составила 80,5% (99/123) (95% ДИ: 0,710-0,97). В то время как, не зарегистрировано ни одного случая успешной имплантации эуплоидной бластоцисты с уровнями мтДНК выше установленного порогового значения (χ^2 с поправкой Йейтса = 105,2, $p < 0,001$) (Таблица 27).

Количество эуплоидных бластоцист с нормальным и повышенным уровнем мтДНК в ТЭ

Клинический исход после переноса 1 размороженного эмбриона	Количество перенесенных эуплоидных бластоцист (n=186)	Количество эуплоидных бластоцист с подпороговым уровнем мтДНК (n=123)	Количество эуплоидных бластоцист с надпороговым уровнем мтДНК (n=63)
Беременность	99(53,2%)	99(79,8%)	0 (0%)
Нет беременности	87 (46,8%)	24(19,5%)	63 (100%)

У 12 пациенток беременность прервалась на ранних сроках гестации, у 6- зарегистрированы биохимические беременности, однако все данные перенесенные эуплоидные эмбрионы имели подпороговый (нормальный) уровень мтДНК в трофэктодерме.

Распределение исходов программ ВРТ по группам приведено в таблице 28. Перенесено 186 эуплоидных эмбрионов в полость матки: 144 ПЭ в группе А, 42 - в группе Б. Частота наступления беременности была статистически выше в группе А, чем в группе Б (ОШ 3,3 (95%ДИ: 1,58;6,89), $p=0,002$). Частота клинической беременности, также была статистически значимо выше в группе А, по сравнению с группой Б, 81 (56,25%) и 12 (28,6%), соответственно (ОШ 3,21(95% ДИ: 1,52;6,78), $p=0,02$). Не наблюдалось разницы между группами в частоте наступления биохимической беременности, прерывания беременности до 12 недель гестации и прогрессирующей беременности. Частота живорождения была статистически значимо выше в группе А, по сравнению с группой Б (ОШ 4,8 (95% ДИ: 1,10;12,1), $p=0,02$).

Исходы программ ЭКО с ПГТ-А у пациенток исследуемых групп

Показатель	Группа А (n=93)	Группа Б (n=68)	ОШ (95% ДИ)	p, χ^2
Количество перенесенные эуплоидных эмбрионов в полость матки	144	42	-	0,783
Частота наступления беременности на перенос эмбрионов, абс.(%)	86 (59,7%)	13 (31%)	3,3(1,58;6,89)	0,002
Частота наступления клинической беременности, абс.(%)	81 (56,25%)	12 (28,6%)	3,21(1,52;6,78)	0,002
Частота прерывания беременности до 12 недель гестации, абс(%)	10 (12,3%)	2 (16,7%)	1,4(0,27;7,44)	0,677
Частота биохимических беременностей, абс.(%)	5 (5,8%)	1 (7,7%)	0,39(0,04;3,49)	0,792
Частота прогрессирующих беременностей, абс.(%)	43 (29,86%)	8(19,0%)	1,8(0,77;4,22)	0,167
Частота живорождения, абс.(%)	28 (19,4%)	2 (4,7%)	4,8(1,10;12,1)	0,02

В таблице 29 представлены исходы программ ЭКО с ПГТ-А и уровнем мтДНК в трофэктодерме бластоцист. Из 144 перенесенных эмбрионов группы А, 106 бластоцист были с подпороговым числом мтДНК в ТЭ, 86 (81,1%) из них привели к беременности (86/106), 20 (18,9%) - не имплантировались (20/106). Из 42 перенесенных эмбрионов группы Б, 17 бластоцист имели нормальным (подпороговый) уровень мтДНК в ТЭ, 13 (76,4%) из них привели к беременности (13/17), 4 (23,5%) эмбриона не имплантировались (4/17). Не наблюдалось статистически значимых

различий между группами в числе эуплоидных эмбрионов с нормальным митохондриальным потенциалом ($p=0,653$).

Из 144 ПЭ группы А, 38 (26,3%) бластоцист были с высокими (надпороговыми) значениями мтДНК в ТЭ (38/144). Из 42 ПЭ группы Б, 25 (59,5%) бластоцист имели надпороговые значения мтДНК (25/42). Соответственно, из перенесенных эмбрионов ОШ наличия большего числа бластоцист с надпороговыми уровнями мтДНК в ТЭ составило 4,1 (95%ДИ: 1,99; 8,42), $p<0,001$, что согласуется с ранее полученными результатами о связи копийности мтДНК в ТЭ с возрастом, а также исходами программ ВРТ.

Таблица 29

Исходы программ ЭКО с ПГТ-А и копийности мтДНК в ТЭ

Клинический исход после переноса 1 размороженного эмбриона	Количество перенесенных эуплоидных бластоцист (n=186)		Количество эуплоидных бластоцист с подпороговым уровнем мтДНК (n=123)		Количество эуплоидных бластоцист с надпороговым уровнем мтДНК (n=63)	
	Группа А (n=93)	Группа Б (n=68)	Группа А (n=93)	Группа Б (n=68)	Группа А (n=93)	Группа Б (n=68)
Беременность	99(53,2%)		99(80,5%)		0 (0%)	
	86 из 144ПЭ (59,7%)	13 из 42ПЭ (30,9%)	86 из 106 с подпороговыми значениями (81,1%)	13 из 17 с подпороговыми значениями (76,4%)	0(0%)	0(0%)
Нет беременности	87 (46,8%)		24(19,5%)		63 (100%)	
	58 из 144ПЭ (40,2%)	29 из 42ПЭ (69%)	20 из 106 с подпороговыми значениями (18,9%)	4 из 17 с подпороговыми значениями (23,5%)	38 из 38(100%)	25 из 25(100%)

Кроме того, с целью определения порогового возраста изменения митохондриального биогенеза было проведено сравнение доли всех

полученных эуплоидных эмбрионов, а не только описанных выше, перенесенных в полость матки blastocyst, с подпороговыми и надпороговыми значениями мтДНК в трофэктодерме. При этом, пороговым возрастом оказался возраст 39 лет. Площадь под ROC кривой составила 0,659, с чувствительностью 53,4% и специфичностью 89,4%. ОШ наличия эмбрионов с надпороговыми значениями мтДНК в трофэктодерме составило 4,9 (95%ДИ: 2,03;8,59), $p < 0,001$. (Рисунок 11)

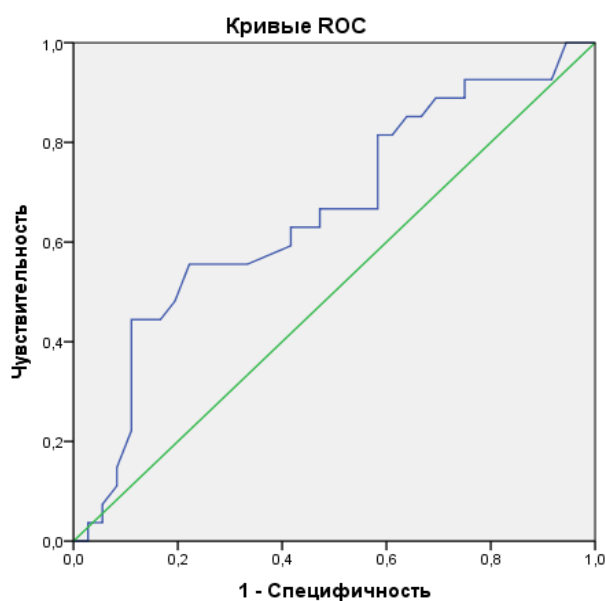


Рисунок 11. ROC-кривая вероятности увеличения доли эмбрионов с надпороговыми уровнями мтДНК у пациенток старше 39 лет.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что определение копийности мтДНК в трофэктодерме blastocyst, в совокупности с проведением преимплантационного генетического тестирования эмбрионов, является надежным методом селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом, который позволяет увеличить эффективность лечения бесплодия в программах ЭКО. Пороговое значение копийности мтДНК в ТЭ, превышение которого, позволят прогнозировать неудачу имплантации, является 0,004 о.е

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день вопросы реализации репродуктивной функции женщин позднего репродуктивного возраста особенно актуальны, учитывая тенденцию к позднему замужеству и деторождению, в связи с инверсией социального положения женщин в большинстве стран мира.

Возрастное снижение овариального резерва характеризуется уменьшением количества антральных фолликулов по данным ультразвукового исследования, увеличением уровня фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и снижением уровня антимюллера гормона (АМГ) в сыворотке крови. Зачастую, независимо от паспортного возраста, низкий овариальный резерв ассоциируется с процессами, наблюдаемыми при старении яичников, такими как увеличение количества анеуплоидных эмбрионов, снижение оплодотворяющей способности и высокие показатели потери беременности на различных сроках гестации [78,79,80,81]. Постепенное снижение фертильности с возрастом характеризуется количественным и качественным изменениями ооцитов [82]. Считается, что определяющими показателями процессов истощения фолликулярного пула с возрастом являются его исходный размер и скорость процессов атрезии фолликулов, в которых митохондрии играют важную роль. Содержание мтДНК ооцитов формируется за счет стохастического распределения молекул мтДНК во время деления оогониев, данное случайное распределение мтДНК среди различных ооцитов может привести к появлению клеток, содержащих перестройки мтДНК. Соответственно, происходит изменения функционирования митохондрий ооцитов с мутантными мтДНК, что, как предполагается, запускает процесс фолликулярной атрезии, элиминируя первичные ооциты, несущие мутации мтДНК. Другим спорным вопросом остается причина снижения качества ооцитов у женщин позднего репродуктивного возраста. В мировой

литературе имеется большое количество гипотез, среди которых главенствующую роль занимает окислительный стресс, нарушение микроциркуляции, гипоксические процессы в фолликулярной жидкости [53,83]. Однако последнее время появляется все больше публикаций, указывающих на взаимосвязь возрастного снижения качества ооцитов с митохондриальной дисфункцией [7]. Предполагается, что исходное количество митохондрий и мтДНК может определять энергетический потенциал ранних эмбрионов, до третьих суток развития, так как на данной стадии эмбриогенеза отсутствует репликация мтДНК. Полноценная репликация мтДНК начинается на стадии бластоцисты (пятидневного эмбриона), когда увеличивается потребность в энергии для последующего успешного деления, что в свою очередь определяет как хромосомный статус, так и имплантационный потенциал бластоцист [26,69,70].

В настоящем исследовании был проведен анализ основных факторов, которые влияют на снижение фертильности пациенток позднего репродуктивного возраста. На первом этапе исследования был проведен анализ параметров фолликуло-, оо- и эмбриогенеза, на основании чего был установлен пороговый возраст среди всей когорты пациенток старшего репродуктивного возраста, при достижении которого снижались все исследованные параметры.

В группе пациенток ≥ 39 лет (группа Б) в анамнезе чаще встречалась патология эндометрия (полип эндометрия, гиперплазия эндометрия без атипии), чем в группе А (< 39), в группе Б - 32 (47%) и в группе А - 29 (31,1%) пациенток ($p=0,04$). Соответственно, доля гистероскопий с отдельным диагностическим выскабливанием также была статистически значимо выше в группе Б, чем в группе А, 35 (51,4%) и 31 (33,3%) ($p=0,02$). В структуре акушерского анамнеза у пациенток группы Б по сравнению с группой А чаще встречалось самопроизвольное прерывание беременности до 12 недель гестации ($p=0,03$). Что вполне объяснимо, учитывая разницу в возрасте пациенток обеих групп.

В группе А настоящая попытка ЭКО в 52,6% случаев являлась второй, что статистически выше, чем в группе Б – 32,3% ($p=0,01$), в большей степени за счет того, что у пациенток группы Б в анамнезе уже было проведено более 2 программ ЭКО.

При оценке гормонального статуса пациенток обеих групп, была выявлена статистически значимая разница в уровнях АМГ. В группе А АМГ крови был выше, чем в группе Б, $2,4\pm 0,6$ и $0,9\pm 0,3$, соответственно ($p=0,02$). Отмечалась тенденция к увеличению уровня ФСГ в группе Б $12,5\pm 2,0$, по сравнению с группой А $7,3\pm 2,4$ ($p=0,09$).

Наблюдалась значимая разница в числе зрелых ооцитов (МП) между группами ($p=0,02$). Количество нормально оплодотворившихся ооцитов было статистически выше в группе А, по сравнению с группой Б, $8,1\pm 1,9$ и $3,3\pm 1,0$, соответственно ($p=0,02$). При морфологической оценке эмбрионов третьих суток развития не было выявлено статистически значимых различий между исследуемыми группами. Также, общее количество бластоцист было статистически выше в группе А (пациентки <39 лет), чем в группе Б (пациентки ≥ 39 лет), $5,3\pm 1,1$ и $2,1\pm 0,6$, соответственно ($p=0,012$). Количество бластоцист отличного/хорошего качества, которых подвергали биопсии трофэктодермы с целью проведения ПГТ-А, было выше в группе А по сравнению с группой Б, $4,2\pm 0,9$ и $1,5\pm 0,6$, соответственно ($p=0,01$). Число эуплоидных эмбрионов 5-6 суток развития превалировало в группе пациенток <39 лет: в группе А - $3,1\pm 0,8$ и в группе Б - $0,7\pm 0,3$ ($p=0,005$). Таким образом, число эмбрионов, пригодных для переноса в полость матки, выше в группе пациенток <39 лет. Представленные результаты показателей эмбриогенеза, подтверждают, что возраст 39 лет является пороговым, выше которого происходит значимое снижение числа полученных ооцитов, а также количества, морфологического качества и плоидности бластоцист. Для изучения генеза возрастного влияния на качество и количество ооцитов, а также эмбрионов, нами было проведено исследование копийности мтДНК

в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы пациенток позднего репродуктивного возраста.

По результатам исследования уровня мтДНК в клетках кумулюса, была выявлена отрицательная корреляция между средним уровнем мтДНК в КК и возрастом пациенток ($r = -0,542$, $p = 0,008$). Средний уровень мтДНК в КК пациенток <39 лет ($n=34$) составил 340 ± 38 , средний уровень мтДНК в КК пациенток ≥ 39 лет ($n=35$) составил 251 ± 23 , разница между группами была статистически значима ($p=0,04$).

Относительные показатели копийности мтДНК в КК также коррелировали с уровнем АМГ в сыворотке крови ($r = 0,639$, $p = 0,003$). Разделив пациенток по уровню АМГ, (группа I - < 1 нг/мл, группа II > 1 нг/мл), была выявлена статистически значимая разница в уровнях ФСГ, $5,2\pm 1,1$ и $9,1\pm 1,6$, в группе I и II, соответственно ($p=0,04$). А также в числе зрелых ооцитов, группа I - $6,5\pm 0,5$ и группа II - $4,2\pm 0,8$ ($p=0,01$). Копийность мтДНК в КК, полученных у пациенток с уровнем АМГ более 1 нг/мл была статистически значимо выше, чем в группе II ($369(203;696)$ и $210(98;597)$, соответственно, $p=0,001$).

Учитывая полученные результаты исследования уровня мтДНК в клетках кумулюса, можно предположить, что низкая копийность мтДНК, вероятно, отражает возрастное снижение как количества, так и качества ооцитов. Что согласуется с данными Voucret L. et al. (2015), изучавших копийности мтДНК в КК пациенток с нормальным и со сниженным овариальным резервом. При этом, группу «низкого овариального резерва» составляли пациентки, как позднего репродуктивного возраста, так и пациентки с преждевременной недостаточностью яичников. В группе «нормального овариального резерва» уровень мтДНК в КК был статистически выше, чем в группе «низкого овариального резерва» ($p = 0,02$) [74].

В нашем исследовании, также, как и в исследовании A. Taugourdeau et al. (2018), не было выявлено статистически значимой связи копийности мтДНК

в КК с морфологическим качеством бластоцист. Однако, Ogio M. et al. (2016) при ранжировании бластоцист на 2 группы, плохого качества <3BB и хорошего качества 3BB получили статистически значимую разницу в копийности мтДНК между изучаемыми группами ($p < 0.0001$) [7]. В нашем исследовании и в исследовании A. Taugourdeau et al. (2018) эмбрионы 5-6 суток были разделены на 3 группы: отличного, хорошего, плохого качества, что могло повлиять на отсутствие корреляции исследуемых параметров [84]. Также, в проведенном нами исследовании не было выявлено статистически значимой связи между копийностью мтДНК в КК и плоидностью полученных эмбрионов, что согласуется с результатами зарубежных авторов [74,84,85]. Отсутствие корреляции между мтДНК в КК и плоидностью бластоцист отличного и хорошего качества объясняется тем, что в ооцитах имеется достаточное количество митохондрий и мтДНК, которое обеспечивает необходимый уровень энергии для последующего развития эмбрионов до стадии бластоцисты. Однако, мутации в материнских генах, связанных с мейозом или митозом, наследование aberrантной материнской РНК, а также накопленные мутации мтДНК, могут приводить к нарушению сегрегации хромосом и делению клеток, что ведет к возникновению анеуплоидий. Соответственно, сниженная копийность мтДНК и митохондриальный потенциал ооцитов/кумулюсных клеток не всегда является определяющим в развитии анеуплоидии. Интересно, что на этапе изучения уровня мтДНК в трофэктодерме бластоцист, было выявлено статистически значимое увеличение уровня мтДНК в трофэктодерме анеуплоидных эмбрионов по сравнению с эуплоидными ($p = 0,003$) [86]. Что подтверждает предположение об аномальном увеличении мтДНК в клетках трофэктодермы во время эмбриогенеза с целью компенсации дефектного митохондриального пула в конце оогенеза [87]. Кроме того, по результатам нашего исследования выявлена тенденция к статистически значимой связи уровня мтДНК и потенциалом имплантации эмбрионов. Согласно данным A. Taugourdeau et

al. (2018), копияность мтДНК в КК в группе имплантировавшихся эмбрионов значительно выше, чем в группе неимплантировавшихся ($p < 10^{-4}$), таким образом авторы сделали вывод, что количество мтДНК в КК может являться определяющим фактором успешного развития и имплантации эмбрионов. Возможно, отсутствие сильной корреляции между уровнем мтДНК в КК и имплантационным потенциалом зуплоидных бластоцист (390 ± 40 о.е. в группе имплантировавшихся и 299 ± 32 - неимплантировавшихся бластоцист, ($p = 0,08$)) в нашем исследовании связано с меньшим числом перенесенных эмбрионов ($n=51$), по сравнению с A. Taugourdeau et al. ($n=84$). В отечественной и мировой литературе имеется большое количество данных о связи количества мтДНК в КК и ИМТ, а также курением [85,88]. Высокие значения ИМТ связаны с дисфункцией митохондрий и снижением числа копий мтДНК, однако, не было выявлено корреляции с ухудшением качества эмбрионов. У курящих пациенток, наоборот, содержание мтДНК в КК компенсаторно увеличено. Соответственно, определение уровня мтДНК в КК у курящих пациенток и/или пациенток с избыточным ИМТ, не целесообразно, учитывая, что данный метод зависит от индивидуальных особенностей пациенток. Исходя из этого, в настоящее исследование не были включены курящие пациентки и пациентки с высоким ИМТ, тем не менее, несмотря на нивелирование влияния пациент-специфических факторов, не удалось определить пороговый уровень копияности мтДНК в клетках кумулюса, прогнозирующий количество или качество эмбрионов, и их способность к имплантации.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что снижение копияности мтДНК в кумулюсных клетках ассоциировано с пороговым возрастом старше 39 лет и уровнем АМГ менее 1 нг/мл, и свидетельствует о снижении овариального резерва. Определение копияности мтДНК в КК может стать биомаркером старения репродуктивной системы, учитывая, что

паспортный возраст не всегда отражает истинный фертильный потенциал женщин.

По результатам исследования копийности мтДНК в трофэктодерме бластоцист была выявлена положительная корреляционная связь относительного уровня мтДНК в трофэктодерме эмбрионов с возрастом всей когорты пациенток ($r=0,483$, $p=0,003$). Причем в возрасте 39 лет доля генетически нормальных бластоцист с надпороговыми значениями мтДНК в ТЭ в 4,9 раз выше по сравнению с более молодой когортой пациенток (ОШ 4,9 (95%ДИ: 2,03; 8,59), $p < 0,001$). С целью определения данного порогового возраста, было проведено сравнение доли всех эуплоидных эмбрионов с подпороговыми и надпороговыми значениями. Площадь под ROC кривой составила 0,659, с чувствительностью 53,4% и специфичностью 89,4%. При делении на группы, в группе А уровень мтДНК был ниже, чем в группе Б, 0,003 (0,000495; 0,01) и 0,004 (0,001; 0,02), соответственно ($p=0,03$). Кроме того, была выявлена статистически значимая отрицательная связь копийности мтДНК с уровнем АМГ ($r=-0,567$, $p=0,006$). Важно отметить, связь уровней мтДНК в ТЭ и плоидностью полученных эмбрионов, эуплоидные эмбрионы имели статистически значимо низкую копийность мтДНК в ТЭ, по сравнению с анеуплоидными ($p=0,003$). Что интересно, копийность мтДНК изменялась с возрастом как в трофэктодерме эуплоидных, так и анеуплоидных эмбрионов. Средняя копийность мтДНК в ТЭ эуплоидных эмбрионов ($n=194$) группы А составила 0,00259 (0,00012), в то время как уровень мтДНК в ТЭ эуплоидных эмбрионов ($n=58$) группы Б- 0,00308 (0,00018), что является статистически значимой разницей ($p=0,02$). Среди анеуплоидных эмбрионов ($n=91$) группы Б наблюдалась тенденция к более высоким показателям копийности мтДНК в ТЭ по сравнению с генетически аномальными эмбрионами ($n=130$) группы А, 0,00397(0,00078) и 0,00608 (0,0008), соответственно ($p=0,06$).

При оценке исходов программ ЭКО с преимплантационным генетическим тестированием на анеуплоидии у пациенток позднего

репродуктивного возраста, общая частота наступления клинической беременности в настоящем исследовании составила 53,2% (99/186). Однако, изучив уровень мтДНК в трофэктодерме имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов, был определён пороговый уровень мтДНК, составивший 0,004о.е., при превышении которого не наблюдалось ни одного случая имплантации эуплоидных бластоцист (63/63) ($p < 0,001$). В настоящем исследовании частота имплантации для эуплоидных эмбрионов с подпороговым уровнем мтДНК составила 80,5% (99/123) (95% ДИ: 0,710-0,97). Несомненно, стоит учитывать, что 24 эуплоидных эмбриона с подпороговыми (нормальными) уровнями мтДНК не привели к наступлению беременности, однако не всем пациенткам перед проведением программы переноса размороженных эмбрионов проводилась диагностическая гистероскопия. И возможной причиной неудачи имплантации стала патология эндометрия.

Изучив исходы программ ЭКО с ПГТ-А по возрастным группам, что частота наступления беременности была статистически выше в группе А, чем в группе Б (ОШ 3,3 (95%ДИ 1,58;6,89), $p=0,002$). Частота живорождения также была статистически значимо выше в группе А по сравнению с группой Б (ОШ 3,11; 95%, ДИ 1,42;6,80; $p=0,004$), что вполне ожидаемо. В ходе анализа уровней мтДНК в ТЭ между группами А и Б, не наблюдалось статистически значимых различий в числе эуплоидных эмбрионов с нормальным митохондриальным потенциалом ($p=0,653$). Однако, ОШ наличия большего числа бластоцист с надпороговыми уровнями мтДНК в ТЭ в группе Б было в 4,1 раз выше, чем в группе А, что согласуется с ранее полученными результатами о связи копийности мтДНК в ТЭ с возрастом, а также исходами программ ВРТ.

Учитывая полученные результаты, можно сделать предположение, что бластоцисты с повышенными уровнями мтДНК либо испытывают некоторую форму клеточного стресса и требуют дополнительной энергии, либо увеличение митохондрий и мтДНК представляет собой

компенсационный механизм, запускающийся при нарушении функционирования существующих митохондрий, в связи с накоплением мутаций в митохондриальном геноме. Представленные данные согласуются с гипотезой о роли митохондриального биогенеза в имплантационном потенциале эмбрионов. Гипотеза «тихого эмбриона», предложенная Leese (2002), которая предполагает, что жизнеспособный эмбрион имеет относительно низкий или «тихий метаболизм», в то время как эмбрионы, находящиеся под влиянием стресса, и со сниженным потенциалом развития, как правило, метаболически более активны [76]

Группа авторов Fragouli E. et al. (2015, 2017) в своих исследованиях выявили связь между потенциалом к имплантации и уровнем мтДНК в трофэктодерме бластоцист [5,6]. Изначально был установлен пороговый уровень мтДНК в 0,003 о.е., выше которого не наблюдалась имплантация эмбрионов в полость матки. Позднее, в связи с изменением технологии исследования (заменой системы ПЦР-РВ StepOne (ThermoFisher), на аппарат Vii7 ПЦР-РВ (ThermoFisher)), был определен новый пороговый уровень 0,0004 о.е., позволяющий определить имплантационный потенциал эмбриона. В нашем исследовании также удалось определить порог копийности мтДНК -0,004 о.е, превышение которого предвещало неудачу имплантации с чувствительностью 76,8% и специфичностью 74,9%. Разные величины порогового значения, по всей видимости, зависят от технологии определения относительного уровня мтДНК. Так, в нашем исследовании в ПЦР-РВ использовались специально разработанные олигонуклеотиды и TaqMan-пробы для амплификации и количественного определения специфического фрагмента мтДНК (ген MT-ND2 mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2), нормировка осуществлялась на геномную ДНК (ген LTC4S - leukotriene C4 synthase). В исследованиях Fragouli E. et al. (2015, 2017) использовался специально разработанный TaqMan- анализ (AATTTAACTGTTAGTCCAAAGAG, Life Technologies) для выявления и амплификации специфического фрагмента мтДНК (митохондриальной 16S

рибосомальной РНК-последовательности), нормировка осуществлялась на мультикопийную последовательность *Alu* (AGCTACTCGGGAGGCTGAAGGCAGGA, Life Technologies). Тем не менее, по данным всех предыдущие исследований эмбрионы с надпороговыми значениями копийности мтДНК имеют низкий имплантационный потенциал. Кроме того, по данным ряда авторов в трофэктодерме анеуплоидных эмбрионов уровень мтДНК значительно выше, чем эуплоидных [5, 89, 90], что согласуется с результатами нашего исследования, так средние относительные уровни мтДНК статистически значимо выше в трофэктодерме анеуплоидных эмбрионов по сравнению с эуплоидными ($p=0,003$).

В ходе исследования была изучена взаимосвязь между количеством мтДНК и возрастом пациенток. Наши данные расходятся с результатами Santos M. et al. (2017), которые не выявили статистически значимой связи между копийность мтДНК и возрастом пациенток, но сами авторы отмечают отсутствие охвата широких возрастных диапазонов ($38,8 \pm 3,2$) [89]. Наши результаты свидетельствуют о положительной корреляции копийности мтДНК и возраста пациенток ($p=0,0038$). Это является подтверждением гипотезы, выдвинутой коллективами авторов Fragouli E. et al. (2015, 2017) и Ravichandran K. et al., (2017), которая заключается в том, что у пациенток позднего репродуктивного возраста может иметь место компенсаторное увеличение уровня мтДНК в связи с наличием возрастного накопления мутаций в митохондриальном геноме [5, 6, 91].

Кроме того, мы не нашли связи между уровнем мтДНК и морфологическим качеством эмбрионов, в то время как Santos M. et al. (2017) выявили положительную связь между копийность мтДНК в клетках трофэктодермы и морфологической оценкой бластоцист, по результатам исследования уровень мтДНК статистически ниже в бластоцистах «отличного» и «хорошего» качества по классификации Гарднера [89,92].

Большинство хромосомных аномалий происходят из-за ошибок, также часто встречаются в течение первых клеточных делений после оплодотворения (митотическое деление) [33]. Однако, причины высоких уровней ошибок мейоза и митоза все еще до конца не изучены. Исходя из полученных данных, можно сделать предположение, что изменение количества или функциональности мтДНК может иметь влияние на точность сегрегации хромосом.

Исходя из результатов нашего исследования, определение копийности мтДНК в трофэктодерме бластоцист в совокупности с проведением преимплантационного генетического тестирования эмбрионов является надежным методом селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом, который позволяет увеличить эффективность лечения бесплодия в программах ЭКО.

ВЫВОДЫ

1. Возраст 39 лет является пороговым, при превышении которого происходит значимое снижение числа полученных ооцитов, количества и качества бластоцист, а также происходит снижение доли эуплоидных эмбрионов. Это объясняет низкую эффективность программ ЭКО у данной категории пациенток. Так, число полученных ооцитов ($9,7 \pm 2,2$ против $4,7 \pm 1,2$, $p=0,04$, в группе А и Б соответственно), число зрелых ооцитов ($9,0 \pm 2,0$ против $3,9 \pm 1,1$, $p=0,02$, в группе А и Б соответственно), нормально оплодотворившихся ооцитов ($8,1 \pm 1,9$ против $3,3 \pm 1,0$, $p=0,02$, в группе А и Б соответственно), а также общее количество бластоцист ($5,3 \pm 1,1$ против $2,1 \pm 0,6$, $p=0,012$, в группе А и Б соответственно), бластоцист отличного/хорошего качества, пригодных для биопсии трофэктодермы с целью проведения ПГТ-А ($4,2 \pm 0,9$ против $1,5 \pm 0,6$, $p=0,01$, в группе А и Б соответственно) было статистически выше у пациенток моложе 39 лет. Кроме того, число эуплоидных эмбрионов 5-6 суток развития преваляло в когорте пациенток до 39 лет в 2,3 раза (ОШ 2,3 (95%ДИ: 1,57;3,48, $p<0,001$). Таким образом, частота наступления беременности статистически выше в группе пациенток <39 лет, чем в группе ≥ 39 лет (ОШ 3,3; 95%ДИ 1,58;6,89; $p=0,002$). Частота клинической беременности также была статистически значимо выше в группе А, по сравнению с группой Б, 81 (56,25%) и 12 (28,6%), соответственно (ОШ 3,21(95% Д: 1,52;6,78, $p= 0,02$). Частота живорождения была статистически значимо выше в группе А- 28 (19,4%), по сравнению с группой Б- 2 (4,7%) (ОШ 4,8 (95% ДИ: 1,10;12,1, $p=0,02$)).
2. Снижение копийности мтДНК в кумулюсных клетках в большей степени ассоциировано со снижением овариального резерва. Так, по результатам исследования уровня мтДНК в клетках кумулюса, была выявлена отрицательная корреляция между средним уровнем мтДНК в КК и

возрастом пациенток ($r = -0,542$, $p = 0,008$). То есть с увеличением женского возраста, копияность мтДНК в КК снижется. Относительные показатели копияности мтДНК в КК положительно коррелировали с уровнем АМГ в сыворотке крови ($r = 0,639$, $p = 0,003$). Таким образом, снижение копияности мтДНК в кумулюсных клетках ассоциировано с пороговым возрастом старше 39 лет и уровнем АМГ менее 1 нг/мл, что свидетельствует о снижении овариального резерва. Не было выявлено статистически значимой связи копияности мтДНК в КК с морфологическим качеством бластоцист и их плоидностью, следовательно, митохондриальный потенциал ооцитов/кумулюсных клеток не является определяющим в развитии анеуплоидии.

3. Копияности мтДНК в трофэктодерме положительно коррелирует с возрастом пациенток ($r=0,483$, $p=0,003$). В группе пациенток <39 лет уровень мтДНК был ниже, чем в группе ≥ 39 лет, $0,003$ ($0,000495$; $0,01$) и $0,004$ ($0,001$; $0,02$), соответственно ($p=0,03$). Также была выявлена статистически значимая отрицательная связь копияности мтДНК с уровнем АМГ ($r=-0,567$, $p=0,006$). Более того, эуплоидные эмбрионы имели статистически значимо низкую копияность мтДНК в ТЭ, по сравнению с анеуплоидными ($0,00246 \pm 0,003$ и $0,00459 \pm 0,0005$, соответственно, $p=0,003$). Причем уровень мтДНК в ТЭ изменяется с возрастом как в трофэктодерме эуплоидных, так и анеуплоидных эмбрионов. Средняя копияность мтДНК в ТЭ эуплоидных эмбрионов ($n=194$) группы группа А составила $0,00259 \pm 0,00012$, в то время как уровень мтДНК в ТЭ эуплоидных эмбрионов ($n=58$) группы Б- $0,00308 \pm 0,00018$, что является статистически значимой разницей ($p=0,02$). Среди анеуплоидных эмбрионов ($n=91$) группы Б наблюдалась тенденция к более высоким показателям копияности мтДНК в ТЭ по сравнению с генетически аномальными эмбрионами ($n=130$) группы А, $0,00397 \pm 0,00078$ и $0,00608 \pm 0,0008$, соответственно ($p=0,06$).

4. Пороговым возрастом изменения митохондриального биогенеза является 39 лет. Так, при достижении этого возраста доля генетически нормальных

бластоцист с надпороговыми значениями мтДНК в ТЭ в 4,9 раз выше по сравнению с более молодой когортой пациенток (ОШ 4,9 (95%ДИ: 2,03; 8,59, $p < 0,001$)). Площадь под ROC кривой составила 0,659, с чувствительностью 53,4% и специфичностью 89,4%.

5. Определение копияности мтДНК в трофэктодерме бластоцист в совокупности с проведением преимплантационного генетического тестирования эмбрионов является надежным методом селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом, который позволит увеличить эффективность лечения бесплодия в программах ЭКО. Так, изучив уровень мтДНК в трофэктодерме имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов, был определен пороговый уровень мтДНК, составивший 0,004о.е., превышение которого предвещало неудачу имплантации с чувствительностью 80,5% и специфичностью 100%, площадь под ROC-кривой составила 0,857, что говорит о высокой прогностической силе. Из 144 перенесенных эмбрионов группы А, 106 бластоцист были с подпороговым числом мтДНК в ТЭ, 86 (81,1%) из них привели к беременности (86/106), 20 (18,9%) - не имплантировались (20/106). Из 42 перенесенных эмбрионов группы Б, 17 бластоцист имели нормальным (подпороговый) уровень мтДНК в ТЭ, 13 (76,4%) из них привели к беременности (13/17), 4 (23,5%) эмбриона не имплантировались (4/17). Не наблюдалось статистически значимых различий между группами в числе зуплоидных эмбрионов с нормальным митохондриальным потенциалом ($p=0,653$). Из 144 ПЭ группы А, 38 (26,3%) бластоцист были с высокими (надпороговыми) значениями мтДНК в ТЭ (38/144). Из 42 ПЭ группы Б, 25 (59,5%) бластоцист имели надпороговые значения мтДНК (25/42). Соответственно, ОШ наличия большего числа бластоцист с надпороговыми уровнями мтДНК в ТЭ составило 4,1 (95%ДИ: 1,99; 8,42, $p < 0,001$), что согласуется с ранее полученными результатами о связи копияности мтДНК в ТЭ с пороговым возрастом, а также исходами программ ВРТ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам позднего репродуктивного возраста показано проведение преимплантационного генетического скрининга эмбрионов на анеуплоидии, в связи с высокими показателями анеуплоидных бластоцист в данной группе женщин.
2. С целью улучшения эффективности программ ЭКО с ПГТ-А, при наличии нескольких эуплоидных эмбрионов, пациенткам позднего репродуктивного возраста рекомендовано определение копийности мтДНК в трофэктодерме бластоцист, с целью селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом. Для переноса рекомендованы эмбрионы, копийность мтДНК которых, не превышает пороговый уровень, составляющий 0,004о.е.
3. Перенос эуплоидных бластоцист с подпороговыми значениями мтДНК позволяет увеличить частоту наступления беременности и снизить риск ранних репродуктивных потерь, что позволяет увеличить эффективность программы ЭКО.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМГ - антимюллеров гормон

аГнРГ – агонисты гонадотропин-рилизинг гормона

антГнРГ - антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона

АФК - активные формы кислорода

ВЗОМТ - воспалительные заболевания органов малого таза

ВКМ – внутриклеточная масса

ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВПГ – вирус простого герпеса

ВПЧ – вирус папилломы человека

ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон

ДГЭАС - дегидроэпиандростерон-сульфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДИ – доверительный интервал

Е2 - эстрадиол

17-ОП – 17-оксипрогестерон

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

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

КАФ – количество антральных фолликулов

ЛГ – лютеинизирующий гормон

мтДНК- митохондриальная ДНК

ОШ - отношение шансов

П - прогестерон

ПГТ-А - преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ПЭ - перенос эмбриона

рФСГ - рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон

СТГ – соматотропный гормон

СПКЯ - синдром поликистозных яичников

Т – тестостерон

Т4 – тироксин

ТВП – трансвагинальная пункция яичников

ТТГ - тиреотропный гормон

Т₄_{св} - свободный тироксин

ТЭ - трофэктодерма

УЗИ - ультразвуковое исследование

УЗДГ- ультразвуковая доплерография

ФСГ - фолликулостимулирующий гормон

ЦМВ - цитомегаловирус

ЧХГ – человеческий хорионический гонадотропин

β-ХГ - β-субъединица хорионического гонадотропина

чМГ - человеческий менопаузальный гонадотропин

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ASRM – American Society for Reproductive Medicine (Американское общество репродуктивной медицины)

AUC - area under the curve, площадь под кривой

aCGH - array comparative genomic hybridization, микроматричная сравнительная геномная гибридизация

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology (Европейское общество по вопросам репродукции человека и эмбриологии)

FISH - fluorescent in situ hybridization, флуоресцентная гибридизация in situ

GV – germinal vesicle (герминальный везикул)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in its assessment/ В. Meczekalski [et al.]// J Endocrinol Invest. – 2016. – Vol. 39(11). – P.1259–1265.
2. Мишиева, Н.Г. Лечение бесплодия у женщин позднего репродуктивного возраста/ Н.Г. Мишиева //Российский вестник акушера-гинеколога. - 2008.- №5.- С. 51-55.
3. Next generation sequencing for preimplantation genetic testing of blastocysts aneuploidies in women of different ages / К. Lukaszuk [et al.]// AnnAgric Environ Med.- 2016. - Vol. 23(1). – P.163 - 166.
4. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles/ F. Fiorentino [et al.]// Hum Reprod. - 2014 – Vol. 29 (12). – P.2802–2813.
5. Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: a blinded prospective non-selection study/ E. Fragouli [et al.]// Human Reproduction – 2017.- Vol.32 (11). – P.2340–2347.
6. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential/ E Fragouli [et al.]// PLoSGenet. - 2015. – Vol.11(6). - e1005241
7. Mitochondrial DNA copy number in cumulus cells is a strong predictor of obtaining good-quality embryos after IVF / М. Ogino [et al.] // J Assist Reprod Genet. – 2016. - Vol. 33(3). – P. 367-371.
8. The special programme of research in human reproduction: forty years of activities to achieve reproductive health for all / G. Benagiano [et al.] // Gynecol Obstet Investig. – 2012. - Vol. 74(3). – P.190–217.
9. Архангельский, В.Н. Рождаемость и репродуктивное поведение в современной России, их детерминация/ В.Н. Архангельский // Материалы Всемирного конгресса "Внутриутробный ребенок и общество. Роль

пренатальной психологии в акушерстве, неонатологии, психотерапии, психологии и социологии". – М., 2007. – с.30-32.

10. US Centers for Disease Control and Prevention and Its Partners' Contributions to Global Health Security Jordan W. Tappero, Cynthia H. Cassell, Rebecca E. Bunnell, Frederick J. Angulo, Allen Craig, Nicki Pesik, Benjamin A. Dahl, Kashef Ijaz, Hamid Jafari, Rebecca Martin, Global Health Security Science Group

11. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, 2016

12. European Society of Human Reproduction and Embryology – ESHRE, 2017

13. Назаренко, Т.А. Бесплодие и возраст: пути решения проблемы 2-е издание/ Т.А. Назаренко, Н.Г.Мишиева // Москва «МЕДпресс-информ» 2014.

14. Российская Ассоциация Репродукции Человека, Регистр ВРТ, отчет за 2015г.

15. Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA). Fertility treatment in 2010: trends and figures. HFEA 2010, London

16. Improvements in IVF in women of advanced age / N. Gleicher [et al.] // J Endocrinol. - 2016. – Vol. 230(1). – P. F1-6.

17. Effect of maternal age on incidences of apoptotic and proliferative cells in trophoblasts of full-term human placenta / Z Yamada [et al.] // Mol. Hum. Reprod. - 2001. – Vol. 7 (12). – P.1179–1185.

18. Николаева, Л.Б. Состояние системы мать-плацента-плод у женщин позднего репродуктивного возраста / Л.Б. Николаева и др. // Материалы VIII Российского форума «Мать и дитя». М., 2006. — С. 173.

19. Королькова, А.И. Антимюллеров гормон как показатель фертильности женщин позднего репродуктивного возраста/ А.И. Королькова, Н.Г. Мишиева, А.Н. Абубакиров, Ю.С. Павлова, Т.Б. Имиева // Проблемы репродукции. - 2018. - 24(2):23-27.

20. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? / P Brezina [et al.] // J Assist Reprod Genet. – 2016. – Vol. 33(7). – P. 823-832.

21. The variability of female reproductive ageing/ te Velde ER, Pearson PL // *Hum Reprod.* – 2002. – Vol. 8(2). – P.141-154.
22. Preovulatory progesterone rise during ovarian stimulation for IVF / M. Kasum [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* – 2013. – V.29(8). – P.744-748.
23. Anti-mullerian hormone as a predictor of time to menopause in late reproductive age women / E. Freeman [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol. 97(5). – P.1673–1680.
24. Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction / F. Broekmans [et al.] // *Trends Endocrinol Metab.* – 2008. – Vol.19 (9). – P. 340–347.
25. Age-associated metabolic and morphologic changes in mitochondria of individual mouse and hamster oocytes / F. Simsek-Duran [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8 (5). - e64955.
26. Скулачев В., Богачев А., Каспаринский Ф. Мембранная биоэнергетика. М.: Издательство Московского университета. М. 2010;367.
27. Live birth chances in women with extremely low-serum anti-Mullerian hormone levels / A. Weghofer [et al.] // *Hum Reprod.* – 2011. – Vol. 26(7). – P. 1905-1909.
28. Probability of live birth in women with extremely low anti-Müllerian hormone concentrations / K. Lukaszuk [et al.] // *Reprod Biomed.* – 2014. – P. 28(1). – P. 64-69.
29. Ongoing pregnancy rates in women with low and extremely low AMH levels. A multivariate analysis of 769 cycles / A. Kedem [et al.] // *PLoS* – 2013. – Vol. 8(12). - e81629.
30. Value of antimullerian hormone as a prognostic indicator of in vitro fertilization outcome / D. Reichman [et al.] // *Fertil Steril.* – 2014. – Vol. 101 (4). – P. 1012-1018.
31. Prognostic indicators of assisted reproduction technology outcomes of cycles with ultralow serum anti-müllerian hormone: a multivariate analysis of over 5000 autologous cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcome Reporting System database for 2012–2013 / D. Seifer [et al.] // *Fertil Steril* 2015;S0015-S0282(15):02011-02017.

32. The principles of clinical Cytogenetics / S. Gersen // New York: Springer 2013. — P. 275—292.
33. Баранов, С.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты / Баранов В.С., Кузнецова Т.В. — СПб: Издательство Н-Л, 2006.-640 с.: 141 ил. ISBN 5-94869-034-2.
34. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions / S. Munné [et al.] // PrenatDiagn. — 2004. — Vol. 24 (8). — P. 638–643.
35. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: areview of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening / J. Franasiak [et al.] // FertSteril.- 2014. — Vol. 101(3). — P.656–663.
36. Ghevaria et al. ESHRE 2013. Oral 119
37. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem / S.Nagaoka [et al.] // Nat. Rev. Genet. — 2012. - Vol. 13 (7) — P. 493–504.
38. Meiosis and maternal aging: insights from aneuploid oocytes and trisomy births / M. Herbert [et al.] // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. — 2015. — Vol.7 (4). - a017970.
39. Paternal age and assisted reproductive outcomes in ICSI donor oocytes: is there an effect of older fathers? / R. Beguería [et al.] // Hum. Reprod.- 2014.- Vol. 29 (10).- P. 2114 – 2122.
40. Eichenlaub-Ritter U. Genetics of oocyte aging / Eichenlaub-Ritter U. // Maturitas. — 1998. — Vol. 30 (2). — P. 143–169.
41. Oocyte development, meiosis and aneuploidy / M. MacLennan [et al.] // Cell Dev Biol. — 2015. — Vol. 45. - P. 68–76.
42. Воробьева, О.А. Влияние возраста на частоту гетероплоидии в ооцитах человека / Воробьева О.А., Богомолова М.В., Кузнецова Т.В., Козлов В.В. // Цитология. — 2000. — Т. 42, No 12. — С. 1179–1184.
43. Boue A. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1,356 prenatal diagnoses / Boue A., Gallano P.A. // Prenat. Diagn. — 1984. — Vol. 4 (spec. issue). — P. 45–67.

44. The origin of human aneuploidy: Where we have been, where we are going / T. Hassold [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* - 2007.- Vol. 16 (2).- P. 203–208.
45. Cdc20 Is Critical for Meiosis I and Fertility of Female Mice / F. Jin [et al.] // *PLoS Genet.*- 2010.- Vol. 6 (9). - P. 1-16.
46. Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in oocytes from donor females: Comparative genomic hybridization analyses in metaphase II oocytes and their first polar body / A. Obradors [et al.] // *Fertil. Steril.* - 2010.- Vol. 93 (2).- P. 675–679.
47. Germinal and Somatic Trisomy 21 Mosaicism: How Common is it, What are the Implications for Individual Carriers and How Does it Come About? / M. Hultén [et al.] // *Curr. Genomics.* - 2010.- Vol. 11. - P. 409–41.
48. Fragouli E, Wells D. Aneuploidy in the human blastocyst // *Cytogenet.Genome Res.* – 2011.- Vol.133 (2-4). - P. 149 – 159.
49. Restoration of normal embryogenesis by mitochondrial supplementation in pig oocytes exhibiting mitochondrial DNA deficiency / G. Cagnone [et al.] // *SciRep.* – 2016. – Vol. 6, Article number: 23229
50. Chawanpaiboon S., Titapant V. The Possible Primary Causes of Human Aneuploidy // *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology* – 2000. - Vol. 12. - P. 93-102.
51. Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., Леонченко В.В. Причины прерывания беременности после ЭКО и ИКСИ: анализ клинических и цитогенетических данных // *Журнал Акушерства и Женских болезней*, т. 57, №4, стр. 73-75, 2008
52. Henderson S., Edwards R. Chiasma frequency and maternal age in mammals // *Nature.* – 1999. – Vol.218. – P. 22-28.
53. Citrinin exposure affects oocyte maturation and embryo development by inducing oxidative stress-mediated apoptosis / Y. Wu [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8(21). – P. 34525-34533.
54. Age-Related Decrease of Meiotic Cohesins in Human Oocytes/ M. Tsutsumi [et al.] // *PLOS* - 2014. – Vol. 9(5):e96710.

55. A pilot proof-of-principle study to compare fresh and vitrified cycle preimplantation genetic screening by chromosome microarray and next generation sequencing / G. Ma [et al.] // *MolCytogenet.* – 2016. – Vol. 9 (25).
56. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study / Z. Yang, [et al.] // *BMC Med Genomics.* – 2015. – Vol. 8 (30).
57. Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles / K. Łukaszuk [et al.] // *FertilSteril.* – 2015. – Vol. 103 (4). – P. 1031-1036.
58. Validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of blastocysts/ J. Huang [et al.] // *FertilSteril.* – 2016. – Vol.105(6). – P.1532-1536.
59. Current methods for preimplantation genetic diagnosis / J. Liss [et al.] // *Ginekol Pol.* – 2016. - Vol. 87(7). – P. 522-526.
60. 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.* – 2013. – Vol. 5 (24).
61. Youle R. J., Van der Blik A.M. Mitochondrial fission, fusion, and stress *Science.* – 2012. – Vol. 337. – P. 1062–1065
62. И. О. Мазунин, Н. В. Володько, Е. Б. Стариковская, Р. И. Сукерник. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека. Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 2010 г 630090.
63. Окислительный стресс: Биохим. и патофизиол. аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. - [М.] : МАИК "Наука/Интерпериодика", 2001. - 342, [1] с. : ил., табл.; 23 см.; ISBN 5-7846-0050-8с.
64. Skulachev V.P. Programmed death phenomena: from organelle to organism / V.P. Skulachev // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 959. – P. 214–237.
65. Giordano F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure / F.J. Giordano // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 500–508.

66. Mitochondrial Regulation of $[Ca^{2+}]$ Oscillations During Cell Cycle Resumption of the Second Meiosis of Oocyte / F. Wang [et al.] // Cell Cycle – 2018. - Vol. 17 (12). – P. 1471-1486.
67. Respiriometric reserve capacity of cumulus cell mitochondria correlates with oocyte maturity / S. Anderson [et al.] // J Assist Reprod Genet. – 2018. -Vol. 35(10). – P.1821-1830.
68. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization / Q. Zhou [et al.] // Science - 2016. - Vol. 353(6297). – P. 394-399.
69. Turner N., Robker R. Developmental programming of obesity and insulin resistance: does mitochondrial dysfunction in oocytes play a role? // MolHumReprod. – 2015. – Vol. 21, №1. – P. 23-30.
70. Grindler N.M., Moley K.H. Maternal obesity, infertility and mitochondrial dysfunction: potential mechanisms emerging from mouse model systems // Mol Hum Reprod. – 2013.–Vol. 19(8). – P.486-494
71. Mitochondrial Disease: Clinical Aspects, Molecular Mechanisms, Translational Science, and Clinical Frontiers / Ben Thornton [et al.] // J Child Neurol. – 2014. – Vol. 29, No9. – P. 1179-1207.
72. Митохондриальная дисфункция в механизмах атерогенеза /Н.П. Судаков, С.Б. Никифоров, Ю.М. Константинов и др. //Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – No 2. – С. 119 123.
73. Судаков, Н.П. Роль митохондриальной дисфункции в патогенезе социально значимых заболеваний /Н.П. Судаков //Известия Иркут. Гос. университета, серия «Биология. Экология». – 2008 No 2. – С. 11 14.
74. Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells / L. Boucret [et al.] // HumReprod. - 2015.- Vol 30 (7). – P. 653-664.
75. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig / S. El Shourbagy [et al.]. // Reproduction. – 2006. - Vol. 131(2). – P. 233-245.

76. Leese H.J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability // *Bioessays* – 2002. - Vol. 24. – P. 845-849.
77. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30 августа 2012 г. № 107н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению"
78. Miscarriage risk for IVF pregnancies in poor responders to ovarian hyperstimulation / M. Haadsma [et al.] // *Reprod Biomed.* – 2010. – Vol. 20. – P. 191–200.
79. Early menopause in mothers of children with Down syndrome? / E. van der Stroom. [et al.] // *Fertil Steril.* – 2011. – Vol. 96. – P. 985–990.
80. Anti-Mullerian hormone as a predictor of IVF outcome / D. Lekamge [et al.] // *Reprod Biomed.* – 2007. – Vol. 14. – P. 602–610.
81. Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve / A. Levi [et al.] // *Fertil Steril.* - 2001. -Vol. 76. – P. 666–669
82. Aiken CE, Tarry-Adkins JL, Ozanne SE. Suboptimal nutrition in utero causes DNA damage and accelerated aging of the female reproductive tract // *FASEB J.* - 2013. – Vol. 27.- P. 3959–3965.
83. Is the short follicular phase in older women secondary to advanced or accelerated dominant follicle development? / N. Klein [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2002.- Vol. 87 (12). – P. 5746–5750.
84. The mitochondrial DNA content of cumulus cells may help predict embryo implantation / A. Taugourdeau [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* - 2019.- Vol. 36(2). – P. 223-228.
85. The mitochondrial DNA content of cumulus granulosa cells is linked to embryo quality / V. Desquiret-Dumas [et al.] // *Hum Reprod.* – 2017. – Vol. 32(3). – P. 607-614.
86. Королькова, А.И. Повышение эффективности программ ЭКО на основании определения копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов

- / А.И. Королькова, Н.Г. Мишиева, Б.А. Мартазанова, О.В. Бурменская, А.Н. Екимов и др. // *Акушерство и гинекология*. 2019; 3: 98-104.
87. Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles / P. May-Panloup [et al.] // *Human Reproduction* – 2016. - Vol. 22 (6). - P. 725–743.
88. Дисфункция митохондрий как один из механизмов нарушения репродуктивной функции при ожирении / В.К. Горшинова, Д.В. Цвиркун, Н.В. Десяткова, М.Ю. Высоких, В.Ю. Смольникова // *Акушерство и гинекология*. - 2014. — № 7. — С. 9–13.
89. Variables associated with mitochondrial copy number in human blastocysts: what can we learn from trophoctoderm biopsies? / M. Jose de los Santos [et al.] // *Fertility and Sterility* – 2018.- Vol. 109 (1) – P. 110-117.
90. Dagan Wells. Mitochondrial DNA quantity as a biomarker for blastocyst implantation potential // *Fertility and Sterility* – 2017. – Vol. 108 (5). - P. 742–747.
91. Mitochondrial DNA quantification as a tool for embryo viability assessment: retrospective analysis of data from single euploid blastocyst transfers / K. Ravichandran [et al.] // *Human Reproduction* – 2017. - Vol.32 (6). – P. 1282–1292.
92. Gardner D., Schoolcraft W.B. Culture and transfer of human blastocysts // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* – 1999. - Vol. 11 (3). - P. 307–311.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Алгоритм проведения программы ЭКО у женщин позднего репродуктивного возраста

