

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

На правах рукописи

КУЛАКОВА
Елена Владимировна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТАКТИКИ ЛЕЧЕНИЯ
БЕСПЛОДИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ С ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫМ
ГЕНЕТИЧЕСКИМ ТЕСТИРОВАНИЕМ ЭМБРИОНОВ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

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

Научные консультанты:

**доктор медицинских наук, профессор
Калинина Елена Анатольевна**

**доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
Трофимов Дмитрий Юрьевич**

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	16
ГЛАВА 1. ЛЕЧЕНИЕ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ С ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ ТЕСТИРОВАНИЕМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	17
1.1. Особенности лечения бесплодия методами ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием при различных формах женского бесплодия ..	17
1.2. Лечение мужского бесплодия методами ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием	33
1.3. Аномалии кариотипа у пар с бесплодием в программах лечения бесплодия методами ВРТ	40
1.4. Носительство моногенных заболеваний у фертильных пар как показание к применению ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием	45
1.5. Клинические и этические аспекты переноса мозаичных эмбрионов в программах ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием	51
ГЛАВА 2. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ В ПРОГРАММАХ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ	57
2.1. Технологии получения генетического материала	57
2.2. Методы генетического тестирования полученных клеток эмбриона доимплантационных стадий развития	62
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	73
3.1. Материал исследования	73
3.2. Дизайн исследования.....	73
3.3. Соблюдение этических норм.....	87
3.4. Методы исследования	87
3.4.1. Обследование пар для вступления в программу ВРТ.....	87
3.4.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза	90
3.4.3. Протокол стимуляции функции яичников и получение ооцитов.....	91
3.4.4. Анализ эякулята и подготовка сперматозоидов к экстракорпоральному оплодотворению.....	91
3.4.5. Эмбриологический этап и морфологическая оценка эмбрионов	92

3.4.6. Проведение биопсии трофобласта и витрификация эмбрионов	93
3.4.7. Преимплантационное генетическое тестирование	94
3.4.8. Подготовка эндометрия и перенос размороженного эмбриона в криоцикле	97
3.4.9. Диагностика наступления беременности	98
3.4.10. Статистические методы обработки полученных данных	98
3.4.11. Методы проведения клинико-экономического анализа.....	99
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	107
4.1. Оценка структуры обращаемости пациентов с бесплодием для проведения преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах ВРТ	107
4.2. Анализ эффективности программ лечения бесплодия методами ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием у пациенток разного возраста	109
4.3. Решение проблемы бесплодия у пар с невынашиванием беременности в программах ВРТ	114
4.4. Особенности лечения бесплодия методами ВРТ у женщин молодого возраста с синдромом поликистозных яичников с применением преимплантационного генетического тестирования.....	117
4.5. Результаты лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А у пациенток с наружным генитальным эндометриозом в анамнезе.....	119
4.6. Результаты лечения бесплодия методами ВРТ у пар с различными типами нарушений сперматогенеза.....	123
4.7. Эффективность лечения бесплодия методами ВРТ с применением преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии пациентов с хромосомными аномалиями в кариотипе	134
4.8. Оценка истинного мозаицизма эмбрионов человека в программах лечения бесплодия методами ВРТ. Перенос мозаичных эмбрионов	142
4.9. Программы ВРТ с проведением ПГТ-А и ПГТ-М у пар с моногенными заболеваниями	149
4.10. Возможности повышения эффективности программ лечения бесплодия методами ВРТ при переносе зуплоидного эмбриона с помощью культуральных сред с гиалуроновой кислотой	155
4.11. Оценка уровня копийности митохондриальной ДНК эмбриона в качестве предиктора эффективности программы ВРТ	159

4.12. Клинико-экономический анализ эффективности программ ВРТ с применением преимплантационного генетического тестирования у пар с различными факторами бесплодия	167
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	188
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	220
ВЫВОДЫ.....	221
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	224
ПРИЛОЖЕНИЕ	226
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	227

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Среди причин младенческой смертности врожденные аномалии занимают второе место и являются основными заболеваниями в структуре детской инвалидности. В 2019 г. в майском Указе Президент Российской Федерации поставил задачу по снижению к 2024 г. младенческой смертности до 4,5 случая на 1 тыс. родившихся детей. По данным Росстата, в 2019 г. младенческая смертность в России снизилась до 4,9 случая (с 5,1 в 2018 г.). Именно поэтому профилактика возникновения и распространения врожденных и наследственных заболеваний, ранняя диагностика, своевременно начатое лечение и реабилитация являются основными направлениями деятельности всей системы здравоохранения.

В сфере профилактики инвалидности у детей и снижения детской летальности могут быть достигнуты определенные успехи благодаря реализации программы преимплантационного генетического тестирования на хромосомные нарушения при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). С помощью многокомпонентной системы профилактики (пренатальной и преимплантационной) за последние 10 лет количество детей-инвалидов с врожденными аномалиями и наследственными заболеваниями среди впервые признанных сократилось на 30% (2010 г. – 16 974, 2019 г. – 11 971), среди повторно признанных — на 47% (2010 г. – 58 067, 2019 г. – 30 904).

Систему профилактики можно разделить на первичную, вторичную и третичную [1]. В настоящее время в России в качестве одного из основных способов профилактики наследственных заболеваний выделяют медико-генетическое консультирование и скрининг, который проводится в два этапа: пренатальный, во время беременности, и неонатальный, после рождения ребенка. Тем не менее, пренатальный и неонатальный скрининги относят к методам вторичной профилактики, так как они позволяют выявить уже имеющиеся заболевания у плода или новорожденного [2].

С развитием вспомогательных репродуктивных технологий и методики преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) произошел значительный прогресс не только в лечении различных форм бесплодия, но и в профилактике рождения детей с генетическими нарушениями. Внедрение методов преимплантационного генетического тестирования позволило оптимизировать выбор наиболее перспективного эмбриона для переноса в полость матки, с высокой вероятностью гарантировать паре положительный исход беременности при проведении программы ВРТ и в значительной степени повысить эффективность первичной профилактики рождения детей с врожденными пороками развития [2,3].

Важным остается вопрос прекоцепционной подготовки пар с высоким риском рождения детей с генными и хромосомными нарушениями, особенно в программах ВРТ. В системе здравоохранения России в амбулаторно-поликлиническом звене действуют программы прекоцепционной (прегравидарной) подготовки пары к беременности и рождению здорового ребенка. Совершенствование алгоритмов обследования и подготовки к беременности требуют внедрения новых методов диагностики, профилактики и лечения. Это в первую очередь относится к парам с высоким риском рождения детей с генетическими нарушениями, которым необходимо проведение программ ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием.

В зависимости от определяемых нарушений выделяют ПГТ-А (тесты, направленные на выявление анеуплоидий), ПГТ-М (тесты, направленные на диагностику моногенных заболеваний) и ПГТ-СП (тесты, направленные на выявление структурных хромосомных перестроек) [4]. Учитывая, что анеуплоидии являются самым распространенным вариантом хромосомных аномалий у человека и основной причиной потери беременности, в центрах лечения бесплодия в большинстве случаев проводится исследование ПГТ-А, направленное на выявление количественных хромосомных изменений в клетках эмбриона.

В разных клиниках количество проводимых циклов ЭКО/ИКСИ с использованием ПГТ-А также варьирует и зависит от возраста и данных анамнеза пациентов, проходящих лечение бесплодия методом ВРТ [5]. Согласно прогностической математической модели, проведение ПГТ-А в программах ВРТ позволяет предотвратить до 45% рождений детей с хромосомными нарушениями [6].

Задачи, стоящие на государственном уровне в области репродуктологии, направлены на повышение эффективности программ ВРТ, увеличение частоты родов здоровым ребенком после лечения бесплодия, снижение детской инвалидности и повышение качества оказания медицинской помощи. Современные мировые и российские научные данные говорят о том, что применение ПГТ в программах лечения бесплодия повышает эффективность лечение как женского, так и мужского бесплодия [7].

В утвержденных в России клинических рекомендациях по диагностике и лечению женского бесплодия, опубликованных в 2021 г., проведение ПГТ рекомендовано только пациентке и/или ее партнеру, имеющим заболевания или состояния, ассоциированные с высоким риском передачи наследственной патологии потомству (носители генных мутаций, сцепленных с X-хромосомой и/или с Y-хромосомой; носители генных мутаций, вызывающих моногенные заболевания; носители хромосомных аномалий). Таким парам показано проведение ПГТ-М и/или ПГТ-СП. Уровень убедительности рекомендаций С. В клинических рекомендация РФ нет показаний к проведению ПГТ-А, что делает необходимым определение групп пациентов с бесплодием, которым выполнение ПГТ-А клинически и экономически целесообразно. В рутинной практике в каждой клинической ситуации врач принимает решение о применении ПГТ на основании всех анамнестических данных с учетом консультации медицинского генетика.

Несмотря на повышение стоимости программы ВРТ с ПГТ-А, биопсия трофобласта и определение хромосомного статуса эмбриона при

абсолютных показаниях экономически более выгодны [9,10]. Так, проведение ПГТ-А у пациенток старше 35 лет увеличивает частоту наступления беременности и живорождения в 3 раза, при этом наибольшая эффективность, в том числе клинико-экономическая, отмечается у женщин 36–39 лет. Данная стратегия позволяет сэкономить до 45% средств, затраченных на проведение протокола ЭКО/ИКСИ, для достижения одного дополнительного процента живорождения. У женщин с привычным выкидышем в анамнезе проведение ПГТ-А повышает частоту рождения живым плодом в 2,4 раза, а у пациенток 30–39 лет с нормальным индексом массы тела — в 5 раз [9]. Аналогичные данные описаны и для пар с мужским фактором бесплодия: при наличии патозооспермии проведение ПГТ-А в программе ВРТ повышает частоту наступления беременности в 5,7 раза, а частоту живорождения в 3,8 раза [10].

Использование преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах лечения бесплодия имеет ряд недостатков, главным из которых является инвазивность процедуры. Однако современный уровень развития клинической эмбриологии и совершенствование процедуры биопсии клеток трофобласта в сочетании с высокоэффективной криоконсервацией методом витрификации нивелируют эти недостатки, а программы ВРТ с ПГТ приводят к рождению здоровых детей с большей частотой, чем без ПГТ.

Высокая востребованность данной методики, обусловленная ее высокой эффективностью в определенных группах пациентов диктует необходимость более детального научного анализа характеристик пар, проходящих лечение бесплодия в программе ВРТ, и разработки алгоритмов оказания более качественной персонифицированной медицинской помощи пациентам. Таким образом, чрезвычайно актуальна оценка необходимости применения ПГТ эмбрионов при лечении мужского и женского бесплодия методами ВРТ для уменьшения числа попыток ЭКО у пар, снижения экономических затрат на рождение одного здорового ребенка после ЭКО, а

также для индивидуализации программ ВРТ с проведением генетического тестирования преимплантационных эмбрионов.

В связи с вышеизложенным настоящее исследование представляется актуальным, современным и перспективным.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка концепции повышения эффективности вспомогательных репродуктивных технологий и снижения риска рождения детей с генетическими нарушениями при использовании преимплантационного генетического тестирования эмбрионов.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Определить структуру обращаемости пациентов для проведения преимплантационного генетического тестирования эмбрионов при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий.
2. Провести анализ результатов лечения бесплодия у пациенток различных возрастных групп методами вспомогательных репродуктивных технологий с преимплантационным генетическим тестированием.
3. Проанализировать эффективность применения преимплантационного генетического тестирования при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с привычным невынашиванием беременности, синдромом поликистозных яичников, наружным генитальным эндометриозом.
4. Изучить особенности проведения вспомогательных репродуктивных технологий с преимплантационным генетическим тестированием у пар с бесплодием, обусловленным нарушением сперматогенеза.

5. Оценить эффективность применения преимплантационного генетического тестирования и исходов вспомогательных репродуктивных технологий у пар с хромосомными нарушениями и носительством моногенных заболеваний.
6. Определить частоту встречаемости истинного мозаицизма эмбрионов человека при вспомогательных репродуктивных технологиях с преимплантационным генетическим тестированием. Оценить возможность переноса в полость матки эмбрионов с мозаицизмом в программах ВРТ.
7. Оптимизировать эмбриологический этап вспомогательных репродуктивных технологий с помощью использования культуральных сред с гиалуроновой кислотой и оценки копийности митохондриальной ДНК при переносе в полость матки эуплоидного эмбриона.
8. Провести клинико-экономический анализ эффективности и целесообразности применения преимплантационного генетического тестирования в программах вспомогательных репродуктивных технологий для различных групп пациентов с бесплодием.
9. Разработать алгоритм персонализированного подхода к ведению пар с риском рождения детей с генетическими нарушениями.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые на большом материале проведен комплексный научный и клинический анализ роли и места преимплантационного генетического тестирования эмбрионов при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у разных категорий больных. Определено значение преимплантационного генетического тестирования для повышения эффективности лечения (частота наступления беременности и родов живым здоровым плодом).

Получены уникальные научные данные о частоте встречаемости истинного мозаицизма в преимплантационных эмбрионах человека. Рассмотрены клинические и этические аспекты переноса эмбрионов с мозаицизмом для последующего рождения здоровых детей в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий.

Впервые изучено влияние копийности митохондриальной ДНК, анализируемой методом высокопроизводительного секвенирования, на имплантационный потенциал эмбриона при лечении различных форм бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий с преимплантационным генетическим тестированием.

Расширены и научно обоснованы показания для проведения лечения бесплодия с использованием вспомогательных репродуктивных технологий с преимплантационным генетическим тестированием эмбрионов.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

По результатам исследования разработан дифференцированный подход к ведению пар с высоким риском рождения детей с хромосомными и генными нарушениями. Расширены и научно обоснованы показания для проведения программ лечения бесплодия с использованием преимплантационного генетического тестирования. Проанализированы возможные методы повышения эффективности программ ВРТ путем модификации эмбриологического этапа.

Разработанный и внедренный в клиническую практику алгоритм ведения пар с бесплодием с использованием преимплантационного генетического тестирования позволяет снизить частоту осложнений программ ВРТ, в частности риск рождения детей с генетическими нарушениями.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Частота применения преимплантационного генетического тестирования эмбрионов при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий за 6-летний период

увеличилась с 6% до 13%. В структуре обращаемости пар для проведения преимплантационного генетического тестирования преобладают: нарушение сперматогенеза (34%), поздний репродуктивный возраст (26%), невынашивание беременности (12%), наружный генитальный эндометриоз (12%), синдром поликистозных яичников (10%), хромосомные нарушения кариотипа и носительство моногенных заболеваний (6%).

2. Высокая частота отмены переноса (57,1%) по причине отсутствия эуплоидных эмбрионов у пациенток позднего репродуктивного возраста (37–42 лет) определяет целесообразность применения преимплантационного генетического тестирования эмбрионов. У пациенток до 35 лет с привычным невынашиванием беременности, синдромом поликистозных яичников и наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения частота получения эуплоидных эмбрионов сопоставима с таковой у женщин без указанной патологии и составляет 44,5% (невынашивание беременности), 50,8% (наружный генитальный эндометриоз) и 49,1% (синдром поликистозных яичников) против 43,3%, что указывает на нецелесообразность проведения преимплантационного генетического тестирования.
3. При тяжелых формах нарушения сперматогенеза анеуплоидии эмбрионов встречаются в 1,75 раза чаще по сравнению с нормозооспермией. Для снижения риска рождения детей с генетическими нарушениями при использовании сперматозоидов, выделенных из ткани яичка, а также при олигоастенотератозооспермии следует применять преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов.
4. При лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий по результатам преимплантационного

генетического тестирования эмбрионы с мозаицизмом встречаются в 5,3% случаев. При отсутствии у пары эуплоидных бластоцист перенос в полость матки эмбрионов с мозаицизмом возможен с учетом клинико-anamнестических данных пациентов, хромосом, вовлеченных в мозаицизм, и определением индивидуальных рисков рождения ребенка с генетическими нарушениями при медико-генетическом консультировании.

5. У женщин позднего репродуктивного возраста (37–42 лет) применение культуральных сред с гиалуроновой кислотой при переносе эуплоидного эмбриона позволяет снизить частоту ранних репродуктивных потерь (до 12 недель гестации) в 1,73 раза. Количественная оценка митохондриальной ДНК в клетках трофобласта эмбриона является маркером репродуктивных исходов при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий с преимплантационным генетическим тестированием: частота ранних репродуктивных потерь (до 12 недель гестации) выше в 3,4 раза при уровне копийности мтДНК $\geq 21,17$ у.е.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Автор лично принимал участие в разработке темы диссертационного исследования, постановке цели, определении задач. Проводил отбор пар, все этапы лечения бесплодия методами ВРТ, был задействован при проведении генетической диагностики преимплантационных эмбрионов человека, активно участвовал в обследовании и подготовке пациентов к циклу ВРТ. Самостоятельно интерпретировал полученные данные, проводил статистическую обработку, выявлял клиническую и научную значимость результатов диссертационного исследования. Лично автором проведена разработка алгоритма ведения пациентов с бесплодием и высоким риском рождения детей с генетическими аномалиями. Опубликованы научные работы по изучаемой проблеме.

СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПАСПОРТУ НАУЧНОЙ СПЕЦИАЛЬНОСТИ

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.4 «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Достоверность полученных результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования и их решением, использованием современных молекулярных, генетических и клинических методов, достаточным объемом выборки пациентов, корректной статистической обработкой, критической оценкой полученных результатов при сравнении их с данными современной научной литературы.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Материалы диссертационной работы доложены на межклинической конференции института репродуктивной медицины (25.04.2022) и апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (20.06.2022), а также представлены в виде устных и постерных докладов и обсуждены на российских и зарубежных конференциях: Международная конференция РАРЧ (2014, 2016, 2020, 2021), Всероссийский форум «Мать и дитя» (2020, 2021, 2022), Региональный форум «Мать и дитя» (2021, 2022), Всероссийский конгресс с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь: от менархе до менопаузы» (2016, 2020, 2021), The International Symposium systems biology and biomedicine (2016).

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методология исследования заключалась в системном подходе и комплексном анализе результатов лечения бесплодия пар с высоким риском генетических нарушений потомства.

В рамках диссертации был проведен критический анализ отечественных и зарубежных работ в области применения преимплантационного генетического тестирования при лечении бесплодия методами ВРТ. На основании анализа были сформулированы цель и задачи исследования. В работе были обоснованы новые подходы к более совершенным методам лечения бесплодия методами ВРТ.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИКУ

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы, представленные к защите, также используются в учебном процессе на базе Научно-образовательного центра вспомогательных репродуктивных технологий имени Фредерика Паулсена ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

ПУБЛИКАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 19 работ в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, и 5 — тезисы российских и зарубежных конференций.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена в традиционной академической форме. Состоит из оглавления, списка принятых сокращений, введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, заключения, приложения и списка литературы. Работа представлена на 254 страницах текста, иллюстрирована 39 рисунками, 36 таблицами. Библиографический указатель включает 282 научных работ, из них 26 — отечественные публикации и 256 — зарубежные.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

аГнРГ	аналоги (агонисты) гонадотропин-рилизинг гормона
АМГ	антимюллеров гормон
антГнРГ	антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона
ВКМ	внутренняя клеточная масса
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВРТ	вспомогательные репродуктивные технологии
ДИ	доверительный интервал
ИКСИ	инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита
ИМТ	индекс массы тела
ИППП	инфекции, передающиеся половым путем
ЛГ	лютеинизирующий гормон
мтДНК	митохондриальная ДНК
ОКК	ооцит-кумулюсный комплекс
ОШ	отношение шансов
ПГТ	преимплантационное генетическое тестирование
ПГТ-А	преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии
ПГТ-М	преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на моногенные заболевания
ПГТ-М/СП	преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на моногенные заболевания или структурные хромосомные перестройки
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ТВП	трансвагинальная пункция
УЗИ	ультразвуковое исследование
ЧНБ	частота наступления клинической беременности
ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
ХГ	гонадотропин хорионический
ЭКО	экстракорпоральное оплодотворение

ГЛАВА 1. ЛЕЧЕНИЕ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ С ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ ТЕСТИРОВАНИЕМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Особенности лечения бесплодия методами ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием при различных формах женского бесплодия

Изначально показанием для лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) являлся трубно-перитонеальный фактор бесплодия, но в дальнейшем методы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) нашли применение не только в преодолении всех видов бесплодия, но и в области профилактики генетических нарушений у преимплантационных эмбрионов. Высокая частота эмбриональных анеуплоидий и ее значительный вклад в повышение частоты потерь беременности и неблагоприятных перинатальных исходов, а также частая встречаемость в популяции моногенных заболеваний привели к необходимости разработки подходов к диагностике генетических нарушений изначально на пренатальном, а впоследствии и на преимплантационном этапе развития человека.

Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) является единственной технологией в современной репродуктивной медицине, которая позволяет диагностировать генетическую патологию у эмбриона до его переноса в полость матки в цикле ВРТ. До внедрения ПГТ в клиническую практику пары с высоким риском рождения потомства с наследственными заболеваниями или хромосомными аномалиями были вынуждены прибегать к инвазивным процедурам пренатальной диагностики, таким, как амниоцентез или биопсия ворсин хориона, за которыми могло последовать прерывание беременности по медицинским показаниям. Перед этими парами зачастую возникала необходимость прибегнуть к усыновлению (удочерению) или использованию донорских гамет.

В Приказе Министерства здравоохранения Российской Федерации (от 31 июля 2020 года №803н) «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» использование преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах лечения бесплодия у пар рекомендовано только при нарушениях кариотипа и носительстве моногенных заболеваний. В настоящее время ПГТ применяется для диагностики моногенных заболеваний, структурных хромосомных aberrаций и анеуплоидий, а также для HLA-типирования эмбриона. Необходимо помнить, что при этом значительно снижает количество пригодных для переноса эмбрионов по сравнению с использованием исключительно морфологических критериев, что требует тщательной оценки состояния овариального резерва пациентки. Применение ПГТ сопряжено с криоконсервацией всех эмбрионов и облегчает селективный перенос одного эмбриона при бесплодии различного происхождения.

Такие технологические новшества, как биопсия клеток трофобласта эмбрионов и их исследование с помощью сравнительной геномной гибридизации или высокопроизводительного секвенирования, позволяющее исследовать все 24 хромосомы человека, по сравнению с применявшимся ранее методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), привели к возрождению концепции ПГТ на анеуплоидии на новом технологическом уровне [11]. Данные методы называют молекулярным кариотипированием. Их валидация требует проведения крупных рандомизированных исследований с качественным дизайном, способных четко оценить чувствительность и специфичность различных методов ПГТ. Задачей ближайшего будущего остается определение места ПГТ в ряду прочих профилактических мероприятий, таких, как определение внеклеточной ДНК эмбриона в крови матери, ультразвуковой и биохимический скрининг I триместра беременности, а также инвазивные методы пренатальной диагностики.

Преимплантационная диагностика генетических нарушений в последние десятилетия прочно заняла свое место в арсенале мероприятий пренатальной диагностики [12,13], являясь наилучшим подходом для пар, желающих устранить вероятность прерывания беременности по медицинским показаниям. Разработанный в 2017 г. Международный глоссарий терминов infertility и fertility (The International Glossary on Infertility and Fertility Care) [14] принял рекомендации, согласно которым термин «преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ)» должен заменить ранее принятые в научной литературе термины «преимплантационная генетическая диагностика» и «преимплантационный генетический скрининг». В настоящей диссертационной работе используется терминология Международного глоссария.

Первые шаги в разработке ПГТ были сделаны более полувека тому назад группой одного из основоположников ЭКО, будущего лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине за 2010 г. Роберта Эдвардса. Учеными была произведена биопсия бластоцист кроликов с определением хроматина хромосомы X, что позволило контролировать соотношение плодов мужского и женского пола после переноса эмбрионов крольчихам. Еще в 1968 г. специалисты предвидели потенциальное клиническое значение данного метода в отношении предотвращения возможности передачи нежелательных X-сцепленных генов потомству.

- *Поздний репродуктивный возраст женщины*

Поздний репродуктивный возраст остается одним из основных показаний к применению ПГТ на анеуплоидии, использование которого у женщин в возрасте старше 40 лет, согласно большинству исследований, ведет к повышению частоты успешных результатов программ ЭКО [15,16,17]. Изучение эффективности ПГТ-А у пациенток позднего репродуктивного возраста в рамках рандомизированного контролируемого исследования показало, что в группе пациенток в возрасте 38–41 год применение скрининга на анеуплоидии позволило получить лучшие по

сравнению с контрольной группой результаты в отношении частоты наступления беременности и частоты потерь беременности, а также сократить время до наступления беременности. Данные observationalного исследования пациенток в возрасте 44–47 лет заставили исследователей настаивать на обеспечении желающих пройти программу ЭКО в возрасте 44 лет и старше женщин компетентным консультированием, позволяющим осветить многочисленные биологические и клинические факторы, ответственные за крайне низкую частоту репродуктивного успеха и высокий риск анеуплоидий [16].

В 2018 г. была выполнена научная работа под руководством профессора Н.В. Долгушиной по оценке эффективности ПГТ в группе женщин позднего репродуктивного возраста. Исследование показало, что такие пациентки (старше 35 лет) относятся к группе риска неэффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий (шансы наступления беременности в 2,2 раза ниже, шансы живорождения в 2,0 раза ниже по сравнению с пациентками раннего репродуктивного возраста), что связано с меньшим числом полученных эмбрионов. Возраст, выше которого шансы наступления беременности и живорождения в программах ВРТ максимально снижаются (в 2,6 раза), составляет 37 лет. По результатам исследования Н.В. Долгушиной с соавт. (2018 г.), преимплантационный генетический скрининг у пациенток старше 35 лет увеличивает частоту наступления беременности и живорождения в 2 раза, однако наибольшая эффективность ЭКО с ПГТ-А отмечается в возрастной группе от 36 до 39 лет. Наиболее эффективным методом ПГТ-А для пациенток позднего репродуктивного возраста является а-CGH на 5-е сутки культивирования эмбрионов с исследованием трофэктодермы бластоцисты, которое увеличивает частоту наступления беременности и живорождения в 3,1 раза.

В данной работе убедительно доказывается целесообразность использования ПГТ-А у женщин позднего репродуктивного возраста в программах ВРТ. Однако выводы основаны на оценке преимплантационных

эмбрионов методами, которые в настоящий момент все реже используются в клиниках ЭКО — метод сравнительной геномной гибридизации и FISH. Вспомогательные репродуктивные технологии, претерпевшие бурное развитие в течение последних 40 лет, продолжают прогрессировать технологически. Особенно это касается методов генетического тестирования. Сейчас все чаще применяют метод высокопроизводительного секвенирования следующего поколения, что требует подтверждения или пересмотра данных по ПГТ, полученных другими методами в разных группах пациентов, в том числе у женщин позднего репродуктивного возраста.

- *Невынашивание беременности в анамнезе при нормальном кариотипе супругов (привычный выкидыш)*

Замершая беременность — это своеобразная форма самопроизвольного аборта до 20 недель беременности. Точная этиология и патогенез в настоящее время до конца не изучены, особенно это касается программ лечения бесплодия методами ВРТ. Цитогенетический анализ тканей абортуса является наиболее эффективным тестом для выявления причин невынашивания беременности. Однако крупномасштабных исследований, ограничивающихся переносом бластоцисты в программах ВРТ, не проводилось. В одном из исследований ретроспективно сообщается о результатах 1030 случаев, в которых цитогенетический анализ абортусов был выполнен у пациенток с замершей беременностью после переноса одной бластоцисты в полость матки [19]. Авторы идентифицировали 19,4% абортусов как нормальные кариотипы и 80,6% как анеуплоидные. Эти случаи разделились следующим образом: 62,3% — трисомия; 7,7% — двойная трисомия; 0,5% — тройная или четверная трисомия; 1,3% — моносомия 21; 3,2% — моносомия X; 0,1% — 47,XXY; 1,0% — полиплоидия; 1,0% — смешанный; 1,1% — эмбриональный мозаицизм; и 2,4% — структурные аномалии. В образцах с нормальным кариотипом 49,5% девочек и 50,5% мальчиков. Возникновение трисомии и двойной трисомии было значительно

более частым в группе ≥ 38 лет, чем в группе ≤ 37 лет ($p < 0,01$). Трисомия статистически значимо чаще ассоциировалась с сердцебиением плода ($p < 0,01$); двойная трисомия, полиплоидия и нормальный кариотип встречались значительно чаще при отсутствии сердцебиения плода ($p < 0,01$). Статистически значимой разницы в частоте хромосомных аномалий между количеством выкидышей или качеством бластоцист не было. Авторы убедительно доказали связь анеуплоидий абортусов с возрастом, у молодых женщин этиология неразвивающейся беременности выявлена не была.

Может ли преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидию (ПГТ-А) улучшить частоту живорождения у пациенток с привычным невынашиванием беременности? В 2019 г. были начаты работы на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России под руководством профессора Н.В. Долгушиной, посвященные оптимизации программ ВРТ у пациенток с привычным выкидышем в анамнезе на основании дифференцированного подхода к применению ПГТ-А. Авторы показали, что для пациенток программ ВРТ, имеющих в анамнезе привычный выкидыш, характерен более поздний возраст и, вследствие этого, более низкий уровень антимюллера гормона, больший ИМТ и более плохие эмбриологические показатели (большее число ооцитов с дисморфизмами, более низкая частота оплодотворения ооцитов и меньшее число бластоцист отличного качества). Также было показано, что при проведении преимплантационного генетического скрининга методом сравнительной геномной гибридизации с биопсией трофэктодермы на 5-й и 6-й дни культивирования эмбрионов шансы наступления беременности и живорождения у женщин с привычным выкидышем соответствуют таковым у женщин без потерь беременности в анамнезе. В работе проведен анализ пар только с нормальным кариотипом, и сделан вывод о нецелесообразности проведения ПГТ-А методами а-CGH у данной когорты пациентов. Проведение преимплантационного генетического скрининга методом сравнительной геномной гибридизации с биопсией трофэктодермы, по

мнению авторов, у женщин с потерями беременности в анамнезе улучшает репродуктивные исходы в программах ВРТ, увеличивая частоту наступления беременности в 2,1 раза и частоту живорождения в 2,4 раза за счет подгруппы пациенток среднего возраста (30–39 лет) с нормальным ИМТ ($\leq 24 \text{ кг/м}^2$), у которых при проведении ПГТ-А шансы живорождения повышаются в 5 раз.

Аналогичные данные были получены зарубежными исследователями. Было выполнено многоцентровое проспективное пилотное исследование с января 2017 г. по июнь 2018 г.[20]. Всего для анализа была набрана 171 пациентка: группа привычного невынашивания, включающая 41 пациентку с ПГТ-А и 38 — без него; и группа с повторными неудачами имплантации (RIF) — соответственно 42 и 50 пациенток. Для групп с ПГТ-А было отобрано не менее 10 женщин в каждой возрастной группе (35–36, 37–38, 39–40 и 41–42 года). У пациенток в группе привычного невынашивания было два или более выкидыша, и по крайней мере один случай анеуплоидии был установлен с помощью предшествующего тестирования. В группе RIF беременностей не было, даже после как минимум трех переносов эмбрионов. Биопсия трофэктодермы и сравнительная геномная гибридизация (a-CGH) использовались для ПГТ-А. Сравнивали частоту живорождений у пациенток с ПГТ-А и без ПГТ-А. Статистически значимых различий в показателях живорождения на одну пациентку с ПГТ-А и без ПГТ-А не было: соответственно 26,8% против 21,1% в группе привычного выкидыша и 35,7% против 26,0% в группе RIF. Также не было различий в частоте выкидышей в расчете на клиническую беременность с проведением ПГТ-А и без: соответственно 14,3% против 20,0% в группе привычного выкидыша и 11,8% против 0% в группе RIF. ПГТ-А улучшило частоту живорождения на одну процедуру переноса эмбрионов как в группах привычного выкидыша (52,4% против 21,6%, скорректированное ОШ 3,89; 95% ДИ 1,16–13,1), так и в группах RIF (62,5% против 31,7%, скорректированное ОШ 3,75; 95% ДИ 1,28–10,95). Кроме того, было показано, что ПГТ-А снижает частоту

биохимических беременностей: 12,5% и 45,0%, скорректированное ОШ 0,14; 95% ДИ 0,02–0,85 в группе привычного выкидыша и 10,5% и 40,9%, скорректированное ОШ 0,17; 95% ДИ 0,03–0,92 в группе RIF.

Большая часть невынашивания беременности в группе привычного выкидыша может быть связана с анеуплоидией эмбрионов, поскольку ПГТ-А снизило общую частоту невынашивания беременности у этих пациенток. Хотя применение ПГТ-А не улучшало показатель живорождения на одну пациентку, оно имело преимущество: уменьшало количество переносов эмбрионов, необходимых для достижения такого же количества живорождений.

Как видно из представленных выше работ, привычное невынашивание может быть вызвано анеуплоидией эмбрионов, но в общей когорте пациенток молодого возраста применение ПГТ-А нецелесообразно. В настоящее время большее внимание уделяют иммунологическим аспектам развития беременности у молодых пациенток. Недавние исследования показали, что p53/Mdm2-опосредованное убиквитинирование IGF-1R может быть обусловлено работой системой киназ-рецепторов, связанных с G-белком (GRK)/ β -arrestin1. Научные работы подтвердили, что повышенная экспрессия p53 и Mdm2 может быть ответственна за апоптоз во время замершей беременности [21]. Однако информации о β -аррестине-1 при замершей беременности не было. Экспрессия β -аррестина-1 в образцах ворсин в группе замершей беременности была значительно ниже, чем в контрольной группе, по данным количественной ПЦР в реальном времени и иммуногистохимии. Кроме того, у пациенток с замершей беременностью наблюдались значительно более высокие уровни p53, Mdm2, HIF-1 α и более низкий уровень VEGF по данным иммуногистохимии. Функциональные исследования показали, что подавление β -аррестина-1 в клетках HTR-8 ингибирует клеточную инвазию. Экспрессия белков ERK и АКТ в клетках HTR-8 была значительно снижена за счет снижения экспрессии β -аррестина-1, в то время как экспрессия p53, Mdm2, NF- κ B была повышена.

Сверхэкспрессия β -аррестина-1 продемонстрировала неблагоприятный эффект. Данные показали, что β -аррестина-1 играет важную роль в поддержании толерантности матери к плоду, снижение экспрессии β -аррестина-1 в образцах ворсинок может быть связано с остановкой в развитии эмбриона. Такие научные работы дают перспективу на разработку новых подходов к оптимизации программ ВРТ у пациенток с привычным невынашиванием, подтверждая нецелесообразность проведения ПГТ-А в данной когорте пациентов.

- *Синдром поликистозных яичников*

СПКЯ — это синдром дисфункции яичников. Его основными признаками являются гиперандрогенизм и морфология поликистозных яичников. Клинические проявления могут включать нарушения менструального цикла, признаки избытка андрогенов и ожирение. СПКЯ связан с повышенным риском развития диабета второго типа. В настоящее время репродуктологам стало понятно, что синдром включает в себя более широкий спектр признаков и симптомов дисфункции яичников, чем те, которые определяются исходными диагностическими критериями. Так, диагноз СПКЯ может быть поставлен женщинам и с регулярными менструальными циклами и гиперандрогенией и/или поликистозом яичников. У некоторых женщин с СПКЯ будет поликистоз яичников без клинических признаков избытка андрогенов, но будут проявляться признаки дисфункции яичников.

СПКЯ остается синдромом, и поэтому ни один диагностический критерий (такой, как гиперандрогенизм или поликистоз яичников) не является достаточным для клинической диагностики. СПКЯ также остается диагнозом исключения. Следует исключить известные расстройства, которые имитируют фенотип СПКЯ. Клиническое фенотипирование СПКЯ включает определение наличия клинического и/или биохимического избытка андрогенов (гиперандрогения) при исключении сопутствующих нарушений.

Определение синдрома поликистозных яичников было основано на общем мнении 27 экспертов по СПКЯ, собравшихся в Роттердаме (Нидерланды) в мае 2003 г. В результате этой встречи к определению были добавлены ультразвуковые характеристики морфологии поликистозных яичников, что сделало его более сложным. Критерии СПКЯ ESHRE/ASRM (2003 г.) требовали наличия двух из следующих трех признаков: признаки клинического или биохимического гиперандрогенизма; хроническая овуляторная дисфункция; и/или ультразвуковые характеристики морфологии поликистозных яичников, после исключения вторичных причин. Важно отметить, что введение Роттердамских критериев привело к значительному увеличению числа пациенток с диагнозом СПКЯ, а также к расширению гетерогенности фенотипов СПКЯ.

Бесплодие при СПКЯ в основном обусловлено ановуляцией. Аномальный эндометрий, вызывающий повторяющиеся выкидыши и неудачи имплантации, также является причиной бесплодия у женщин с СПКЯ. Нетипичный уровень гормонов и рецепторов в эндометрии при СПКЯ оказывает негативное воздействие на течение периода «окна имплантации», делая микроокружение неблагоприятным для имплантации эмбриона. На сегодняшний день было проведено множество исследований для определения роли генов-кандидатов в рецептивности эндометрия, но при использовании полногеномного подхода доступно очень мало данных.

У пациенток с СПКЯ наблюдали неблагоприятные исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ, включая нарушение созревания ооцитов, снижение частоты оплодотворения, бластуляции и имплантации, а также более высокие показатели невынашивания беременности. Впоследствии пациентки с СПКЯ также имеют повышенный акушерский риск — риск преэклампсии, гестационного сахарного диабета, преждевременных родов и младенческой смертности. Не совсем понятно, каким образом СПКЯ влияет на качество ооцитов и эмбрионов. Интересно, что исследование, проведенное Wood et al., продемонстрировало аномальную экспрессию генов в ооцитах

женщин с СПКЯ, особенно связанных с ключевыми биологическими процессами в раннем развитии эмбриона. Эти гены включали такие процессы, как гены митотического клеточного цикла, которые могут регулироваться богатой андрогенами (и инсулином) средой фолликула при СПКЯ.

Научные исследования показали, что ооциты, развивающиеся у пациентки с СПКЯ, имеют нарушенную компетентность из-за аномального развития фолликулов по причине гиперандрогенемии. Кроме того, исследования продемонстрировали нарушение экспрессии генов в ооцитах женщин с СПКЯ из-за передачи сигналов андрогенов и/или инсулина, оба из которых повышены в фолликулах пациенток при СПКЯ. Хотя у части женщин с СПКЯ, проходящих лечение ЭКО, наблюдают нормальное развитие эмбриона и благополучные исходы беременности, у многих пациенток с СПКЯ снижается частота оплодотворения, бластуляции и имплантации, а также повышается частота выкидышей. Было показано, что способность к развитию эмбрионов, возникающих из ооцитов низкого качества, нарушена [22]. В общей сложности 64 пациента с СПКЯ были сопоставлены 1:1 по возрасту и ИМТ с контрольной популяцией, перенесшей лечение бесплодия методами ВРТ за тот же период. Было проанализировано 990 эмбрионов от пациентки с СПКЯ и 628 из контрольной популяции, всего 1618 эмбрионов. При вторичном анализе были исследованы 715 эмбрионов от 47 пациенток с СПКЯ и избытком андрогенов и 449 эмбрионов от 47 женщин из контрольной группы. Не анализировались 275 эмбрионов от 17 пациенток с СПКЯ, у которых не было признаков или симптомов избытка андрогенов. Результаты этого исследования убедительно доказывают измененное развитие эмбрионов до имплантации при СПКЯ. При этом точный механизм более быстрого эмбрионального роста и его влияние на дальнейшее развитие и выживание эмбриона неизвестен.

Для оценки эффективности программ ВРТ с ПГТ было проведено проспективное когортное исследование, чтобы определить, увеличивает ли

хромосомная анеуплоидия риск ранних спонтанных абортс у пациенток с синдромом поликистозных яичников [23]. Всего под наблюдением находилась 1461 пациентка, забеременевшая после ЭКО и переноса эмбрионов. Из них 100 женщин, беременность которых закончилась ранним самопроизвольным выкидышем: 32 — с СПКЯ и 68 — без СПКЯ. Дальнейший статистический анализ с учетом возраста матери показал, что невынашивание беременности, связанное с анеуплоидией эмбрионов, у женщин с СПКЯ встречается значительно реже ($p=0,001$). Авторы делают вывод, что анеуплоидия эмбрионов не играет существенной роли в ранних самопроизвольных абортах у женщин с СПКЯ. С большей вероятностью за повышенный риск раннего самопроизвольного выкидыша у пациенток с СПКЯ ответственны материнские факторы, приводящие к нарушениям эндометрия.

В другом исследовании было проанализировано 268 женщин (ИМТ 18–25 кг/см²) [24]. В исследуемой группе было 67 женщин с СПКЯ, в контрольной — 201 без СПКЯ. Всем пациентам проводили ПГТ-А. Были сбалансированы факторы, которые могли повлиять на результат. Во-первых, эмбриональный фактор. В каждом цикле переносилась только одна высококачественная бластоциста с оценкой ЗВВ или выше, и все эмбрионы были диагностированы как эуплоидные. Самое главное, что эмбрионы в контрольной группе полностью соответствовали исследуемой группе. Во-вторых, эндометриальный фактор. Хорошо известно, что эндометрий является одним из важнейших факторов имплантации эмбриона. В данном исследовании не были включены пациентки с нарушением рецептивности эндометрия, в том числе пациентки с НГЭ, внутриматочными спайками или тонким эндометрием (толщина эндометрия <8 мм в день начала приема прогестерона), а толщина эндометрия пациенток основной и контрольной групп была сопоставима. В-третьих, масса тела. Все включенные пациенты имели нормальный ИМТ. Анализ подобранных пар показал, что даже при нормальном ИМТ и эуплоидных эмбрионах пациентки с СПКЯ по-прежнему

подвержены повышенному риску раннего выкидыша, а уровень живорождения у пациенток с СПКЯ был значительно ниже, чем у пациенток без СПКЯ. Несмотря на относительно небольшой размер группы женщин с СПКЯ, поскольку исключили значительное количество случаев с сопутствующими факторами, результаты были валидными благодаря хорошо контролируемому дизайну.

Исследование показало, что женщины с СПКЯ подвержены повышенному риску раннего выкидыша независимо от возраста, ИМТ и кариотипа эмбриона. Авторы сделали вывод, что эндокринологические нарушения, влияющие на функцию эндометрия, могут быть более важными факторами, способствующими неблагоприятным исходам беременности. Другие исследования также показали, что преимплантационный эмбрион не является причиной субфертильности при СПКЯ, а проведение ПГТ-А у данной когорты пациентов с бесплодием в молодом возрасте женщины нецелесообразно.

Функциональные изменения эндометрия в результате эндокринных нарушений у женщин с СПКЯ, по-видимому, являются основным неблагоприятным фактором успешного исхода беременности [24].

Таким образом, в опубликованных в научной литературе исследованиях показано, что исходы беременности у женщин с СПКЯ после переноса эуплоидных эмбрионов были несколько хуже по сравнению с женщинами без СПКЯ, и это с большей долей вероятности связано с особенностями функционирования эндометрия, а не с плоидностью самого эмбриона. Необходимы дальнейшие исследования для изучения возможных механизмов самопроизвольных выкидышей у пациенток с СПКЯ с акцентом на последствия эндокринных нарушений, приводящих к нарушениям эндометрия. У молодых пациенток с СПКЯ применение ПГТ-А не может быть методом повышения эффективности программ ВРТ.

- *Наружный генитальный эндометриоз*

Согласно клиническим рекомендациям, утвержденным Министерством здравоохранения РФ в 2020 г., эндометриоз представляет собой патологический процесс, всегда сопровождающийся воспалительной реакцией, при котором определяется наличие ткани по морфологическим и функциональным свойствам подобной эндометрию вне полости матки. Согласно современной классификации, выделяют генитальный и экстрагенитальный эндометриоз. Генитальный эндометриоз представлен внутренним (или аденомиозом) и наружным эндометриозом (эндометриоз шейки матки, влагалища, промежности, ретроцервикальной области, яичников, маточных труб, брюшины, прямокишечно-маточного углубления и др.). Данное состояние сопровождается тазовыми болями, аномальными маточными кровотечениями и, зачастую, бесплодием [105,106]. Важно отметить, что не все женщины с эндометриозом страдают бесплодием. Однако распространенность этого заболевания намного выше среди пациенток, не способных к самостоятельному зачатию (около 30–50%), чем среди фертильного населения (10–15%) [107].

Этиопатогенетические механизмы генитального эндометриоза до сих пор достаточно не изучены. Предложено несколько теорий возникновения и прогрессирования данного заболевания. В основе патогенеза лежат дисгормональные эстрогензависимые нарушения, иммунные изменения, воспалительная реакция, неоангиогенез. Результаты исследований показали, что ткань эндометрия у пациенток, страдающих генитальным эндометриозом, содержит повышенную экспрессию фермента ароматазы, участвующую в локальном синтезе эстрадиола за счет активации перехода андростендиона в эстрон. Далее промежуточное соединение эстрон под влиянием 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы переходит в эстрадиол. Распространение очагов эндометриоза может быть обусловлено их способностью синтезировать эстрадиол *de novo*, активирующий

пролиферацию клеток и киназные сигнальные пути, которые ингибируют апоптотические процессы.

Для адгезии и роста эктопического эндометрия у пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ) необходимы дополнительные факторы, такие, как изменения иммунной толерантности и ангиогенного потенциала. Кроме того, в настоящий момент широко обсуждается роль стволовых клеток, генетических мутаций и эпигенетических факторов в развитии НГЭ. Было показано, что у сестер пациенток, страдающих НГЭ, риск развития заболевания составляет 8,8% по сравнению с контрольной группой (1,5%) [108]. Вероятность развития НГЭ у пациенток, чьи матери страдали НГЭ, также выше.

Несмотря на ощутимые успехи в области ВРТ, отмечаются неудачи программ ЭКО/ИКСИ в когорте женщин с эндометриозом, что связано с рядом причин [109]. При различной локализации очагов эндометриоза активируются патогенетические механизмы, лежащие в основе бесплодия при данном заболевании. Пациентки с эндометриозом яичников имеют истощение пула примордиальных фолликулов в коре яичников, недостаточно хорошо отвечают на стимуляцию, что приводит к снижению количества и качества зрелых ооцитов по сравнению с аналогичной возрастной группой без эндометриоза [106]. Известно также, что эндометриоз ассоциирован с нарушениями процессов трансформации эндометрия, происходящих во время лютеиновой фазы естественного или стимулированного цикла, что приводит к неполной децидуализации и характеризуется сложностями имплантации эмбриона и снижением частоты наступления беременности [110].

Эндометриоз сопровождается местной воспалительной реакцией с привлечением и активацией макрофагов, выбросом цитокинов и простагландинов, высвобождением активных форм кислорода (АФК), мобилизацией антиоксидантного ответа, установлением локального окислительно-восстановительного дисбаланса с последующим повреждением

липидов, белков, нуклеиновых кислот и других мишеней [111]. Воздействие такой «токсичной среды» влияет и на качество гамет, и на сам процесс оплодотворения, снижая шансы на естественное зачатие и приводя к бесплодию. Также подобное воздействие сказывается на качестве эмбрионов и их способности к развитию, что в глобальном масштабе приводит к снижению результатов программ ВРТ [112].

В то время как связь между эндометриозом и бесплодием очевидна, патофизиологические механизмы, лежащие в основе этого процесса, остаются в значительной степени неизвестными. Дискуссия специалистов репродуктивного сообщества в отношении предполагаемых механизмов бесплодия и неудач ВРТ при эндометриозе лежит в плоскости обсуждения вопросов, касающихся снижения качества и количества ооцитов. Обсуждается роль АФК в нарушении образования веретен деления во время мейоза, а также в нарушении функций митохондрий. Во время мейоза полное созревание ядра критически зависит от формирования нормальных веретен деления, управляющих сегрегацией и организацией хромосом. Мейотические ошибки являются основной причиной хромосомных анеуплоидий эмбрионов человека. Они имеют преимущественно материнское происхождение и возникают на разных стадиях оогенеза, прежде всего за счет нерасхождения гомологичных хромосом или сестринских хроматид, что приводит к несбалансированному распределению генетического материала. В связи с этим открытым остается вопрос, являются ли ооциты, полученные в результате стимуляции женщин с эндометриозом, хромосомно нестабильными и может ли это влиять на частоту анеуплоидий у данных пациенток и приводить к снижению успеха программ ВРТ.

В период ранних этапов эмбриогенеза у пациенток, страдающих генитальным эндометриозом, описаны различные аномалии дробления, ядерные и цитоплазматические нарушения, аномальный хетчинг, эпигенетическое репрограммирование эмбриона, а также функциональная незрелость зоны пеллюцида ооцитов [113].

Современные исследования о влиянии эндометриоза на генетический статус эмбрионов достаточно противоречивы, что требует более пристального рассмотрения данной проблемы в рамках программ лечения бесплодия методами ВРТ и оценки целесообразности преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на анеуплоидии.

1.2. Лечение мужского бесплодия методами ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием

Внедрение в 1992 г. интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ) резко изменило процедуру лечения бесплодия у пар с выраженным (тяжелым) мужским фактором и позволило таким пациентам иметь биологическое потомство. Однако, согласно отчету Международного комитета по мониторингу вспомогательных репродуктивных технологий, несмотря на развитие лабораторных технологий, частота наступления беременности после ИКСИ составляет около 25–30%, а частота родов — около 20%. В большинстве случаев стратегия выбора эмбриона для переноса основывается на морфологических характеристиках, в то время как эмбрион отличного или хорошего качества может оказаться генетически аномальным. На сегодняшний день хорошо известно, что анеуплоидии являются наиболее частыми генетическими аномалиями, которые приводят к неудачам имплантации и потерям беременности на ранних сроках более чем в 50% случаев.

На бесплодие, связанное с мужским фактором, по разным данным приходится от 20 до 50% всех случаев. Из них чуть более 20% имеют диагноз тяжелой формы мужского бесплодия [85]. Стоит также отметить, что отсроченное родительство во всем мире становится все более распространенным явлением как для женщин, так и для мужчин [86,87], в связи с чем растет интерес к изучению влияния отцовского возраста на мужскую фертильность, репродуктивный потенциал и здоровье потомства. Известно, что старший репродуктивный возраст мужчин отрицательно влияет на функции яичек, гормональный баланс мужской репродуктивной

системы, параметры спермы, а также на целостность генома и эпигенома сперматозоидов. Однако недавний систематический обзор показал, что возраст отца не был связан с результатами ВРТ [88], но данные в отношении эмбриологического этапа менее достоверны и неоднозначны.

Поскольку мужской фактор является одним из наиболее часто встречающихся показаний к проведению ВРТ, связь между патологией сперматозоида и частотой анеуплоидии эмбриона также находится в фокусе внимания, а вопрос о том, следует ли рассматривать мужской фактор бесплодия в качестве показания для проведения ПГТ-А, все еще остается спорным [89]. Ранние исследования по анализу частоты анеуплоидий показали, что мужское бесплодие может способствовать более высокой распространенности анеуплоидных эмбрионов при ВРТ. Однако этот вывод в большей мере основан на исследованиях с использованием флюоресцентного анализа гибридизации *in situ* (FISH) для ограниченного числа хромосом на эмбрионах на стадии дробления [90,91].

В статье китайских авторов S. Cheung et al. (2019 г.) было проанализировано 113 мужчин и 5 донорских образцов в контрольной группе [92]. Часть образцов исследовалась на анеуплоидию сперматозоидов методом FISH, другие образцы были оценены с помощью полногеномного секвенирования, а также анализировалась экспрессия генов с помощью секвенирования РНК. Авторы выявили, что средний уровень анеуплоидии был самым высоким в группе мужчин старше 55 лет. В этой же группе был снижен коэффициент оплодотворения и уровень клинической беременности. Кроме того, были идентифицированы 17 генов с высокой частотой мутаций, которые играют ключевую роль в гаметогенезе, оплодотворении и развитии эмбриона.

В том же году N. Tarozzi et al. было изучено влияние качества спермы на количество мозаичных эмбрионов [93]. Анализ результатов исследования не показал статистически значимых различий между группами с мужским и женским фактором бесплодия с точки зрения количества эуплоидных и

анеуплоидных бластоцист, однако более высокая частота мозаичных бластоцист наблюдалась в первой группе (то есть с мужским фактором бесплодия). Также между группами с тяжелым мужским фактором бесплодия по сравнению с другими циклами ПГТ-А (без тяжелого мужского фактора) не было статистических значимых различий с точки зрения имплантации, клинической беременности и коэффициента живорождения, а также в частоте эуплоидных бластоцист. Однако значительно более высокая частота мозаичных бластоцист наблюдалась в группе с тяжелым мужским фактором бесплодия.

Целью работы Richard T. Scott III et al. (2020 г.) было исследовать, влияет ли количество митохондриальной ДНК на репродуктивный потенциал эуплоидных бластоцист [94]. Авторы оценивали 165 эуплоидных бластоцист, которые были перенесены в программах ВРТ, а также 78 случаев, когда переносили две бластоцисты, если первая попытка не привела к имплантации эмбриона, а второй перенос был успешным. Имплантация эмбриона не была связана с относительным числом копий митохондриальной ДНК, также не было корреляции между возрастом пациентки и относительным числом копий митохондриальной ДНК. Авторы считают, что количество митохондриальной ДНК не может являться диагностическим критерием при выборе эмбриона для переноса.

Amber M. Klimczak et al. (2021 г.) описывают, как количество и качество сперматозоидов, ооцитов и эмбрионов влияют на привычное невынашивание беременности [95]. В 50–70% случаев причиной привычного невынашивания беременности являются генетические или хромосомные нарушения. Поэтому важно оценить не только вклад ооцита, его структурные или функциональные аномалии, но и мужскую фертильность. Помимо оценки основных параметров спермы авторы проводят некоторые дополнительные тесты, например оценивают ДНК-фрагментацию сперматозоидов. Кроме того, в статье описываются такие методы разделения сперматозоидов, как микрофлюидика, разделение клеток с магнитной

активацией и др. Исследователи делают вывод, что качество сперматозоида, участвующего в оплодотворении в программах лечения бесплодия методами ВРТ, крайне важно, но при этом не описаны пороговые значения эякулята, при которых целесообразно проведение ПГТ-А, и не указаны преимущества одного метода подготовки сперматозоидов к ЭКО перед другим.

L. Rodrigo et al. (2019 г.) также оценивали вклад мужского фактора в анеуплоидии эмбрионов [96]. Анеуплоидии эмбриона мейотического происхождения возникают в случае, когда анеуплоидный сперматозоид оплодотворяет эуплоидный ооцит. Рекомбинация и ошибка репарации ДНК во время сперматогенеза могут привести к аномальной сегрегации гомологичных хромосом в мейозе I или сестринских хроматид в мейозе II, поэтому сперматозоиды будут анеуплоидными или диплоидными. Авторы анализировали влияние концентрации, подвижности, морфологии сперматозоидов, результатов FISH на частоту аномалий сперматозоидов, а также оценивали клинические исходы в зависимости от частоты анеуплоидии сперматозоидов. Несмотря на то что нет линейной корреляции частоты анеуплоидных и диплоидных сперматозоидов с концентрацией сперматозоидов, общая частота анеуплоидий выше у мужчин с тяжелой олигозооспермией и увеличивается с уменьшением концентрации сперматозоидов. Связи между аномальными результатами флуоресцентной гибридизации с подвижностью или морфологией сперматозоидов обнаружено не было. Аналогичные случаи анеуплоидии и диплоидии наблюдаются в сперматозоидах как с хорошей подвижностью, так и с низкой, или полностью неподвижными. В случае тяжелой тератозооспермии со сперматозоидами с крупными головками или множеством хвостов, риск анеуплоидии и полиплоидии более высокий по сравнению с нормозооспермией. При повышенной частоте анеуплоидий сперматозоидов частота наступления беременности и имплантации ниже, а частота выкидышей выше. Авторы настаивают, что ПГТ-А может увеличить вероятность наступления беременности при мужском факторе бесплодия.

Исследование подтверждает, что в программах с ПГТ-А при аномальных результатах FISH сперматозоидов частота имплантации и живорождения выше, чем в программах без использования ПГТ-А.

В России изучением влияния мужского фактора бесплодия на исходы программ ВРТ активно занималась Ж.И. Глинкина с коллегами [97]. Было показано, что по результатам ПГТ-А у пар с мутацией AZF локуса хромосомы Y уровень анеуплоидии в ядрах бластомеров эмбрионов составил 59,7%. Наиболее часто выявляли анеуплоидии гоносом (43,4%) и патологию по хромосоме 18 (32,1%). Сравнительный анализ исходов программ ЭКО/ИКСИ в исследуемых группах не выявил статистически значимых различий по показателям частоты имплантации, частоты наступления клинической беременности в расчете на цикл стимуляции и на перенос эмбрионов. Однако частота репродуктивных потерь в группе без проведения ПГТ-А была в 7 раз выше, чем с преимплантационным генетическим тестированием, и составила 88,9% против 12,5% ($p=0,007$). Частота живорождения в расчете на циклы с переносом эмбрионов была в 8 раз выше в группе с ПГТ-А, чем без нее, и составила 22,6% и 2,9% соответственно ($p=0,014$). Авторы сделали вывод, что пары с мужским фактором бесплодия и мутацией AZF локуса хромосомы Y составляют группу риска по невынашиванию беременности и рождению детей с хромосомной патологией, что требует индивидуализации стратегий лечения бесплодия у таких пациентов [97]. Для повышения эффективности программ ВРТ у группы пациентов с мужским фактором бесплодия целесообразно проведение преимплантационного генетического скрининга с анализом полного спектра хромосом у эмбрионов. Однако в работе были существенные ограничения, связанные с неполным спектром обследования хромосом, что обусловлено с еще не разработанными методами полногеномной амплификации.

Такие же ограничения по методам изучения геномного статуса эмбриона были в работе Н.А. Беляевой с коллегами (2016 г.), которые также

убедительно доказывают, что мужской фактор бесплодия может приводить к нарушениям в расхождении хромосом в процессе делений дробления преимплантационных эмбрионов [98]. Авторы считают, что для профилактики рождения детей с хромосомными патологиями у пар с нарушениями сперматогенеза целесообразно проведение преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии.

Эти же выводы были сделаны при использовании полногеномной амплификации Suhua Jiang et al. (2020 г.). Ученые обнаружили статистически значимую корреляцию между частотой дисомии сперматозоидов и результатом ПГТ-А [99]. Однако никто из вышеприведенных авторов не указывает на пороговые значения эякулята в день оплодотворения, при которых резко повышается уровень анеуплоидий в эмбрионах.

В работе Carmen Rubio et al. (2020 г.) авторы отметили, что у мужчин концентрация сперматозоидов в эякуляте связана с более высоким риском анеуплоидии [100]. При тяжелых формах олигозооспермии повышается количество мозаичных бластоцист в анализируемых циклах ПГТ-А. Кроме того, у пациентов с тяжелой олигозооспермией или криптозооспермией, являющихся носителями микроделечий Y-хромосомы, наблюдается увеличение числа анеуплоидных эмбрионов, у которых выделяют моносомии X-хромосомы. Увеличение количества сперматозоидов с дисомиями по Y-хромосоме связано с увеличением числа анеуплоидий эмбриона, совместимых с жизнью (синдромы Патау, Клайнфельтера, Тернера и др). Однако количество диплоидных сперматозоидов напрямую зависит от количества триплоидных эмбрионов, что чаще всего приводит к невынашиванию беременности [100].

Мозаицизм эмбрионов вызван неправильным делением и сегрегацией хромосом во время митоза. Повышение частоты анеуплоидий и мозаицизма может быть также связано с условиями в эмбриологической лаборатории (среда для культивирования эмбрионов, pH, кислород, осмоляльность, температура). Lorena Rodrigo et al. (2020 г.) оценили влияние на

распределение эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов таких факторов, как показания для выполнения ПГТ-А, использование нативных или витрифицированных ооцитов и эмбрионов, ответ яичников на стимуляцию, концентрация сперматозоидов, возраст супругов [101]. Анеуплоидии разделяли на полные и сегментарные, мозаицизм — на низкой и высокой степени. Регрессионный анализ показал, что наибольшее влияние на анеуплоидию оказывает возраст женщины, ответ яичников и циклы с витрифицированными эмбрионами. Вклад сперматозоидов в анеуплоидию эмбриона остался спорным. В исследовании описана более высокая частота мозаичных бластоцист при факторе мужского бесплодия, а уровень мозаицизма положительно коррелирует с тяжестью нарушений сперматогенеза. Самый высокий уровень мозаицизма наблюдался у пациентов с олигозооспермией. Полные хромосомные анеуплоидии в биопсиях трофэктодермы имеют преимущественно материнское происхождение, тогда как сегментарные в основном происходят от отца. Также было описано влияние специфических анеуплоидий сперматозоидов на хромосомные аномалии эмбрионов. Тем не менее, по результатам регрессионного анализа, количество сперматозоидов и мужской фактор как показание к ПГТ-А не влияют на частоту анеуплоидии.

В 2021 г. Rui Xu с коллегами провели ретроспективное когортное исследование для оценки ПГТ-А при тяжелом факторе мужского бесплодия на исходы программ ВРТ по сравнению со стандартными программами с использованием ИКСИ [102]. Не было выявлено различий в частоте клинической беременности, однако в группе с ПГТ-А была значительно ниже частота ранних прерываний беременности. При этом частота пролонгированной беременности была одинаковой в обеих группах. Таким образом, результаты исследования показывают, что проведение ПГТ-А может улучшить исходы программ ВРТ для пар с тяжелым фактором мужского бесплодия за счет значительного снижения частоты ранних выкидышей.

Целью исследования Michal Dviri et al. (2020 г.) было выявить корреляцию между возрастом мужчины и хромосомными аномалиями эмбрионов [103]. В исследовании мужчины были разделены на три группы: группа А, ≤ 39 лет, группа В, 40–49 лет, группа С, ≥ 50 лет. Во всех анализируемых циклах ЭКО были использованы ооциты доноров. Статистически значимых различий между отцовскими возрастными группами не было обнаружено по показателям эуплоидии, частоты анеуплоидии и частоты мозаицизма, но скорость оплодотворения была ниже в группе С по сравнению с группами В и А. Различий в скорости образования бластоцист между исследуемыми группами не было найдено. Однако частота сегментарных анеуплоидий была значительно выше в группе мужчин старше 50 лет по сравнению с другими двумя группами.

Достаточно большое число работ, посвященных влиянию патологии сперматогенеза на генетический статус эмбриона в программах лечения бесплодия методами ВРТ, указывает на противоречивость данных, а также на отсутствие точных критериев оценки эякулята, при которых наиболее целесообразно проведение программ ПГТ-А. При этом научные работы по данному вопросу в России крайне малочисленны, что говорит о необходимости более пристального изучения эмбриологического этапа программ ВРТ в зависимости от показателей эякулята в день трансвагинальной пункции яичников/оплодотворения.

1.3. Аномалии кариотипа у пар с бесплодием в программах лечения бесплодия методами ВРТ

Большинство (50–60%) потерь беременности на раннем сроке обусловлены хромосомными нарушениями, унаследованными от родителей или впервые возникшими в эмбрионе [141]. Наиболее частой хромосомной аномалией, выявляемой у 2–4% пар с привычным невынашиванием, являются сбалансированные транслокации, тогда как в общей популяции частота транслокаций составляет 0,7% [142]. Сбалансированные транслокации могут быть реципрокными (около 60% случаев), т.е. с обменом

участками между хромосомами, или робертсоновскими (около 40% случаев), при которых имеет место слияние акроцентрических хромосом с полной или частичной утратой материала коротких плеч. Гораздо реже встречаются парацентрические или перицентрические инверсии, сопряженные с повышенным риском привычного невынашивания беременности. Все сбалансированные транслокации могут быть диагностированы при кариотипировании пар [143].

Носительство сбалансированных транслокаций обычно протекает бессимптомно, и кариотип половых клеток родителей при этом может быть как нормальным, так и содержащим сбалансированные или несбалансированные транслокации. Прогноз успешного наступления и течения беременности зависит от того, какая именно хромосомная aberrация присутствует в родительском кариотипе. Так, при наличии несбалансированных хромосомных аномалий в эмбрионе частота рождения здорового ребенка составляет <1% [144]. В этом случае беременность обычно заканчивается выкидышем, но также может привести к мертворождению или рождению детей с тяжелыми врожденными пороками развития. Известно, что при кариотипировании абортусов несбалансированные транслокации наблюдаются приблизительно в 25–40% случаев. Тем не менее, у большинства пар со сбалансированными транслокациями рождаются здоровые дети.

Нельзя не отметить, что у пар с носительством сбалансированных транслокаций выжидательная тактика в целом приносит хорошие результаты. Недавний систематический обзор, включивший 20 исследований, показал, что для 847 пар, у которых зачатие наступило самопроизвольно, частота живорождения варьировала от 25 до 71% а для 562 пар, которым проводили ВРТ с ПГТ,— от 26,7% до 87% [145]. Исследования применения ПГТ-СП у пациентов со сбалансированными транслокациями вне зависимости от наличия привычного невынашивания в целом демонстрируют частоту рождения здорового ребенка около 25% в расчете на перенос эмбрионов и

около 72% после подтверждения наступления беременности [146]. Таким образом, после положительного результата теста на наступление беременности частота невынашивания после применения ПГТ-СП сравнима с таковой в общей популяции.

В крупном исследовании 192 пациенток с наличием трех и более потерь беременности в анамнезе, у которых по поводу реципрокных или робертсоновских транслокаций было осуществлено 272 цикла ПГТ [147], беременность наступила у 35%, при этом 13% беременностей закончились потерей. Частота живорождения составила 22% в расчете на начатый цикл, при этом кумулятивная частота живорождения после 1,4 цикла была равна 31%. Сравнение данных исследования с результатами спонтанных беременностей у пациенток с привычным невынашиванием, беременность у которых наступила самостоятельно, показывают, что применение ПГТ значительно снижают частоту потерь беременности (13% по сравнению с 26–64%), а также сокращает время до наступления прогрессирующей беременности (1,4 цикла ЭКО с ПГТ, или менее 4 месяцев, по сравнению с 6 годами).

При проспективном исследовании 59 пар со сбалансированными транслокациями, которым было проведено 132 цикла ВРТ с ПГТ, частота живорождения составила 20% в расчете на начатый цикл [148]. При проведении до 3 циклов ВРТ с ПГТ-СП вероятность рождения живого ребенка достигла 50%, при этом риск невынашивания соответствовал наблюдаемому в общей популяции. В недавнем исследовании применения ПГТ-СП у пар с транслокациями, в котором использовался метод определения однонуклеотидных повторов, частота рождения здорового ребенка составила 38% в расчете на биопсию эмбриона и 52% в расчете на перенос эмбрионов, при этом частота репродуктивных потерь составляла 10% [149].

По данным двух опубликованных в 2011 г. систематических обзоров, частота живорождения в группе пациенток с нарушениями кариотипа после

ПГТ составила 31–35% по сравнению с 55–74% при выжидательной тактике и медицинском наблюдении, что позволило авторам сделать вывод о нецелесообразности систематического применения ПГТ в парах с привычной потерей беременности и наличием сбалансированных транслокаций [150, 151]. Однако авторы не указывают частоту гинекологических осложнений после множественных неразвивающихся беременностей при выжидательной тактике.

Еще в одном исследовании применения ПГТ-СП при родительских сбалансированных транслокациях сравнивались результаты у 52 пациенток с привычным невынашиванием и 37 пациенток, которым было проведено ПГТ с применением флюоресцентной гибридизации *in situ* [152]. Значимых различий в отношении частоты живорождения (37,8% по сравнению с 53,8% соответственно), кумулятивной частоты живорождения (67,6% по сравнению с 65,4% соответственно) и среднего интервала от консультации генетика до наступления беременности (12,4 мес. по сравнению с 11,4 мес. соответственно) исследователям выявить не удалось. Тем не менее применение ПГТ позволило значительно сократить среднее количество потерь беременности ($0,22 \pm 0,42$ по сравнению с $0,58 \pm 0,78$, $p=0,012$).

В ретроспективном исследовании 91 пары с наличием реципрокной транслокации у одного из партнеров, двумя или более потерями беременности в анамнезе и низким риском рождения ребенка с несбалансированными хромосомными аномалиями была произведена оценка результатов 171 «нативного» цикла и 11 циклов после криоконсервации после при ПГТ с использованием метода FISH [153]. Беременность наступила в 52 «нативных» циклах (32 цикла закончились родами, 20 — выкидышами) и 5 циклах после криоконсервации (соответственно 3 и 2). Частота живорождения после «нативных» циклов и циклов криоконсервации в целом составила 19%, а частота невынашивания достигла 39% в расчете на беременность. Кумулятивная частота наступления беременности составила 32%. В данном исследовании после применения ПГТ риск потери

беременности в парах с реципрокными транслокациями остался высоким, а вероятность рождения здорового ребенка — низкой, что позволило авторам рекомендовать естественное зачатие как вариант выбора для пар со сбалансированными транслокациями низкого риска.

В исследовании применения ПГТ у пар с транслокациями и последующим переносом размороженных после криоконсервации эмбрионов в естественном цикле частота хромосомных аномалий достигла 64,2% в случаях успешной амплификации ДНК. Любопытно, что у 34,6% аномальных эмбрионов хромосомные перестройки не были напрямую связаны с имеющимися транслокациями [154]. В небольшом (21 пара с транслокациями) исследовании высокопроизводительное секвенирование следующего поколения также продемонстрировало значительные успехи при диагностике аномалий всех 23 пар хромосом [155].

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что кумулятивная частота рождения здорового ребенка в парах с наличием в анамнезе привычного невынашивания и сбалансированными транслокациями при применении ЭКО с ПГТ или выборе выжидательной тактики ведения пациенток сопоставима. Однако применение ПГТ способно снизить частоту потерь беременности, тем самым устраняя тяжелые психоэмоциональные последствия для пары. Несомненно, процедура ПГТ также связана с эмоциональными и физическими нагрузками, не говоря о финансовых затратах. Тем не менее у пар с транслокациями высокого риска применение ПГТ снижает риска потери беременности и рождения ребенка с несбалансированной формой транслокации. В тоже время при транслокациях низкого риска можно предпочесть выжидательную тактику и пренатальную диагностику наступившей самопроизвольной беременности. Следует подчеркнуть необходимость высококвалифицированного генетического консультирования пары с целью оценить будущие риски и помочь в выборе наилучшего для пары подхода.

1.4. Носительство моногенных заболеваний у фертильных пар как показание к применению ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием

Изначально основной целью применения ПГТ являлось исследование моногенных генетических заболеваний, сохраняющее свое несомненное значение и в настоящее время [114,115,116]. Носительство мутации гена в эмбрионе не препятствует его имплантации в полость матки, но может привести к рождению больного ребенка. Это существенно отличает таких пациентов от пар с высокими рисками хромосомных нарушений в эмбрионах. Перед столкнувшимися с моногенными заболеваниями парами встает вопрос о проведении пренатальной диагностики плода, что сопряжено с тяжелыми медицинскими и этическими проблемами. В данном случае на решение пары влияет как тяжесть заболевания, так и гестационный срок на момент постановки диагноза. При позднем сроке диагностики возможна потребность в проведении операции малого кесарева сечения, зачастую сопряженной с риском осложнений и тяжелыми психологическими последствиями для пациентки.

К настоящему времени использование ПГТ позволяет выявлять более 300 моногенных патологий [117]. Следует отметить, что внедрение в последнее время панелей для генетического тестирования родителей на сотни наследственных патологий с самыми разнообразными фенотипическими проявлениями не всегда позволяет диагностировать при ПГТ-М эмбриона выявленный у будущих родителей ген. Также возникают проблемы при выработке подхода профилактики моногенных заболеваний с неполной пенетрантностью гена и в ситуациях, когда один из партнеров в паре является носителем патологического аллеля, в то время как значение генетического варианта гена у другого партнера неизвестно. Более того, если тестирование родителей на сотни патологических состояний способно выявить носительство нескольких патологических аллелей, может

потребуется разработка алгоритмов выбора эмбрионов с имеющими различное клиническое значение аллелями для переноса после ПГТ-М [118].

Около 20% циклов ПГТ в мире в настоящее время осуществляется у пар, относящихся к группе риска рождения ребенка с моногенной патологией. ПГТ на моногенные заболевания требует исследования однонуклеотидных полиморфизмов или коротких tandemных повторов (STR) для исключения выпадения аллеля, имеющего место в 5–10% локусов, которое может произойти в мутантном локусе вследствие двухцепочечного разрыва ДНК или неудачного отжига при проведении ПЦР [119].

В мире наиболее частыми показаниями для проведения ПГТ с целью исключить моногенные патологии являются муковисцидоз, синдром ломкой хромосомы X (синдром Мартина–Белл) и гемоглобинопатии, особенности диагностики которых наряду с исследованиями генетически обусловленных нарушений сперматогенеза представлены ниже. Большое клиническое значение также имеет ПГТ на такие заболевания, как галактоземия, фенилкетонурия, адреногенитальный синдром, спинально-мышечная атрофия, миотоническая дистрофия, болезнь Шарко–Мари–Тута, нейрофиброматоз, нейросенсорная тугоухость.

Особые медицинские и этические проблемы сопряжены с ПГТ на моногенные заболевания с поздним развитием, такие, как болезнь Гентингтона или рак молочной железы. В данном случае по результатам ПГТ-М перед клиницистами может возникнуть необходимость информирования родителей о наличии у одного из них гена, носительство которого может привести к серьезным медицинским проблемам в будущем.

- *Муковисцидоз*

Муковисцидоз является наиболее часто встречающимся среди пациентов европеоидной расы тяжелым заболеванием, наследуемым по аутосомно-рецессивному типу. Оно обусловлено мутацией гена трансмембранного регулятора муковисцидоза [120] и проявляется

поражением желез внешней секреции и выраженными нарушениями функций органов дыхания. Муковисцидоз характеризуется чрезвычайно гетерогенным спектром мутаций — свыше 1900 (в большинстве случаев представленных точечными мутациями или мелкими делециями) [121]. Согласно данным Консорциума по преимплантационной генетической диагностике Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (European Society of Human Reproduction Embryology, ESHRE), наибольшее количество циклов ПГТ по поводу моногенных заболеваний было проведено с целью выявить ответственные за муковисцидоз мутации [122].

ПГТ-М на муковисцидоз сопряжено с проблемой разработки и оптимизация протоколов для анализа единичных клеток, позволяющих определить широкий спектр вызывающих данное заболевание мутаций. Используемые в настоящее время подходы к диагностике муковисцидоза направлены на обеспечение одновременной амплификации панели коротких tandemных повторов, позволяющих выявить мутантный и дикий аллели, а также наиболее часто встречающиеся мутации гена CFTR p.Phe508del (около 2/3 случаев в мире) [123]. В ситуациях, когда в популяции наблюдается выраженная гетерогенность мутаций гена CFTR, лаборатории вынуждены разрабатывать специфические для каждой пары ПГТ-М на муковисцидоз.

- *Гемоглобинопатии*

Гемоглобинопатии являются наиболее часто встречающейся группой тяжелых моногенных генетических патологий с аутосомно-рецессивным типом наследования. Каждый год в мире рождается около 300–400 тыс. детей с гемоглобинопатиями, включая около 280 тыс. случаев серповидноклеточной анемии и около 40 тыс. случаев большой формы бета-талассемии [128]. ПГТ-М может применяться как для получения беременности без гемоглобинопатии, так и для выявления совместимости с больным ребенком по типу генов главного комплекса гистосовместимости HLA эмбриона, способного впоследствии стать донором гемопоэтических стволовых клеток для трансплантации. Данный подход к преодолению

гемоглобинопатии, несомненно, сопряжен не только с медицинскими, но и с этическими проблемами [129].

Нарушение синтеза гемоглобина в подавляющем большинстве случаев наследуются по аутосомно-рецессивному типу и представлено мутациями гена HBB или гена HBA. При наличии в паре мутации партнерам рекомендовано квалифицированное медико-генетическое консультирование специалистов со знаниями в области как молекулярной генетики, так и клинических проявлений гемоглобинопатий [130].

Впервые ПГТ-М на бета-талассемию было осуществлено в 1998 г. Успешное типирование эмбриона по HLA было произведено той же группой исследователей в 2001 г. [131]. К настоящему времени накоплен достаточно большой опыт применения HLA-типирования при ПГТ [132]. С технической стороны анализ HLA в отдельных клетках эмбриона должен обеспечить тестирование крупной области HLA (>3,6 Mb на хромосоме 6p21), присущий HLA полиморфный характер и высокую частоту рекомбинаций в локусе HLA.

Этические проблемы включают мотивацию родителей в отношении рождения нового ребенка для излечения больного ребенка, риски со стороны матери – пациентки программ ВРТ и психологические трудности у членов семьи. С учетом этого применение ПГТ-М должно рассматриваться в первую очередь в семьях при отсутствии донора и возможности выждать по меньшей мере 9–12 мес до процедуры трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Хотя авторы указывают на целесообразность прекращения этических дебатов в данной ситуации, вышеперечисленные аспекты требуют обеспечения грамотной психологической поддержки столкнувшейся с ней пары [133].

- *Лизосомные болезни накопления*

Лизосомные болезни накопления представляют собой группу из более 50 наследственных нарушений метаболизма, развивающихся вследствие дефицита ферментов лизосом, что приводит к накоплению эндогенных

макромолекул в различных органах и тканях. Все они являются моногенными заболеваниями, и большинство из них наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Предполагается, что для каждого отдельного заболевания данной группы частота в популяции составляет менее 1:100 000, тогда как в целом она может составлять около 1:7 700, но в отсутствие программ скрининга новорожденных их истинная частота в популяции неизвестна.

ПГТ-М с анализом полярных телец или бластомеров применяется у пар с риском развития ряда лизосомных болезней накопления, включая мукополисахаридозы, болезнь Краббе, GM2-ганглиозидозы, болезнь Гоше, болезнь Ниманна—Пика и др. [134,135]. С целью минимизировать значение выпадения аллелей проводится семейное гаплотипирование с использованием информативных маркеров, располагающихся по обе стороны от ответственного за заболевание гена. Ниже рассмотрены современные подходы к ПГТ-М на некоторые лизосомные болезни накопления.

Мукополисахаридоз I типа является аутосомно-рецессивной лизосомной болезнью накопления, развивающейся вследствие мутации гена альфа-L-идуронидазы, дефицит активности которой ведет к накоплению в тканях организма дерматан- и гепарансульфатов. Его проявлениями являются грубые черты лица (гаргоилизм), гепатоспленомегалия, дисплазия костей, помутнение роговицы, потеря слуха и умственная отсталость. При тяжелом течении заболевания (синдром Гурлер) больные обычно погибают в первом десятилетии жизни [136]. Ассоциированная с развитием синдрома Гурлер мутация Q70X стала поводом для проведения ПГТ-М полярных телец ооцитов у пары с обоюдным носительством мутации. Использование данного метода впервые успешно завершилось беременностью гетерозиготным по данной мутации плодом [137].

Мукополисахаридоз II типа (синдром Хантера) является (в отличие от большинства лизосомных болезней накопления) X-сцепленным рецессивным заболеванием, обусловленным мутациями гена идуронат-2-сульфатазы,

ведущими к падению активности данного лизосомного фермента. Клинические проявления заболевания характеризуются выраженной вариабельностью от пациента к пациенту, но около двух третей последних страдают тяжелой формой заболевания с вовлечением центральной нервной системы и прогрессирующими нарушениями когнитивной функции и функции дыхания, чаще всего приводящими к смерти в течение первых двух десятилетий жизни. При ПГТ полярных телец и эмбрионов трех пар, в которых пациентки являлись носителями мутаций гена идуронат-2-сульфатазы, специалистам удалось добиться рождения здоровой девочки, здоровых близнецов и здоровых близнецов с параллельным исключением альбинизма после четырех, одного и семи циклов ПГТ соответственно. При этом в последнем случае была также получена клеточная линия эмбриональных стволовых клеток [138].

Мукополисахаридоз III типа (синдром Санфилиппо) является наиболее часто встречающимся мукополисахаридозом, обусловленным дефицитом одного из ферментов, участвующих в последовательном расщеплении гепарансульфата, и включает 4 подтипа [139]. Данное заболевание характеризуется ранней задержкой развития ребенка с последующими когнитивными нарушениями и аномалиями поведения, при этом соматические проявления выражены слабо, что часто приводит к диагностическим ошибкам. Тем не менее, в отличие от ряда прочих мукополисахаридозов, успешное применение ПГТ-М на ответственные за развитие синдрома Санфилиппо гены к настоящему времени в научной литературе не описаны. Внедрение в практику ПГТ-М с использованием метода NGS может обеспечить выявление данных генов.

Мукополисахаридоз IV типа (синдром Моркио) характеризуется наличием наследуемых по аутосомно-рецессивному типу мутаций генов N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы (Моркио А) или β -галактозидазы (Моркио В). Его проявлениями являются карликовость, непропорциональное телосложение, грубоватые черты лица и в особенности выраженные

деформации костей. Первый случай успешного применения ПГТ-М при данном заболевании завершился рождением здорового ребенка–носителя гетерозиготной мутации, при этом эмбрион был первоначально диагностирован как несущий два нормальных аллеля, что подчеркивает необходимость совершенствования ПГТ-М лизосомных болезней накопления.

Важной задачей является разработка ПГТ-М болезни Краббе, обусловленной дефектом гена лизосомной галактоцереброзидазы лейкодистрофии, которая при тяжелом течении может привести к гибели ребенка в возрасте до двух лет. Если в большинстве случаев данное заболевание выявляется в первые 3–6 мес. жизни, то формы с поздним началом заболевания (до возраста 40–50 лет) иногда диагностируются как патология белого вещества при магнитно-резонансном исследовании. Важным фактором такого клинического разнообразия является многочисленность ответственных за развитие болезни Краббе мутаций [140].

1.5. Клинические и этические аспекты переноса мозаичных эмбрионов в программах ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием

У эмбрионов человека хромосомный мозаицизм определяется как две или более отдельные клеточные линии внутри одного эмбриона и является достаточно частым явлением, которое широко обсуждается специалистами в области вспомогательных репродуктивных технологий [40]. Мозаицизм может возникать в результате митотического кроссинговера, соматических мутаций в зиготе или на ранних стадиях дробления, сегрегации хромосом при делении клеточного ядра и генотерапии [41]. Традиционно считалось, что только генетические проблемы в ооците или сперме ответственны за мозаицизм в эмбрионах. Однако в настоящее время доказано, что мозаицизм также может возникать во время первых митотических делений, когда транскрипты матери контролируют клеточный цикл раннего эмбриона [42]. Во время преимплантационного периода мозаицизм встречается относительно часто, тем не менее на различных стадиях развития эмбриона

степень мозаицизма колеблется. Считается, что степень мозаицизма максимальна на 2–3-и сутки развития и уменьшается к 5–6-му дню после оплодотворения. Способность эмбрионов самостоятельно компенсировать мозаицизм по мере своего развития отражает возможный физиологический характер явления и свидетельствует о необходимости более тщательной интерпретации результатов преимплантационного генетического тестирования [43].

В литературе описано несколько моделей, объясняющих, почему происходит уменьшение частоты мозаицизма эмбриона на стадии бластоцисты. Естественный отбор чаще работает против проявления мозаицизма, и *in vivo* может происходить элиминация эмбриона на основании доли анеуплоидных клеток в нем на разных этапах развития. Другая модель — модель «клонального истощения», которая описывает апоптотические изменения клеток эмбриона и элиминацию анеуплоидных клеток у эмбрионов с мозаицизмом. Третья модель описывает механизмы, позволяющие клеткам с моносомией или трисомией разделяться на клетки с эуплоидным количеством хромосом [44].

При биопсии трофэктодермы частота мозаицизма по разным данным составляет от 4 до 32%. С введением высокопроизводительного секвенирования следующего поколения стало возможным диагностировать хромосомный мозаицизм на уровне от 20 до 80% [45]. Тем не менее в зависимости от степени выраженности мозаицизма и его локализации результат биопсии трофэктодермы эмбриона и последующая интерпретация данных ПГТ-А не всегда соответствуют истинным показателям. Мозаицизм может затрагивать как весь эмбрион, так и отдельные его части: трофэктодерму, из которой образуется плацента или внутриклеточную массу (ВКМ), которая дает начало эмбриону. Если мозаицизм затрагивает только ВКМ, то результат биопсии трофэктодермы у такого эмбриона будет соответствовать эуплоидному эмбриону. Если биопсия клеток трофэктодермы была проведена у эмбриона с мозаицизмом по клеткам





трофэктодермы, но в исследуемый образец попали эуплоидные клетки, результат ПГТ-А будет интерпретирован в пользу эуплоидного эмбриона. В таблице 1 представлена точность диагностики мозаицизма различной степени и локализации у анализируемого эмбриона и возможные варианты диагностических ошибок. Данные подтверждают, что процент мозаицизма в образце биопсии не всегда может быть прямым показателем процента мозаицизма во всем эмбрионе [46].


Несмотря на отсутствие критерия для определения мозаицизма, Международное общество преимплантационной генетической диагностики (PGDIS, 2019 г.) предлагает эмбрион с более чем 20% анеуплоидных клеток, считать мозаичным. Это означает, что эмбрионы с низкой степенью мозаицизма следует рассматривать как нормальные (эуплоидные) [47].

Эмбрионы с мозаицизмом отличаются по степени (низкая, средняя или высокая) и типу мозаицизма (сегментарный, одна хромосома, две хромосомы или сложный) [48]. Результаты нескольких крупных исследований показали, что мозаичные эмбрионы могут имплантироваться и приводить к рождению здоровых детей в программах ВРТ [49]. В исследовании Spinella F et al., опубликованном в 2017 г., было показано, что исход беременности при переносе эмбриона с мозаицизмом зависит от степени мозаицизма и типа анеуплоидии. При наличии менее 50% анеуплоидных клеток по данным ПГТ-А у эмбриона с мозаицизмом исходы программы ВРТ сопоставимы с аналогичными результатами при переносе эуплоидного эмбриона [50].

Существуют предположения, что в случае соматических клеток мозаицизм обладает благотворным влиянием на организм. Например, в нейронах мозаицизм встречается очень часто, что позволяет разнообразить их функциональный статус [51]. Однако чаще всего мозаицизм связывают с очевидно отрицательными последствиями, например с повышенной частотой прерывания беременности, появлением врожденных дефектов, задержками и расстройствами развития. Чем выше уровень мозаицизма эмбриона, тем ниже вероятность имплантации и выше риск выкидыша.

Таблица 1. Влияние степени и локализации мозаицизма на интерпретацию результатов ПГТ-А [45]

Степень и локализация мозаицизма	Результат биопсии трофэктодермы	Точность диагностики
 <p>Полностью мозаичный эмбрион</p>	Эуплоидный эмбрион	Неправильная интерпретация данных
	Мозаичный эмбрион	Правильная интерпретация данных
	Анеуплоидный эмбрион	Неправильная интерпретация данных
 <p>Мозаичный эмбрион по ВКМ</p>	Эуплоидный эмбрион	Неправильная интерпретация данных
 <p>Мозаичный эмбрион по ТЭ</p>	Эуплоидный эмбрион	Неправильная интерпретация данных
	Мозаичный эмбрион	Правильная интерпретация данных
	Анеуплоидный эмбрион	Неправильная интерпретация данных
 <p>Анеуплоидный эмбрион по ВКМ (Тип 1)</p>	Эуплоидный эмбрион	Неправильная интерпретация данных

Степень мозаицизма	Результат биопсии трофэктодермы	Точность диагностики
 <p data-bbox="225 501 668 577">Анеуплоидный эмбрион по ТЭ (Тип 2)</p>	Анеуплоидный эмбрион	Правильная интерпретация данных

Условные обозначения:  – анеуплоидные клетки  – эуплоидные клетки в эмбрионе

В научной литературе сообщается о статистически значимом снижении частоты наступления клинической беременности, имплантации и живорождения при переносе эмбрионов с высокой степенью мозаицизма по сравнению с мозаичными эмбрионами, имеющими более низкий процент анеуплоидии [52]. Примечательно, что распространенность мозаицизма эмбрионов, по-видимому, не определяется теми же факторами, которые регулируют анеуплоидию эмбриона, поскольку она не связана с женским мейозом и возрастом матери [53].

Известно, что генетические аномалии являются основной причиной остановки эмбрионов в развитии [54]. Тем не менее при выборе момента биопсии эмбриона для ПГТ следует иметь в виду возможность «аутокоррекции» хромосомного набора эмбриона, т.е. ситуации, при которой хромосомный набор в процессе эмбрионального развития становится диплоидным. Предположение о существовании данного феномена было сделано на основании данных ПГТ, согласно которым некоторые эмбрионы, диагностированные как анеуплоидные на стадии дробления при биопсии бластомеров, развивались до стадии бластоцисты с эуплоидным хромосомным набором [55,56].

Вышеперечисленные наблюдения могли быть следствием как диагностических ошибок при проведении ПГТ, так и мозаицизма. Описаны

случаи эмбрионов с мозаичной трисомией, когда вследствие ранней постзиготической митотической утраты лишней хромосомы развиваются эмбрионы с диплоидным хромосомным набором, потенциально обеспечивая рождение здоровых детей [57]. Тем не менее необходимо понимать, что в описанной ситуации обе сохраненные хромосомы могут принадлежать одному из родителей. Однородительская дисомия вызывает ошибки импринтинга или гомозиготность по неблагоприятному рецессивному аллелю. При этом наблюдается мозаицизм клеток плаценты, что может привести к нарушению ее функции, а также к недостоверным результатам при биопсии ворсин хориона или тестировании внеклеточной ДНК плода в крови матери [57]. На основании оценок частоты однородительской дисомии рядом исследователей предполагается, что аутокоррекция эмбриона происходит достаточно редко, частота ее составляет менее 1% [58].

Несмотря на вышеизложенное, возможность самокоррекции эмбрионов при анеуплоидиях и мозаицизме принимается во внимание множеством специалистов [59,60]. Клиническое значение данного явления было подтверждено в сообщении о рождении здоровых детей после переноса бластоцист, классифицированных как анеуплоидные при применении ПГТ-А. Аналогичные результаты были получены еще одной исследовательской группой [61], ставящей под сомнение клиническую концепцию применения ПГТ в целях скрининга как таковую.

Перспективы ПГТ, и в особенности его скринингового применения, в будущем зависят от выработки научно обоснованных подходов к ряду клинико-диагностических проблем. Если ПГТ-А может выявить анеуплоидии у более 75% тестируемых эмбрионов, то недавние исследования показали, что некоторые эмбрионы с хромосомными нарушениями обладают определенным потенциалом к обеспечению нормальной беременности и живорождения [39], что обусловлено в первую очередь мозаицизмом эмбрионов и некорректным выполнением процедуры биопсии трофэктодермы.

При повторном анализе образцов трофэктодермы с использованием сравнительной геномной гибридизации группой исследователей было установлено, что 13,4% от числа ранее диагностированных как эуплоидные эмбрионов являлись мозаичными [18]. Частота наступления клинической беременности для эуплоидных и мозаичных эмбрионов оказалась сопоставимой, хотя среди последних наблюдалась тенденция к повышению частоты репродуктивных потерь. В исследовании с использованием при ПГТ метода NGS частота наступления беременности после переноса мозаичных эмбрионов была ниже таковой по сравнению с эуплоидными эмбрионами [62].

На основании ретроспективного анализа вероятности обусловленных мозаицизмом выкидыша, конкордантности плода и ворсин хориона группа исследователей разработала систему выбора мозаичных эмбрионов для переноса в полость матки с оценкой каждой из мозаичных анеуплоидий [63]. Авторы считают, что в условиях недостатка проспективных исследований их шкала может оказаться полезным инструментом в клинической практике.

ГЛАВА 2. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ В ПРОГРАММАХ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ

2.1. Технологии получения генетического материала

Проведение ПГТ сопряжено со следующими этапами: принятие парой решения о применении ВРТ после консультации специалистов в области репродуктивной медицины и генетики; проведение цикла ЭКО, завершающегося получением ооцитов и оплодотворением; получение генетического материала для анализа при биопсии; генетическое тестирование; перенос в полость матки здоровых эмбрионов или криоконсервация последних.

ПГТ на практике осуществляется с использованием для генетического анализа полярных телец ооцитов, бластомеров эмбриона на стадии

дробления (3-и сутки развития, стадия 6–8 клеток) и клеток трофэктодермы на стадии бластоцисты (5–6-е сутки развития, около 120 клеток). Анализ клеточных фрагментов субзонального пространства в клинических целях необязателен. В настоящее время проводятся исследования внеклеточной ДНК, содержащейся в полости бластоцисты и получаемой с помощью метода бластоцентаза [156, 157]. Возможность применения данного подхода в циклах ПГТ должна быть подтверждена в будущих проспективных исследованиях.

Биопсия полярных телец ооцита и зиготы

Генотип ооцита может быть установлен на основании анализа первого и второго полярных телец [158]. Принцип диагностики моногенных патологий при использовании данного подхода заключается в том, что первое полярное тельце ооцита гетерозиготной матери (носителя патологического аллеля) с наличием мутантного аллеля соответствует наличию нормального аллеля в ооците; такие ооциты могут быть оплодотворены в рамках программы ЭКО. Напротив, генетически нормальное полярное тельце указывает на наличие в ооците аномального аллеля. При диагностике анеуплоидий первое или второе полярное тельце с количеством хромосом, отличным от 23, указывает на невозможность использования ооцита для оплодотворения.

Очевидным преимуществом метода биопсии первого полярного тельца является биопсия до оплодотворения, т.е. тестирование предшествует не только имплантации, но и зачатию. Второе полярное тельце выделяется уже после оплодотворения ооцита сперматозоидом. Тем не менее, учитывая отсутствие влияния полярных телец в дальнейшее развитие эмбриона, данный метод получения клеточного материала представляется наименее инвазивным из имеющихся.

При диагностике моногенных заболеваний следует принимать во внимание особенности процесса рекомбинации хромосом. Кроссинговер гомологичных хромосом является практически обязательным для

обеспечения нормального расхождения гомологичных хромосом при мейозе I. Две хроматиды одной хромосомы первого полярного тельца будут идентичны по генотипу и полностью комплементарны содержащему гомологичную хромосому ооциту. Второе полярное тельце будет идентично ооциту. Однако если в кроссинговер будет вовлечена область хромосомы, содержащая исследуемый ген, то единственная хромосома в первом полярном тельце будет иметь различные аллели на каждой из двух хроматид, что не позволит определить генотип ооцита и потребует биопсии второго полярного тельца. На практике почти во всех использующих данный подход клиниках производится биопсия обоих полярных телец [159].

Очевидным недостатком метода биопсии полярных телец является невозможность оценки отцовского генетического материала, что исключает применение метода при поиске отцовской мутации у эмбриона. Диагностика анеуплоидий с использованием данного метода подразумевает, что источником таковых является нерасхождение хромосом при мейозе ооцитов [160]. Однако данный механизм ответственен лишь за 66% анеуплоидий [161]. Таким образом, при использовании исключительно данного подхода около трети анеуплоидий останутся недиагностированными, что, конечно, не исключает важности дальнейшего изучения процессов мейоза ооцитов.

Биопсия бластомеров преимплантационного эмбриона на стадии дробления

До недавнего времени в большинстве циклов ПГТ использовалась биопсия бластомеров на стадии дробления, которая, в отличие от биопсии полярных телец, позволяет оценить отцовский генетический вклад в конкретный эмбрион [162]. При применении указанного подхода на 3-и сутки дробления эмбриона после прохождения окружающей эмбрион гликопротеиновой оболочки (*zona pellucida*) извлекается один из бластомеров (их число обычно равно 6 или 8, реже 10), ДНК которого впоследствии используется для анализа. Для облегчения аспирации бластомера применяется свободная от ионов кальция и магния среда.

Обычно для анализа используется всего один бластомер, поскольку даже такое минимальное вмешательство в эмбриональное развитие снижает вероятность выживания эмбриона на 10%. Установлено, что извлечение двух бластомеров приводит к дальнейшему значительному ухудшению выживаемости эмбрионов [163]. В исследовании на базе клиники Брюссельского свободного университета (Бельгия) частота рождения живых детей после ПГТ с использованием одного и двух бластомеров составила 37,4% и 22,4% соответственно [164], что доказывает отрицательное влияние биопсии бластомеров на частоту имплантации.

Как при биопсии полярных телец, так и при биопсии бластомера количество генетического материала для исследования является весьма незначительным, и новые технологические подходы к генетическому тестированию требуют применения полногеномной амплификации.

Еще одним явным недостатком биопсии бластомеров на стадии дробления является возможная нерепрезентативность используемого для анализа бластомера в отношении хромосомного набора эмбриона, поскольку на данной стадии развития до 29% эмбрионов являются мозаичными. Данное обстоятельство заставило исследователей сконцентрировать внимание на биопсии эмбрионов на стадии бластоцисты.

Биопсия клеток трофэктодермы бластоцист

На 5–6-е сутки эмбрионального развития дробящийся эмбрион достигает стадии бластоцисты. На данном этапе около 120 клеток эмбриона четко подразделяются на внутреннюю клеточную массу, из которой разовьется эмбрион после имплантации, и трофэктодерму, из которой сформируется плацента. Биопсия трофэктодермы, позволившая на новом технологическом уровне вернуться к истокам ПГТ и впервые внедренная в медицинскую практику группой McArthur [165], позволяет получить большее количество клеток для исследования и при этом избежать удаления клеток собственно эмбриона. Рандомизированные контролируемые исследования не

выявили отрицательного влияния процедуры биопсии трофэктодермы на частоту имплантации эмбрионов [160].

После раскрытия участка блестящей оболочки с помощью лазера на 3- и или 4-е сутки после оплодотворения внешний слой трофэктодермы выпячивается и становится доступным для биопсии. Биопсия на стадии бластоцисты считается менее сложной технической процедурой по сравнению с извлечением бластомера на стадии дробления или выделением полярных телец, при этом обеспечивая получение большего количества доступной для исследования ДНК.

В настоящее время биопсия бластоцисты является предпочтительным подходом к проведению ПГТ. Сами по себе 2–3 суток дополнительного культивирования позволяют провести селекцию эмбрионов, поскольку известно, что около трети эмбрионов с хромосомными аномалиями на стадии дробления не достигают стадии бластоцисты.

Обратной стороной увеличения периода культивирования эмбрионов является заметное сокращение времени на проведение генетического исследования полученного материала, что зачастую ведет к принятию схемы перехода лабораторий к криоконсервации всех биопсированных эмбрионов (так называемый подход «*freeze all*»). Следует отметить, что стратегия витрификации способна даже повысить частоту прогрессирующей беременности при переносе бластоцист. Данный подход позволяет исключить спешку при анализе генетического материала в реальном времени и осуществить перенос эмбрионов в естественном цикле, когда рецептивность эндометрия не страдает от гормональных всплесков, имеющих место при стимуляции овуляции.

При проведении биопсии трофэктодермы необходимо помнить про мозаицизм, приблизительно в 4–5% случаев хромосомный компонент клеток трофэктодермы не соответствует таковому внутренней клеточной массы, что сопряжено с риском диагностической ошибки.

2.2. Методы генетического тестирования полученных клеток эмбриона доимплантационных стадий развития

Флюоресцентная гибридизация in situ

Диагностика хромосомных аномалий эмбрионов впервые стала возможной с разработкой и внедрением в клиническую практику метода флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), использующего специфичные в отношении конкретных хромосом зонды [166]. Первый случай беременности после биопсии эмбриона и определения пола методом FISH с использованием зондов на хромосомы X и Y был описан в 1992 г. [167].

Изначально основной сферой применения FISH стала селекция пола эмбрионов с целью исключить наследования X-сцепленных рецессивных генетических патологий. Но уже первое крупное исследование 30 эмбрионов методом FISH с использованием зондов на пять хромосом (X, Y, 18, 13 и 21) обеспечило успешную диагностику для 93% бластомеров [168]. Хромосомные нарушения были выявлены в 70% аномально развивающихся бластомеров. Также было отмечено, что даже нормально развивающиеся эмбрионы пациенток позднего репродуктивного возраста в большинстве случаев содержали хромосомные аномалии. Технология FISH стала применяться во всем мире для определения количества хромосом и выявления некоторых структурных хромосомных аномалий.

Тем не менее многочисленные рандомизированные исследования скринингового применения FISH для ПГТ не позволили сделать вывод о повышении частоты живорождения при его использовании [169, 170]. Исследователи объясняли отсутствие ожидаемых преимуществ от применения FISH ограниченным количеством исследуемых хромосом, осуществлением биопсий на ранних стадиях развития эмбрионов и мозаицизмом последних.

Исследование Mastenbroek et al. (2007 г.), скрининговое применение FISH не только не обеспечивало репродуктивный успех, но и приводило к снижению частоты живорождения у женщин старшего репродуктивного

возраста, вызвало особенно жаркие дебаты среди специалистов в сфере ПГТ. Сторонники скринингового подхода указывали на такие недостатки исследования, как игнорирование опыта конкретной лаборатории по применению FISH и методов биопсии эмбриона [171]. В тоже время критики скрининга подчеркивали наличие присущих методу технических сложностей, которые наряду с хромосомным мозаицизмом и ограниченным количеством исследуемых хромосом могли приводить к отсутствию благоприятного эффекта от применения FISH [172].

В настоящее время на смену FISH пришел ряд новых молекулярных методов, способных с высокой точностью обеспечить анализ всех 24 хромосом человека [173]. Хотя в настоящее время разработан подход с использованием метода FISH для выявления всех хромосом человека, включающий 4 последовательных уровня гибридизации с 6 различными флюорохромами каждый, его создатели признают, что основное направление будущего применения данной технологии находится в области фундаментальных биологических исследований и что клиническая реализация ПГТ будет производиться с использованием иных методов [174].

Сравнительная геномная гибридизация на микрочипах

Сравнительная геномная гибридизация (СГГ) на микрочипах стала одним из первых методов, позволяющих обеспечить проведение ПГТ на все 24 хромосомы человека [175] и продолжает использоваться в клинической практике. Для осуществления СГГ на микрочипах требуется полногеномная амплификация ДНК биопсированных клеток с целью получить достаточное для анализа количество материала, после чего ДНК маркируется флюоресцентными метками, денатурируется и гибридизируется на платформе микрочипов с 1000 ДНК-зондов ко всем хромосомам. После отмывки от несвязанной или неспецифически связанной ДНК определяется интенсивность флюоресцентности по всем зондам, и при сравнении этого показателя в образце эмбриона с контрольными образцами обоих полов определяется хромосомный состав исследуемого образца [176].

Для СГГ практически одновременно была продемонстрирована возможность успешного применения при биопсии полярных телец, бластомеров и трофэктодермы [177], при этом точность анализа составила 98% при биопсии бластомеров и 95% при биопсии трофэктодермы.

Если изначально СГГ на микрочипах применялась в основном для оценки эмбрионов от пар группы риска, в первую очередь при наличии хромосомных транслокаций, то впоследствии данный метод нашел широкое применение в целях скрининга на анеуплоидии. Пилотное проспективное рандомизированное исследование пациенток программ ВРТ с хорошим прогнозом (возраст моложе 35 лет, отсутствие потерь беременности в анамнезе и нормальный кариотип) показало, что в группе с применением СГГ по сравнению с группой без ПГТ частота наступления клинической беременности была значимо выше [178].

На основании вышеизложенного можно заключить, что применение СГГ позволило повысить частоту наступления клинической беременности и снизить частоту потерь беременности среди пациенток программ ЭКО с хорошим прогнозом, что стало важным шагом в реабилитации скринингового подхода в рамках ПГТ после описанной выше критики концепции скрининга с использованием метода FISH. Тем не менее наряду с отсутствием крупных исследований по результатам применения СГГ у пациенток с худшим прогнозом следует отметить такой недостаток данного метода, как невозможность выявления однородительской дисомии, сбалансированных хромосомных перестроек, гаплоидного и полиплоидного хромосомного набора эмбриона [179]. Хотя СГГ на микрочипах является высокочувствительным методом оценки состояния всех хромосом человека, отмечается ряд технических ошибок при применении данного метода [180].

Исследование однонуклеотидных полиморфизмов и кариомэппинг

Исследование однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) на микрочипах, равно как и СГГ, требует полногеномной амплификации ДНК

биопсированных клеток с целью получить достаточное для анализа количество материала. После этого ДНК эмбриона фрагментируется и гибридизируется на платформе микрочипов с более чем 300 тыс. зондов к участкам ОНП по всему геному. Впоследствии пары нуклеотидов А-Т маркируются красным, а Г-Ц – зеленым флюорохромом. С помощью оценки интенсивности красного и зеленого свечений для каждого из участков ОНП можно одновременно генотипировать свыше 300 тыс. ОНП. В ряде случаев также производится оценка образцов ДНК родителей, что позволяет отслеживать передачу наследственной информации и устранить такие возможные ошибки полногеномной амплификации, как выпадение аллеля, предпочтительная амплификация или отсутствие амплификации [181].

Крупное пилотное проспективное рандомизированное исследование сравнительной эффективности методов ОНП и FISH позволило получить доступные для интерпретации результаты в 96% случаев при применении ОНП и в 83% — при FISH ($p < 0,004$). При исследовании ОНП мозаицизм наблюдался гораздо реже (31%) по сравнению с FISH (100%) ($p < 0,0005$) [182]. Еще одно проспективное рандомизированное исследование тех же авторов было посвящено оценке точности метода ОНП [183]. При анализе эуплоидных и анеуплоидных клеточных линий наряду с бластомерами эмбрионов от пациенток программ ЭКО точность определения отдельных ОНП в клеточных линиях с известным кариотипом составила 99,2%, определения количества хромосом — 99,8%. В целом точность определения анеуплоидий составила 98,6%, а конкордантность для более чем 80 млн отдельных ОНП в 335 бластомерах — 96,5%.

В другой работе было проведено сравнение конкордантности результатов исследования ОНП, произведенного уже после переноса эмбрионов, с результатами анализов внеклеточной ДНК плода в материнской крови или послеродового определения кариотипа новорожденного. При общей частоте имплантации 28,2% она составила 41% для эмбрионов,

впоследствии диагностированных как эуплоидные, и всего 4% — для диагностированных как анеуплоидные.

Хотя исследование ОНП позволяет выявить большой спектр генетических нарушений, высокая стоимость проведения данного анализа будет являться важным ограничением для его широкого применения. Тем не менее оно стало базой для разработки нового подхода к анализу генотипов пробанда, родителей или иных членов семьи, впервые описанного А.Н. Handyside et al. (2010 г.), при котором менделевский анализ полученных генетических данных определяет локусы для четырех родительских гаплотипов и картирует наследование данных гаплотипов и кроссинговер у пробанда. Полученная в итоге «карта» позволяет идентифицировать наследование каждой хромосомы и ее сегментов, обеспечивая полногеномный анализ наследственности и выявление хромосомных aberrаций при наличии двух гаплотипов от одного родителя (трисомия) или их отсутствия (моносомия). Тем не менее затруднения в отношении диагностики постзиготической трисомии и проблема мозаицизма эмбрионов в настоящее время ограничивают возможность клинического применения кариомэппинга в диагностике хромосомных аномалий [184].

Полногеномный кариомэппинг также является высокоточным методом диагностики моногенных заболеваний и комбинаций локусов, позволяющим расширить диапазон подлежащих диагностике моногенных патологий и не требующим разработки специальных тестов на наличие патологических аллелей [185].

В 2014 г. описан первый случай рождения здорового ребенка после ПГТ с использованием кариомэппинга, позволившего одновременно исключить наличие анеуплоидий и моногенной патологии (синдром Смита-Лемли-Опица) [186]. Кариомэппинг может рассматриваться как высокоэффективный и точный метод диагностики моногенных заболеваний при ПГТ-М. Однако анализ областей хромосом со сниженным покрытием ОНП и ПГТ у близких родственников в случае отсутствия генетической

информации могут привести к необходимости проведения анализа методом ПЦР [187].

Кариомэппинг, являясь методом полногеномной диагностики, требует разработки клинических и этических рекомендаций, обеспечивающих его применение клиниками, а также консультирование желающих прибегнуть к нему пациентов до и после проведения ПГТ [188].

Количественная полимеразная цепная реакция

Метод кПЦР подразумевает преамплификацию эмбриональной ДНК с последующей мультиплексной ПЦР, обеспечивающей амплификацию нескольких локусов каждой из хромосом. При кПЦР в режиме реального времени осуществляется количественная оценка продуктов реакции, что позволяет произвести сравнение информации по всему геному, не требующее полногеномной амплификации. Если традиционной сферой применения данного метода являлось выявление известных моногенных генетических патологий [189], то в последние годы возник определенный интерес к использованию кПЦР для скрининга в рамках ПГТ.

В проспективном рандомизированном исследовании применения кПЦР для скрининга в рамках ПГТ рассматривается возможность точной оценки количества хромосом в ряде клеточных линий с известным кариотипом и бластоцист после программ ВРТ, для которых уже был произведен скрининг с использованием в качестве метода ПГТ исследования ОНП [190]. Образцы 9 клеточных линий были диагностированы с точностью 97,6% (41 из 42 случаев), а при использовании минимального порога согласованности — в 100%. На основании исследования материала биопсии бластоцист кПЦР позволила подтвердить результаты исследования ОНП в 70 из 71 случая (98,6%). Конкордантность диагнозов эуплоидий (37 случаев) и анеуплоидий (34 случая) составила 100%.

В рандомизированном контролируемом исследовании оценки применения кПЦР для ПГТ у пациенток старшего репродуктивного возраста (42 года и старше) было произведено сравнение результатов переноса одного

эуплоидного эмбриона на стадии бластоцисты после ПГТ (89 переносов эмбрионов) и двух бластоцист без ПГТ (86 переносов эмбрионов) [191]. Если частота живорождения после переносов эмбрионов в «нативном» цикле, а также с учетом последующего переноса криоконсервированных эмбрионов была сопоставима в обеих группах, то группа переноса двух эмбрионов без ПГТ характеризовалась значительно более высокой частотой многоплодных родов (47% по сравнению с 1,6%; $p < 0,0001$), значимым повышением рисков преждевременных родов ($p = 0,03$), низкой массой тела при рождении ($p = 0,002$) и увеличением госпитализаций новорожденных в отделение детской реанимации ($p = 0,04$). Таким образом, использование кПЦР при ПГТ позволило проводить селективные переносы одного эмбриона без отрицательного влияния на частоту живорождения.

Оценка частота имплантации и живорождения после биопсии бластоцист с последующим ПГТ с использованием кПЦР была произведена в рамках еще одного рандомизированного контролируемого исследования бесплодных пар с возрастом пациентки (или донора ооцитов) 21–42 года и наличием в анамнезе не более одной неудачной попытки ЭКО [192]. Пациентки были подразделены на две группы: с ПГТ на стадии бластоцисты ($n = 72$) и с переносом эмбриона на стадии бластоцисты без ПГТ ($n = 83$). В группе с ПГТ по сравнению с контрольной группой наблюдали статистически значимую более высокую частоту успешной имплантации (66,4% по сравнению с 47,9%; $p < 0,001$) и частоту родов (84,7% по сравнению с 67,5%; $p = 0,01$).

Можно заключить, что в целом применение кПЦР для ПГТ обеспечивает получение достоверных результатов, позволяет одновременно проводить выявление моногенных патологий и хромосомных нарушений, не требуя полногеномной амплификации.

Высокопроизводительное секвенирование следующего поколения

Высокопроизводительное секвенирование (Next-Generation Sequencing, NGS) является наиболее современным подходом к осуществлению ПГТ и

уже получило признание в сфере пренатального тестирования. NGS более четко указывает на наличие мозаицизма у преимплантационных эмбрионов, что позволяет выбрать генетически здоровые эмбрионы для переноса. Принцип метода NGS радикально отличается от других методов ПГТ и основан на определении последовательности ДНК. Данная технология в последнее время все больше вытесняет метод CGH и находит более широкое применение в клиниках ВРТ за рубежом. Точность метода NGS позволяет использовать его и для тестирования на анеуплоидии при анализе внеклеточной ДНК в крови беременных женщин [193].

Как и при СГГ и исследовании ОНП, для NGS необходима полногеномная амплификация ДНК биопсированных клеток с целью получить достаточный для анализа объем генетического материала. После амплификации ДНК фрагментируется и маркируется, и маркированные фрагменты ДНК смешиваются для параллельного секвенирования. Затем с помощью специальных компьютерных программ производится биоинформатический анализ результатов секвенирования для распределения результатов по образцам биопсированных эмбрионов, после чего секвенированные фрагменты каждого образца сравниваются с референсными результатами генома и сопоставляются с соответствующими областями хромосом. За этим следует подсчет последовательностей на протяжении каждой из хромосом.

Впервые потенциал применения NGS для ПГТ стал предметом оценки при сравнении образцов биопсии 38 бластоцист с использованием исследования ОНП и NGS [194]. Все 26 эуплоидных эмбрионов и 6 полностью анеуплоидных эмбрионов были верно диагностированы как при исследовании ОНП, так и с помощью NGS. Секвенирование также позволило успешно идентифицировать 6 эмбрионов с несбалансированными хромосомными транслокациями, 1 из которых не был диагностирован при исследовании ОНП.

Ретроспективная валидация применения NGS для ПГТ единичных бластомеров [195] показала, что при анализе 18 бластомеров с известным аномальным кариотипом и 190 продуктов полногеномной амплификации ДНК от единичных бластомеров, ранее изученных методом СГГ на микрочипах, наблюдалась высокая конкордантность NGS и СГГ. Результаты совпали для 207 из 208 образцов (99,5%). В единственном случае расхождения результатов NGS дало ложноположительный диагноз трисомии 18, не выявленный при СГГ на микрочипах и не подтвержденный при повторном анализе с помощью кПЦР. Тем не менее ложноположительный диагноз был поставлен для эмбриона с множественными анеуплоидиями. Таким образом, конкордантность выявления анеуплоидных эмбрионов для исследуемых технологий составила 100%.

В другой работе той же группы исследователей оценивалась эффективность потенциального применения NGS в клинической практике в сравнении с СГГ на микрочипах [196]. Всего с использованием двух вышеуказанных методов было проанализировано 192 бластоцисты от 55 циклов ПГТ. Конкордантные результаты были получены для 191 из 192 бластоцист (99,5%). Как и в предшествующей работе, единственный дискордантный эмбрион содержал несколько анеуплоидий. Частота имплантации составила 62%. Авторы оценили метод NGS как пригодный для клинического применения, характеризующийся высоким разрешением и позволяющий улучшить выявление мозаицизма эмбрионов, и отметили потенциальную возможность автоматизации подготовки «библиотеки» для секвенирования. В качестве недостатка метода была отмечена высокая стоимость необходимого для NGS оборудования. Конкордантность результатов применения СГГ на микрочипах и NGS также была подтверждена в отечественном исследовании [197].

Еще одно рандомизированное клиническое исследование [198] также было посвящено сравнению эффективности применения NGS и СГГ на микрочипах для ПГТ. В этой работе 172 пациентки (средний возраст $35,2 \pm 3,5$

года) были рандомизированы в группы скрининга с использованием NGS (n=86) или СГГ (n=86) с последующей витрификацией и переносом 1 или 2 размороженных бластоцист после получения результатов ПГТ. Для NGS и СГГ частота наступления прогрессирующей беременности (74,7% по сравнению с 69,2% соответственно; $p>0,05$) и частота имплантации (70,5% по сравнению с 66,2% соответственно; $p>0,05$) были одинаково высокими, что позволило охарактеризовать NGS как эффективный, обладающий высокой точностью и высокой пропускной способностью метод ПГТ.

Недавнее исследование, посвященное сравнению ошибок при выявлении анеуплоидий и клинической результативности при применении СГГ на микрочипах и NGS, включило 45 пациенток, у которых было осуществлено параллельное сравнение применения NGS и СГГ для ПГТ 182 бластоцист [199]. Расхождения в оценке эуплоидности эмбрионов между методами составили 11,8% ($p=0,01$), что было в основном обусловлено хромосомным мозаицизмом (10,7% при использовании NGS по сравнению с 3,9% при применении СГГ) и сегментными анеуплоидиями (10,7% по сравнению с 6,7% соответственно). Эмбрионы с мозаицизмом (степень анеуплоидии 20–50%) и эмбрионы с частичной анеуплоидией лучше выявлялись при использовании платформы NGS. При последующем ретроспективном сравнении результатов ВРТ после переноса эуплоидных эмбрионов у 90 пациенток (NGS) и 129 пациенток (СГГ) частота биохимической беременности и частота имплантации были значимо выше в группе NGS. Аналогичная динамика наблюдалась и в отношении частоты клинической беременности и прогрессирующей беременности, но здесь различия между группами не были статистически значимыми.

В отечественном исследовании ПГТ 750 эмбрионов, полученных у 254 пациенток программ ВРТ с использованием метода NGS, анализ секвенирования позволил выявить наличие 62,3% нарушений в клетках трофэктодермы. Частота выявления генетической патологии эмбрионов в группе пациенток 35–40 лет была статистически значимо выше по сравнению

с группой пациенток в возрасте до 35 лет ($p=0,0107$). В свою очередь в группе старше 40 лет частота генетической патологии была статистически значимо выше по сравнению с группой 35–40 лет ($p=0,0005$) [200]. Данное исследование показало, что NGS может быть рекомендовано к применению в рамках ВРТ как мера профилактики невынашивания беременности и рождения больного ребенка.

В недавнем исследовании 916 переносов одного эуплоидного эмбриона после криоконсервации было отмечено улучшение параметров исходов беременностей после применения ПГТ с использованием NGS (548 эмбрионов) по сравнению с СГГ (368 эмбрионов) [201]. Частота имплантации была значимо выше в группе NGS по сравнению с группой СГГ (71,6% по сравнению с 64,6%). Частота прогрессирующей беременности/живорождения также была значимо выше в группе NGS (62% по сравнению с 54,4%), тогда как биохимических беременностей в группе СГГ было значимо больше (15,1% по сравнению с 8,7%). Различий в отношении частоты самопроизвольных потерь беременности не наблюдали (12,4% по сравнению с 12,7%). Данные результаты, несомненно, следует расценивать как многообещающие.

Таким образом, можно утверждать, что высокопроизводительное секвенирование в настоящее время следует рассматривать как наиболее передовой метод ПГТ в программах лечения бесплодия методами ВРТ.

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Материал исследования

Данная диссертационная работа представляет собой одноцентровое исследование, проведенное с 2016 по 2021 г. на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель — профессор, д.м.н. Е.А. Калинина) Института репродуктивной медицины (директор — профессор, д.м.н. Т.А. Назаренко) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор — академик РАН, профессор, д.м.н. Г.Т. Сухих). На первом этапе в исследование было включено 13 595 пар, которые проходили программы лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), на последующих — суммарно по всем анализируемым нозологиям 3 321 пара.

3.2. Дизайн исследования

Задача №1. *Определить структуру обращаемости пациентов с бесплодием для проведения преимплантационного генетического тестирования при лечении методами ВРТ.*

Было проведено ретроспективное исследование «случай–контроль» и проанализированы истории болезней, выделенные из архивных материалов с 2016 по 2020 г. отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова. Пациенты поделены на группы:

- группа 1 — пары с бесплодием, ВРТ с ПГТ;
- группа 2 — пары с бесплодием, ВРТ без ПГТ.

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Отсутствие гамет для оплодотворения.
- Суррогатное материнство.

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

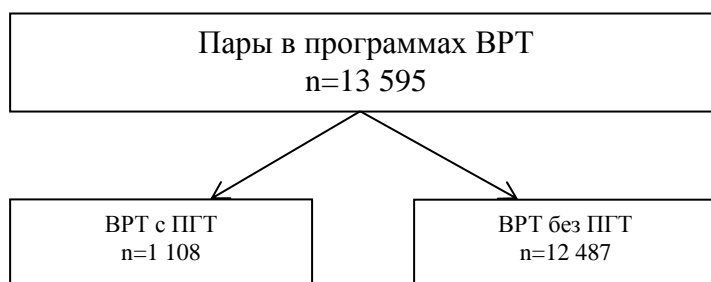


Рис. 1. Дизайн исследования для оценки структуры обращаемости пар в программах ВРТ для проведения преимплантационного генетического тестирования

Объем выборки: были проанализированы все пациенты, проходящие лечение бесплодия методами ВРТ с 2016 по 2020 г., удовлетворяющие критериям включения/исключения.

Задача №2. Изучить параметры фолликулогенеза, оогенеза, раннего эмбриогенеза, частоту наступления беременности и рождения у женщин различного возраста в программах лечения бесплодия методами ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием.

Дизайн: ретроспективное исследование «случай-контроль».

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Проведение ПГТ-А в программе лечения бесплодия методами ВРТ.

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Отсутствие гамет для оплодотворения.
- Неудовлетворительное качество эмбрионов.
- Суррогатное материнство.

Дизайн исследования представлен на рисунке 2.

Конечная точка: относительный риск (ОР) наступления беременности, ОР ранних репродуктивных потерь беременности (до 12 недель гестации), ОР живорождения в зависимости от назначения ПГТ.

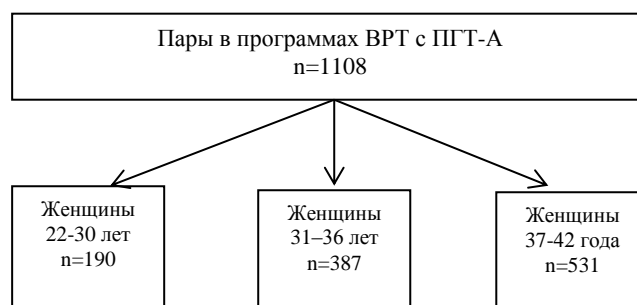


Рис. 2. исследования для оценки влияния возраста женщины на эффективность программ лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А

Задача №3. Проанализировать эффективность применения преимплантационного генетического тестирования в программе лечения бесплодия методами ВРТ в группе пациенток с привычным невынашиванием, наружным генитальным эндометриозом и синдромом поликистозных яичников.

Было проведено проспективное когортное исследование пациенток с НГЭ, СПКЯ и невынашиванием беременности, которые проходили лечение методами ВРТ с использованием и без ПГТ-А.

Для каждой нозологической группы были разработаны собственные критерии включения/исключения, представленные ниже.

Конечная точка при всех нозологиях: ОР наступления беременности, ОР ранних репродуктивных потерь беременности (до 12 недель гестации), ОР живорождения в зависимости от назначения ПГТ.

Этап 1: оценка эффективности ВРТ с ПГТ-А у женщин с привычным невынашиванием беременности (НБ) в анамнезе.

Проспективное когортное исследование «случай-контроль».

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к программам лечения бесплодия методами ВРТ.
- Возраст женщины до 35 лет включительно.
- Нормальная морфология сперматозоидов >2%.

- Нормальный кариотип обоих партнеров.
- Два и более невынашивания беременности в анамнезе (ранние репродуктивные потери до 12 недель гестации) для группы НБ.
- Перенос одного эмбриона в полость матки.

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Фактор мужского бесплодия (азооспермия, олигоастенотератозооспермия).
- Отсутствие эмбриона, пригодного для переноса в полость матки.
- Суррогатное материнство.
- Маточный фактор бесплодия/аномалии строения внутренних половых органов.
- Использование донорских ооцитов и сперматозоидов в программе ВРТ.

Дизайн исследования представлен на рисунке 3.

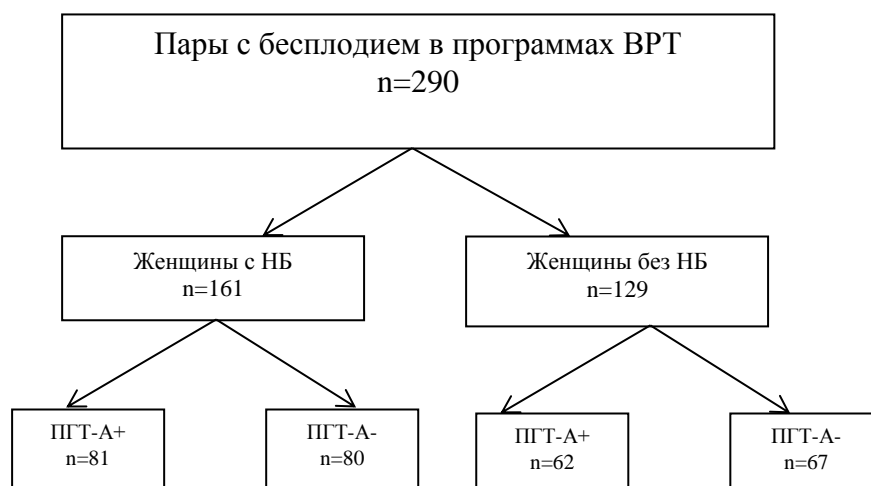


Рис. 3. Дизайн исследования для оценки влияния неразвивающейся беременности в анамнезе на эффективность программ лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А

Этап 2: оценка эффективности ВРТ с ПГТ-А у пациенток с бесплодием и синдромом поликистозных яичников (СПКЯ).

Было проведено проспективное когортное исследование «случай-контроль» пациенток с СПКЯ, которые проходили лечение методами ВРТ с использованием и без ПГТ-А. Проанализированы собственные данные и архивные материалы отделения. Дизайн исследования представлен на рисунке 4.

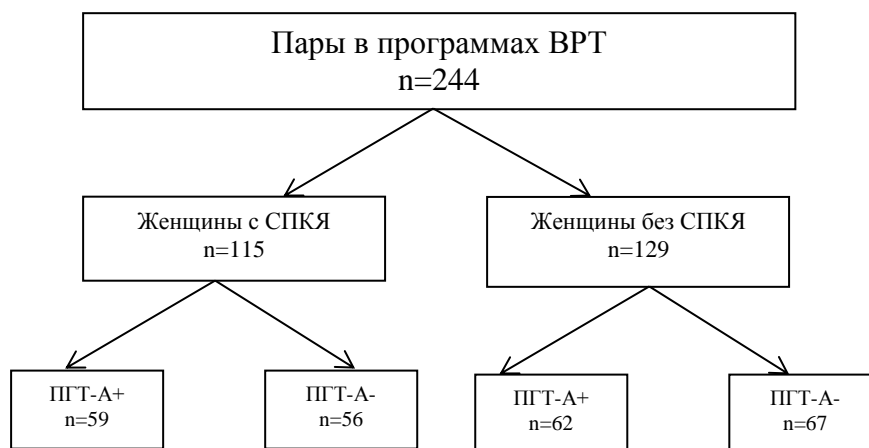


Рис. 4. Дизайн исследования для оценки влияния СПКЯ на эффективность программ лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А и без ПГТ-А

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к программам лечения бесплодия методами ВРТ.
- Возраст женщины до 35 лет включительно.
- Нормальная морфология сперматозоидов >2%.
- Нормальный кариотип обоих супругов.
- Перенос одного эмбриона в полость матки в криопротоколе с ПГТ-А (для групп с ПГТ).

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Фактор мужского бесплодия (азооспермия, олигоастенотератозооспермия).
- Отсутствие эмбриона, пригодного для переноса в полость матки.
- Использование донорских ооцитов и сперматозоидов в программе ВРТ.
- Суррогатное материнство.

Этап 3: оценка эффективности ВРТ с ПГТ-А у пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ).

Проспективное когортное исследование «случай-контроль». На данном этапе было принято решение о включении женщин всех возрастов, так как НГЭ является спорным показанием для проведения ПГТ-А.

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к программам лечения бесплодия методами ВРТ.
- Нормальная морфология сперматозоидов >2%.
- Нормальный кариотип обоих партнеров.

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Фактор мужского бесплодия (азооспермия, олигоастенотератозооспермия).
- Отсутствие эмбриона, пригодного для переноса в полость матки.
- Суррогатное материнство.
- Маточный фактор бесплодия.
- Использование донорских гамет в программе ВРТ.

Дизайн исследования представлен на рисунке 5.

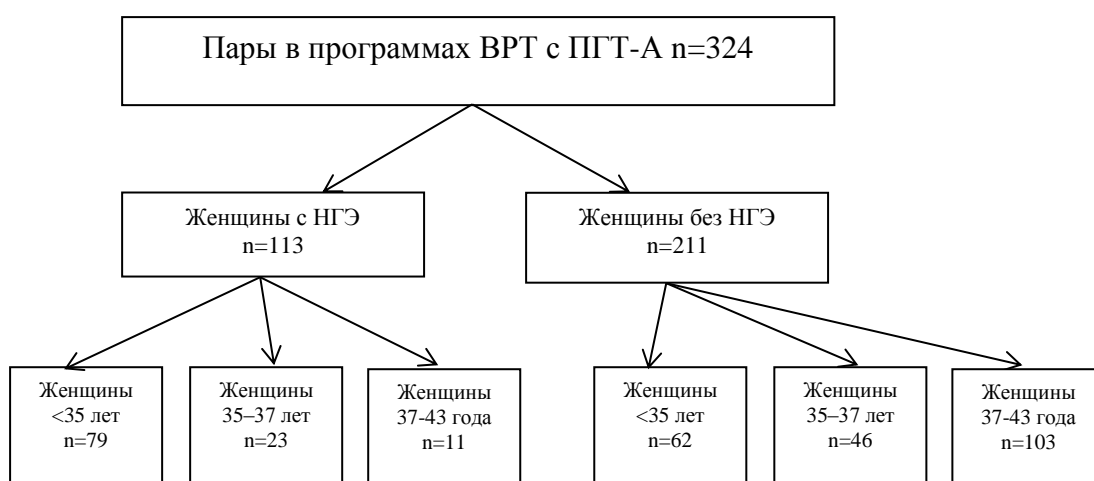


Рис. 5. Дизайн исследования для оценки влияния наружного генитального эндометриоза на эффективность программ лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А

Задача №4. Изучить особенности проведения программ ВРТ у пар с бесплодием, обусловленным нарушениями сперматогенеза.

Было проведено проспективное когортное исследование «случай-контроль». Выполнен анализ суммарно 2915 циклов ВРТ (2225 циклов стимуляции функции яичников, из которых 371 цикл с ПГТ-А, и 690 переносов размороженных эмбрионов без ПГТ). Для оценки влияния возраста мужчин на клинические и эмбриологические исходы программ ВРТ был сформирован дизайн исследования, который представлен на рисунке 6.

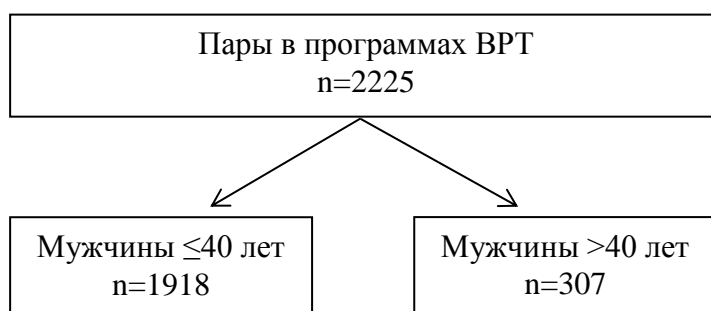


Рис. 6. Дизайн исследования для оценки влияния возраста мужчин на эмбриологические исходы программ ВРТ

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к программам лечения бесплодия методами ВРТ.
- Возраст женщины до 35 лет включительно.
- Использование для оплодотворения как нативной, так и криоконсервированной спермы.
- Аутологичная и донорская сперма.
- Использование нативных и размороженных донорских ооцитов (возраст доноров согласно регламентирующим документам до 35 лет).
- Нормальный кариотип обоих партнеров.
- Перенос одного эмбриона в полость матки.
- Отсутствие маточного фактора бесплодия.

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.

- Возраст супруги 36 лет и старше.
- Нарушение кариотипа любого из партнеров.
- Отсутствие эмбриона, пригодного для переноса в полость матки.
- Суррогатное материнство.

Было проанализировано 2225 пар и отобраны программы с переносом размороженного генетически нормального эмбриона (1022 эмбриона). Для оценки влияния возраста мужчин на частоту анеуплоидий была проанализирована 371 программа. Дизайн исследования представлен на рисунке 7.

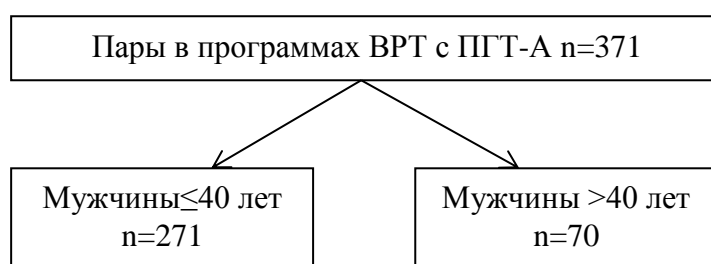


Рис. 7. Дизайн исследования для оценки влияния возраста мужчин на эмбриологические исходы программ ВРТ с ПГТ-А

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к программам лечения бесплодия методами ВРТ.
- Возраст женщины до 35 лет включительно.
- Перенос в полость матки одного генетически нормального эмбриона.
- Отсутствие культуральных сред с гиалуроновой кислотой.
- Выполнение вспомогательного хетчинга на этапе биопсии эмбриона.

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Возраст женщины 36 лет и старше.
- Нарушение кариотипа любого из партнеров.
- Отсутствие эмбриона, пригодного для переноса в полость матки.
- Суррогатное материнство.

На следующем этапе было оценено влияние концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов на особенности эмбриологического этапа программ ВРТ. Всего было проанализировано 2825 пар.

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к программам лечения бесплодия методами ВРТ.
- Возраст женщины до 35 лет включительно.
- Использование для оплодотворения как нативной, так и криоконсервированной спермы.
- Аутологичная и донорская сперма.
- Использование нативных и размороженных донорских ооцитов (возраст доноров согласно регламентирующим документам до 35 лет).
- Нормальный кариотип обоих партнеров.
- Отсутствие маточного фактора бесплодия.
- Культивирование эмбрионов до 5–6-х суток.

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Возраст женщины 36 лет и старше;
- Нарушение кариотипа любого из партнеров.
- Перенос эмбриона в полость матки на стадии дробления.
- Суррогатное материнство.

Для оценки влияния показателей эякулята в день оплодотворения на эффективность лечения бесплодия методами ВРТ на основании показателей спермограммы в день оплодотворения было сформировано 5 групп:

- группа с нормозооспермией — 257 пар с нормозооспермией (в том числе пары с донорской спермой);
- группа с олигоастенотератозооспермией у мужчины (ОАТ) — 214 пар;

- группа с биопсией яичка — 105 пар с оплодотворением сперматозоидами, полученными при биопсии яичка;
- группа с тератозооспермией 0–2% — 1061 пара с нормальной морфологией сперматозоидов 0–2%;
- группа с тератозооспермией 3% — 588 пар с нормальной морфологией сперматозоидов у мужчины 3%.

Дизайн исследования представлен на рисунке 8. В группу сравнения/контроля вошли пары с донорской спермой, а также с нормозооспермией (концентрация сперматозоидов $C \geq 15$ млн/мл, прогрессивно-подвижные сперматозоиды $\geq 32\%$, морфология $\geq 4\%$). Группу с олигоастенотератозооспермией (ОАТ) составили пациенты с $C < 15$ млн/мл, прогрессивно-подвижными сперматозоидами $< 32\%$ и морфологией $< 4\%$, в том числе пациенты с азооспермией ($C < 1$ млн/мл в нативном образце). Пациенты с обструктивной и необструктивной азооспермией, у которых сперматозоиды были получены путем аспирации или биопсии тканей яичка, составили группу с биопсией яичка. Дополнительно были выделены две группы с тератозооспермией (Т) в зависимости от процента морфологически нормальных сперматозоидов: мужчины с морфологией сперматозоидов в диапазоне от 0 до 2% составили группу «0–2%Т», а с морфологией 3% — группу «3%Т». В исследовании было важно найти пограничное значение морфологии сперматозоидов у мужчин, для которых целесообразно выполнение ПГТ-А. Группу с тяжелым/выраженным мужским фактором (ТМФ) бесплодия составили пациенты с ОАТ и пациенты с биопсией яичка.

Конечная точка: ОР наступления беременности, ОР ранних репродуктивных потерь беременности (до 12 недель гестации), ОР живорождения в зависимости от назначения ПГТ.

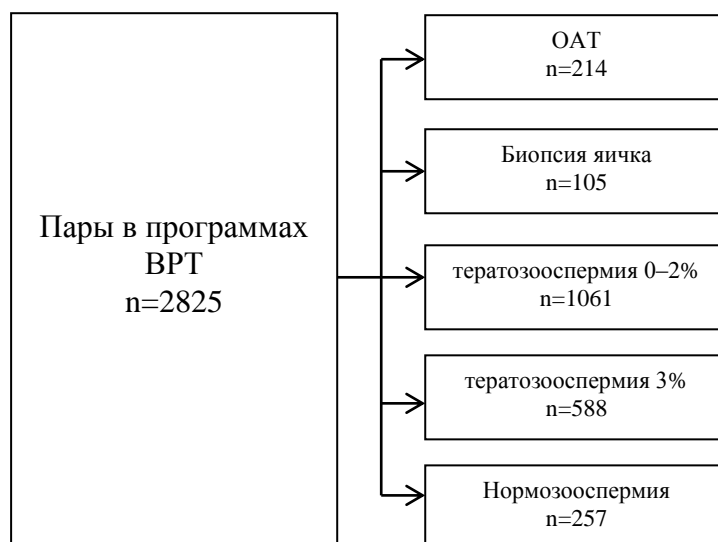


Рис. 8. Дизайн исследования для оценки влияния фактора мужского бесплодия на результативность лечения методами ВРТ

Задача №5. *Оценить эффективность применения преимплантационного генетического тестирования и исходов программы ВРТ у пар с хромосомными нарушениями и носительством моногенных заболеваний.*

Перспективно были проанализированы все пациенты с нарушениями кариотипа, проходящие лечение бесплодия методами ВРТ. Собрана информация о 56 парах. Также были проанализированы результаты программ ВРТ с ПГТ-А и ПГТ-М у 24 фертильных пар с носительством моногенных заболеваний.

Конечная точка: ОР наступления беременности, ОР ранних репродуктивных потерь беременности (до 12 недель гестации), ОР живорождения в зависимости от назначения ПГТ.

Задача №6. *Определить истинный уровень мозаицизма эмбрионов человека в программах лечения бесплодия методами ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием. Оценить возможность переноса эмбрионов с мозаицизмом в программах ВРТ.*

С разрешения комиссии по биомедицинским исследованиям ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор — академик

РАН, профессор, д.м.н. Г.Т. Сухих) в период с 2015 по 2017 г. на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова и лаборатории молекулярно-генетических методов было проведено исследование, включающее анализ трофэктодермы 17 эмбрионов с помощью метода NGS. Все эмбрионы, включенные в настоящее исследование, являлись анеуплоидным и не были рекомендованы к переносу. Пациенты, чьи эмбрионы участвовали в исследовании, подписали добровольное информированное согласие на использование генетически аномальных эмбрионов в научно-образовательных целях.

После получения разрешения пары на использование эмбрионов в научных целях и подписания необходимых заявлений анеуплоидные эмбрионы в условиях эмбриологической лаборатории были разделены с помощью лазера и микроманипулятора на три части: внутренняя клеточная масса (ВКМ), образец трофэктодермы №1, образец трофэктодермы №2. Полученные клетки, соответствующие трем частям анализируемых анеуплоидных эмбрионов, согласно результатам ранее проведенной общей биопсии трофэктодермы, были отправлены на повторный анализ с помощью метода высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS). Результаты обрабатывали стандартно методами биоинформатического анализа (Институт репродуктивной генетики, директор — член-корреспондент РАН, д.б.н. Д.Ю. Трофимов).

Задача №7. *Оптимизировать эмбриологический этап программ ВРТ при переносе в полость матки эуплоидного эмбриона с помощью использования культуральных сред с гиалуроновой кислотой и оценки копийности митохондриальной ДНК эмбриона.*

Одна из причин отсутствия имплантации при переносе эуплоидного эмбриона заключается в недостаточном формировании адгезивного матрикса между эмбрионом и эндометрием. Для оценки влияния новых культуральных сред, содержащих гиалуроновую кислоту, при переносе эуплоидного эмбриона были проанализированы данные, полученные от 309 пар,

проходящих лечение бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А с последующим переносом эуплоидного эмбриона в криопротоколе.

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к программам лечения бесплодия методами ВРТ.
- Перенос одной генетически нормальной бластоцисты в полость матки.
- Тератозооспермия >2%.
- Криоконсервация методом витрификации.
- Нормальный кариотип обоих партнеров.
- Отсутствие маточного фактора бесплодия.
- Возраст женщины до 44 лет.

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Использование донорских гамет в программе ВРТ.
- Отсутствие генетически нормального эмбриона для переноса в полость матки.
- Отсутствие вспомогательного хетчинга в виде полного удаления зоны пеллюцида.

Конечная точка: ОР наступления беременности, ОР ранних репродуктивных потерь беременности (до 12 недель гестации), ОР живорождения в зависимости от применения культуральных сред с гиалуроновой кислотой.

Дизайн исследования представлен на рисунке 9. Все пациенты, включенные в данное исследование, были разделены на две группы: пациенты, которым был выполнен перенос эмбриона в культуральной среде с гиалуроновой кислотой (группа 1, n=53), и пациенты, которым перенос проведен с использованием однокомпонентной культуральной среды CSCM (группа 2, n=256). Для минимизации влияния возраста на исходы программ ВРТ и интерпретацию полученных результатов все пациентки, включенные в исследование, были разделены на три подгруппы в зависимости от возраста:

подгруппа 1 (24–30 лет, 72 женщины), подгруппа 2 (31–36, 148 женщины), подгруппа 3 (37–43, 89 женщин). Эффективность программы ВРТ была проанализирована в каждой группе.

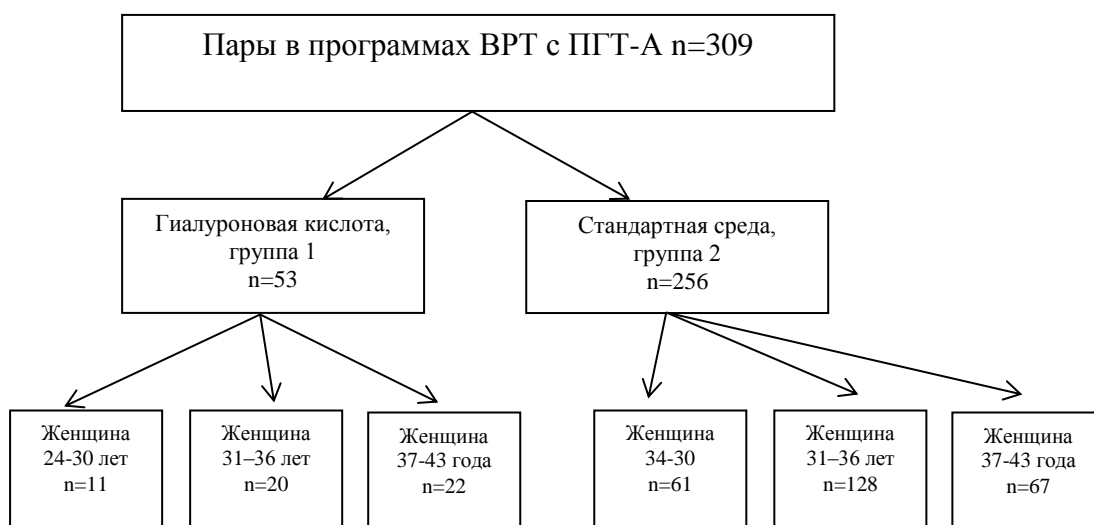


Рис. 9. Дизайн исследования для оценки влияния культуральных сред с гиалуроновой кислотой на эффективность программ лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А

Для оценки влияния уровня копийности митохондриальной ДНК на исходы программ лечения бесплодия проведено когортное исследование, в которое были включены 244 зуплоидных немозаичных бластоцист после проведения ПГТ-А. Бластоцисты получены в результате проведения программы ВРТ у 187 пар после подписания информированного добровольного согласия. Было проанализировано 218 селективных переносов размороженных эмбрионов в полость матки.

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к программам лечения бесплодия методами ВРТ.
- Перенос одной генетически нормальной бластоцисты в полость матки.
- Невыраженный фактор мужского бесплодия.
- Криоконсервация методом витрификации.
- Нормальный кариотип обоих партнеров.
- Отсутствие маточного фактора бесплодия.

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Использование культуральных сред, содержащих гиалуроновую кислоту.
- Отсутствие вспомогательного хетчинга в виде полного удаления зоны пеллюцида.

Конечная точка: ОР наступления беременности, ОР ранних репродуктивных потерь беременности (до 12 недель гестации), ОР живорождения в зависимости от уровня копийности митохондриальной ДНК.

3.3. Соблюдение этических норм

Настоящее исследование было поддержано на заседании комиссии по этике биомедицинских исследований, протокол №6 от 9 июня 2016 г. Все пациенты, включенные в работу, подписали информированное добровольное согласие и согласие на обработку своих персональных данных.

3.4. Методы исследования

3.4.1. Обследование пар для вступления в программу ВРТ

Все пары, вступающие в программу ВРТ, были предварительно обследованы согласно действующим нормативным документам:

- Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 августа 2012 г. №107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»;

- Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 июля 2020 г. №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»;

- Клинические рекомендации «Женское бесплодие», утвержденные Министерством здравоохранения Российской Федерации (2021 г.).

Перед началом лечения бесплодия методами ВРТ пары в амбулаторных условиях проходили как обязательные, так и специальные (по показаниям) методы исследования.

Обязательные исследования:

- общее и специальное гинекологическое обследование;
- ультразвуковое исследование органов малого таза на 5–8-й день менструального цикла;
- определение группы крови и резус-фактора;
- клинический анализ крови;
- гемостазиограмма;
- анализ крови на антитела к ВИЧ, HBsAg, анти-HCV, реакция Вассермана (оба супруга);
- исследование на флору цервикального канала и степень чистоты влагалища;
- цитологическое исследование мазков шейки матки;
- флюорография или рентген грудной клетки;
- ЭКГ;
- заключение терапевта о состоянии здоровья;
- спермограмма для мужчин.

Исследования по показаниям:

- исследование состояния матки и маточных труб (гистеросальпингография или гистеросальпингоскопия и лапароскопия);
- биопсия эндометрия;
- бактериологическое исследование материала из цервикального канала;
- цитологическое исследование мазков шейки матки;
- гормоны крови (на 2–3-й день менструального цикла): ЛГ, ФСГ, эстрадиол, ТТГ, Т3/Т4св, ДГА-С, пролактин, СТГ, кортизол, тестостерон, прогестерон;
- обследование на наличие антиспермальных и антифосфолипидных антител;

- исследование цервикального мазка на инфекции методом ПЦР: *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis u genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *HSV*, *CMV*;
- анализ крови на *IgG+IgM* к *HSV*, *CMV*, *Toxoplasma gondii*, *Rubella*;
- заключения других специалистов по показаниям;
- медико-генетическое консультирование для пар старше 35 лет или при наличии показаний для ПГТ;
- консультация андролога.

График обследований представлен в таблице 2.

Таблица 2. Используемые методы обследования пар, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ

	Перед вступлением в программу ВРТ	Пункция яичников	3-е сутки после пункции и яичников	4–5-е сутки после пункции яичников	2 недели после переноса эмбриона	3 недели после переноса эмбриона	9–10 недель после переноса эмбрионов
Клин.анализ крови	X						
Гемостазиограмма	X						
RW,ВИЧ,HBs,HCV	X						
Группа, Rh крови	X						
Гормоны крови	X						
Мазок на флору	X						
ПЦР – ИППП	X						
Мазок на ОЦ	X						
Спермограмма	X						
УЗИ органов малого таза	X						
Консультация терапевта	X						
Морфологическая оценка качества ооцитов		X					
Морфологическая оценка качества эмбрионов			X				

	Перед вступлением в программу ВРТ	Пункция яичников	3-е сутки после пункции и яичников	4–5-е сутки после пункции яичников	2 недели после переноса эмбриона	3 недели после переноса эмбриона	9–10 недель после переноса эмбриона
Биопсия клеток трофобласта и криоконсервация эмбрионов			X				
Перенос эмбрионов				X			
ХГ					X		
УЗИ малого таза для визуализации плодного яйца						X	X

3.4.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза

Ультразвуковое исследование органов малого таза проводили в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России с 5 по 7 день менструального цикла, предшествующего циклу стимуляции функции яичников. Проводили измерение размеров тела матки и структуры миометрия, толщины и структуры эндометрия, размеров и объема яичников, состояния фолликулярного аппарата, наличия или отсутствия объемной патологии в малом тазу. На данном этапе принималось решение о возможности и целесообразности проведения программы ВРТ с собственными ооцитами. В день начала цикла стимуляции функции яичников, 2–3 день менструального цикла, проводили повторное УЗИ-исследование и назначали препараты для роста фолликулов. Каждые три дня врач акушер-гинеколог оценивал динамику роста фолликулов для корректировки дозы вводимых гонадотропинов до момента введения триггера овуляции. Анализ выполняли на ультразвуковых аппаратах Flex Focus 800 с помощью интравагинального датчика с частотой 5 МГц.

3.4.3. Протокол стимуляции функции яичников и получение ооцитов

Стимуляцию функции яичников выполняли по протоколу с препаратами антагонист гонадотропинрилизинг гормона (антГнРГ) со 2–4 дня менструального цикла и по протоколу с использованием препаратов агониста гонадотропинрилизинг гормона (аГнРГ) на фоне десенситизации гипофиза. Стимуляцию функции яичников проводили рекомбинантным ФСГ и/или человеческими менопаузальными гонадотропинами (ЧМГ) в течение 8–12 дней. В качестве триггера финального созревания ооцитов был использован хорионический гонадотропин (ХГ) в дозе от 5 000–10 000 МЕ. В случае риска гиперстимуляции яичников производилась замена триггера на аГнРГ в дозе 0,2 мг п/к. Через 35–36 ч после введения триггера под общим наркозом проводили трансвагинальную пункцию фолликулов (ТВП).

3.4.4. Анализ эякулята и подготовка сперматозоидов к экстракорпоральному оплодотворению

Параметры спермограммы оценивали в ходе предварительного обследования пары перед программой ВРТ и в день трансвагинальной пункции яичников. Образцы эякулята, полученные в стерильный контейнер после 3–5 дней полового воздержания путем мастурбации в день трансвагинальной пункции, оценивали на основе критериев 5-го издания ВОЗ «Руководство по оценке и криоконсервации эякулята» (2010г.). Для главных характеристик спермы использовали следующие параметры: концентрация, процент прогрессивно-подвижных сперматозоидов и процент морфологически нормальных сперматозоидов. Нормальными параметрами эякулята считали значения, указанные в таблице 3. После разжижения эякулят был обработан методом центрифугирования и разделения в градиенте плотностей с последующей отмывкой и всплытием сперматозоидов в культуральной среде с HEPES. На данном этапе

использовали среды SpermWash (Irvine Sc., США). Буферные системы использовали строго согласно рекомендациям производителя.

Таблица 3. Нормативные показатели эякулята

Показатель	Значение
Время разжижения спермы	До 60 минут
Объем	1,5 мл и более
pH	7,2 и более
Концентрация сперматозоидов	15 млн/мл и более
Общее количество сперматозоидов	39 млн и более
Общая подвижность сперматозоидов	50% и более
Сперматозоиды с поступательным движением, PR	32% и более
Морфология сперматозоидов	Более 4% по Крюгеру
Жизнеспособность сперматозоидов	58% и более

3.4.5. Эмбриологический этап и морфологическая оценка эмбрионов

Идентификацию ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) и оценку степени зрелости ооцитов проводили под стереомикроскопом на нагретой до 37°C поверхности стерильного ламинарного бокса. ОКК отмывали от фолликулярной жидкости (ФЖ) и крови и помещали в стерильные планшеты (Nunc, Дания) с культуральной средой Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., США) на 2–3 ч в целях предварительной инкубации при температуре +37,0°C и атмосфере с 6% CO₂. Денудирование ооцитов проводилось в растворе гиалуронидазы в течение 20 с (Irvine Sc., США). Далее ОКК отмывали в среде CSCM (Irvine Sc., США) и возвращали в лунки. После проведения оплодотворения методом ИКСИ ооциты переносили в среду CSCM (Irvine Sc., США) для дальнейшего культивирования. Оценка наступления стадии двух пронуклеусов проводили через 14–16 часов после оплодотворения. В случае отсутствия двух пронуклеусов оплодотворение считали несостоявшимся. Все этапы культивирования проводили в мультигазовых инкубаторах COOK (Ирландия) в каплях по 25 мкл под

маслом (Irvine Sc., США). Среди CSCM (Irvine Sc., США) не меняли в течение всего процесса культивирования. Блостоцисты были оценены по классификации, принятой Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов в модификации, и согласно Рекомендациям РАРЧ по оценке морфологии ооцитов и эмбрионов (2021 г.).

Оценку наступления стадии двух пронуклеусов (формирования зиготы) проводили через 14–16 часов после оплодотворения. Все этапы культивирования эмбриона были выполнены в мультигазовых инкубаторах СООК (Ирландия) в индивидуальных каплях по 25 мкл.

В качестве основных эмбриологических показателей циклов стимуляции оценивали количество ОКК, зрелых ооцитов (МII), частоту оплодотворения и бластуляции. Под частотой бластуляции понимали отношение числа бластоцист хорошего и отличного качества (количество замороженных бластоцист + число перенесенных эмбрионов) к числу зигот с двумя пронуклеусами.

3.4.6. Проведение биопсии трофобласта и витрификация эмбрионов

На 5–6 сутки после оплодотворения была выполнена биопсия клеток трофэктодермы у эмбрионов, соответствующих хорошему/отличному качеству согласно морфологическим критериям оценки (3–6 АВ, 3–6 ВА, 1–2 АА, 3–6 АА).

Для биопсии использовали боросиликатные иглы Origio (Дания). Полученные клетки трофэктодермы переносили в пробирки типа Эппендорф, содержащие лизирующий буфер, и передавали их в лабораторию для проведения молекулярно-генетической диагностики исследуемых образцов. Эмбрионы после биопсии выдерживали 1–2 ч и в случае отсутствия выраженной дегенерации подвергали криоконсервации методом витрификации на средах Kitazato (Япония) согласно инструкции производителя культуральных сред.

3.4.7. Преимплантационное генетическое тестирование

За период с 2016 по 2017 г. анализ полученных образцов проводился с помощью хромосомного микроматричного анализа (а-CGH). С 2018 г. была введена в практику технология ПГТ-А методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения. Преимплантационное генетическое тестирование проводили в лабораториях Института репродуктивной генетики (директор — д.б.н. Д.Ю.Трофимов) ФГБУ «НМИЦ АГП им.В.И. Кулакова» Минздрава России и в Центре генетических исследований «Хайтек Генетикс» (директор — д.б.н. Ж.И. Глинкина) на сертифицированных тест-системах.

- Метод сравнительной геномной гибридизации

Тестирование а-CGH 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%-ом агарозном геле. Ампликоны метили с использованием набора SureTag DNA labeling Kit («Agilent») согласно инструкции производителя. Меченые ампликоны наносили на биочип Sure Print G3 8x60 аCGH Agilent, гибридизовали в течение 16 часов, после чего отмывали и анализировали на сканере биологических чипов SureScan Microarray Scanner. Интерпретацию результатов проводили с помощью программного продукта Agilent CytoGenomics.

- Высокопроизводительное секвенирование нового поколения

Данная технология подходит для определения анеуплоидий (ПГТ-А) и и структурных перестроек хромосом (ПГТ-СП) у эмбрионов.

Секвенирование образцов проводили на двух платформах: Thermo Fisher Scientific (США) и Illumina (США).

Полупроводниковое секвенирование на платформе Thermo Fisher Scientific

Для проведения высокопроизводительного секвенирования по технологии Thermo Fisher Scientific использовали коммерческий набор ReproSeq PGS Kit. Работу проводили на оборудовании фирмы Ion S5 System. Принцип работы аппарата основан на детекции изменения проводимости среды за счет протонов вновь присоединенных нуклеотидов. Образец попадает в микрореактор прибора Ion Proton. Секвенирование предваряется отжигом праймера, комплементарного концевому адаптеру, соединенному со смысловой ДНК. Затем к микросферам, содержащим смесь ДНК, поочередно добавляют нуклеотидтрифосфаты. В случае если добавленный нуклеотид комплементарен матрице, ДНК-полимераза встраивает его в свою цепь. При этом выделяется пирофосфат и протон, изменяющий рН раствора в микрореакторе. Это изменение фиксируется сенсором. Если нуклеотид некомплементарен, то реакции не происходит, и рН не меняется. В последующем цикле отмывки несвязавшийся нуклеотид удаляется и добавляется нуклеотид другого вида. Так, методом перебора подбирается комплементарный состав нуклеотидов, воссоздается информация о последовательности секвенируемой ДНК. Существуют определенные трудности с распознаванием гомополимерных участков — в этом случае за один цикл могут присоединиться несколько нуклеотидов, дискретность сигнала снижается. Количество прочтений на один образец составляет около 150 000–200 000. Интерпретацию результатов проводили с помощью облачного сервиса Ion Reporter Software.

Секвенирование на платформе Illumina

ПГТ осуществляли на приборе MiSeq компании Illumina и коммерческого набора VeriSeq PGS Kit. Для тестирования брали клетки трофанктодермы эмбрионов, полученных в программе ВРТ. Все эмбрионы

были получены после оплодотворения методом ИКСИ. Диагностику производили согласно протоколу Illumina. Перед секвенированием осуществляли полногеномную амплификацию ДНК клеток трофэктодермы. Анализ качества полученного продукта WGA проводили с помощью электрофореза. В основе метода лежит регистрация сигналов флуоресцентно меченых нуклеотидов. Для получения результата исследуемую ДНК сначала модифицируют, затем создают коллекцию случайных фрагментов нужной структуры. Обработку образцов, получение библиотеки для секвенирования производили согласно протоколу Illumina.

К основным этапам процесса NGS можно отнести:

- 1) выделение ДНК-фрагментов определенной длины;
- 2) прикрепление адаптеров по краям фрагментов;
- 3) амплификация каждого фрагмента ДНК;
- 4) определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК;
- 5) биоинформатический анализ данных.

Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения BlueFluse Multi.

- Количественная флуоресцентная полимеразно-цепная реакция

Тестирование эмбрионов на моногенные заболевания проводили методом количественной флуоресцентной полимеразно-цепной реакции (КФ-ПЦР) на базе ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (медицинский генетик Е.Ю. Воскобоева). Данная технология позволяет определить количество микросателлитных аллелей, амплифицированных с использованием меченых праймеров, с последующим разделением по размеру и измерением количества каждой аллели по размеру пика на полуавтоматическом генетическом анализаторе. В программу ВРТ с проведением ПГТ-М включали только пары с известными мутациями генов. Перед ПГТ-М выполняли подготовительный этап, который позволял разработать индивидуальную тест-систему для каждой пары, показывающую

ассоциацию мутации с индивидуальными STR-маркерами пациента (short tandem repeats- короткие тандемные повторы).

Тестировались эмбрионы прямым и косвенным методами. В случае прямого метода в образце исследовали известную мутацию, в случае косвенного — STR-маркеры, которые были определены во время подготовительного этапа и ассоциированы с мутацией.

Фрагментный STR – анализ проводили с использованием разработанных коллективом члена-корреспондента РАН, д.б.н. Д.Ю. Трофимова реактивов, в том числе и оригинальных праймеров, которые зарегистрированы для клинического использования в установленном порядке.

3.4.8. Подготовка эндометрия и перенос размороженного эмбриона в криоцикле

После получения результата по хромосомному статусу эмбрионов начинали подготовку эндометрия с помощью циклической гормональной терапии препаратами эстрадиола с 5–6-го дня менструального цикла или в естественном цикле при наличии доминантного фолликула в день осмотра. Циклическую гормональную терапию проводили препаратами прогестерона и эстрадиола согласно рекомендациям производителя.

Размораживание эмбрионов проводили за 3 часа до предполагаемого переноса на средах компании Kitazato (Япония) согласно инструкции производителя. Размороженные бластоцисты культивировали и переносили в полость матки под ультразвуковым контролем в среде Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., США) катетерами COOK (Австралия) или TDT (Франция) в случае затрудненного прохождения шейки матки. Был выполнен селективный перенос одного euploidного эмбриона. Бластоцисты переносили в полость матки на 19–22 день менструального цикла при толщине эндометрия в день переноса эмбриона более 8 мм под контролем ультразвукового датчика.

Протокол использования культуральных сред с гиалуроновой кислотой для переноса эмбриона

За день до переноса эмбриона культуральную среду, обогащенную гиалуроновой кислотой, разливали в культуральные плашки в объеме 2,0 мл под маслом и оставляли в течение 15 часов при температуре 37°C и 6 % CO₂. После размораживания эмбрион сразу помещали на 10 мин в культуральную среду с гиалуроновой кислотой без предварительного прекультивирования. Через 10 минут культуральная среда, обогащенная гиалуроновой кислотой и содержащая эмбрион, набиралась в мягкий катетер Wallace (Германия) или СооК (Австралия) в объеме 30 мкл.

Поддержку лютеиновой фазы цикла, а также посттрансферного периода выполняли по стандартной методике препаратами эстрадиола и прогестерона по инструкции производителя.

3.4.9. Диагностика наступления беременности

На 14-й день после переноса эмбриона пациентки сдавали кровь на содержание бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГ) для диагностики беременности. При положительном результате β -ХГ для диагностики клинической внутриматочной беременности на 21-й день после переноса эмбриона выполняли трансвагинальное УЗИ. Дальнейшее наблюдение и ведение беременности осуществляли в индивидуальном порядке.

3.4.10. Статистические методы обработки полученных данных

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью таблиц «Microsoft Excel» и статистической программы SPSS Statistics 22 (США). Статистический анализ проводили с помощью χ^2 -теста для сравнения категориальных данных. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные числа N и процентные доли от общего числа пациенток в группе (%).

Для анализа количественных данных в группах определялся вид распределения данных (тест Колмогорова–Смирнова, графический анализ данных). Статистический анализ также проводили с помощью теста Манна–Уитни при парном сравнении в случае, когда полученные данные не

соответствовали закону нормального распределения. При распределении признаков, отличающихся от нормальных, их описывали в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1; Q3).

При множественных сравнениях использовали поправку Бонферрони. Для оценки связи между определенным исходом и фактором риска рассчитывали отношение шансов с доверительным интервалом 95% и делали вывод о статистической значимости выявленной связи между фактором и исходом.

Величину порогового уровня значимости (p) во всех исследованиях принимали равной 0,05.

3.4.11. Методы проведения клинико-экономического анализа

В рамках настоящей диссертационной работы было выполнено клинико-экономическое исследование, в котором оценивалась клинико-экономическая эффективность программ лечения бесплодия методами ВРТ с применением преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии преимплантационных эмбрионов у пар, где у мужчин были различные формы нарушения сперматогенеза. Проведение клинико-экономического анализа было осуществлено на базе ФГБУ «Центр экспертизы и контроля качества медицинской помощи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (руководитель — д.м.н., профессор В.В. Омеляновский).

На основании полученных результатов были построены 20 марковских моделей, представляющих собой марковские процессы с дискретным временем. Всего в рамках построения моделей было рассмотрено 10 возможных попарных сценариев для пар:

1. Женщины 22–30 лет с применением ПГТ и без применения ПГТ.
2. Женщины 31–36 лет с применением ПГТ и без применения ПГТ.
3. Женщины 37–42 лет с применением ПГТ и без применения ПГТ.
4. Женщины до 35 лет с НГЭ с применением ПГТ и без применения ПГТ.
5. Женщины до 35 лет с СПКЯ с применением ПГТ и с СПКЯ без применения ПГТ.

6. Женщины до 35 лет с НБ с применением ПГТ и с НБ без применения ПГТ.
7. Мужчины с ОАТ с применением ПГТ и без применения ПГТ.
8. Мужчины с биопсией яичка с применением ПГТ и без применения ПГТ.
9. Мужчины с тератозооспермией с применением ПГТ и без применения ПГТ.
10. Мужчины с нормозооспермией с применением ПГТ и без применения ПГТ.

Таким образом, клинико-экономический анализ был проведен в десяти попарных марковских моделях, построенных отдельно для каждой популяции пациентов (пар) с факторами женского и мужского бесплодия. В каждой модели сравнивали два сценария:

- 1) без использования преимплантационного генетического тестирования – базовый сценарий;
- 2) с использованием преимплантационного генетического тестирования – моделируемый сценарий.

Для сравнения сценариев использовали метод «затраты–эффективность», критерием эффективности являлось число живорождений на 1000 пар. Затраты рассчитывали с позиции системы обязательного медицинского страхования (ОМС).

Описание математических моделей

Обе модели – без использования преимплантационного генетического тестирования и с использованием преимплантационного генетического тестирования – представляют собой марковские процессы с дискретным временем. Все пары, включенные в модель, имеют установленный фактор бесплодия и в течение периода моделирования могут находиться в одном из трех состояний: бесплодие, ранние репродуктивные потери, роды (живорождение). Временной горизонт моделирования составил 5 лет, длительность цикла в модели (период времени между переходами из

состояния в состояние) принята равной 1 году. В течение каждого цикла пара, находящаяся в одном из состояний, за исключением родов (живорождения), может либо остаться в данном состоянии, либо перейти в другое состояние, либо могут произойти роды. Состояние «роды (живорождение)» является абсорбирующим (конечным), так как выход из него принимается невозможным.

Данные о популяциях пациентов (пар)

В качестве исходных данных о популяциях пациентов (пар) были использованы собственные данные, полученные на предыдущих этапах диссертационного исследования, а также данные отделения вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель — проф., д.м.н. Калинина Е.А.).

Вероятности перехода из одного состояния модели в другое

Для расчета вероятности наступления беременности и живорождения использовали собственные данные, полученные на предыдущих этапах диссертационного исследования, а также данные отделения вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель проф., д.м.н. Калинина Е.А.).

Стоимостные исходные данные и расчет затрат

Стоимость рутинных процедур ВРТ была рассчитана исходя из действующей системы оплаты медицинской помощи в соответствии с Положением об установлении тарифов на оплату специализированной, в том числе высокотехнологичной, медицинской помощи, оказываемой медицинскими организациями, функции и полномочия учредителей в отношении которых осуществляет Правительство Российской Федерации или федеральные органы исполнительной власти, в соответствии с едиными требованиями базовой программы обязательного медицинского страхования (далее – Положение), утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 28.12.2021 г. № 2505 «О Программе

государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи на 2022 год и на плановый период 2023 и 2024 годов».

В соответствии с данным Положением оказание медицинской помощи с применением вспомогательных репродуктивных технологий (экстракорпорального оплодотворения) осуществляется в дневном стационаре и оплачивается за счет средств обязательного медицинского страхования по следующим клинико-статистическим группам:

ds02.008 Экстракорпоральное оплодотворение (уровень 1)

ds02.009 Экстракорпоральное оплодотворение (уровень 2)

ds02.010 Экстракорпоральное оплодотворение (уровень 3)

ds02.011 Экстракорпоральное оплодотворение (уровень 4)

При этом также в соответствии с Положением при оплате случаев медицинской помощи, в ходе которых были применены вспомогательные репродуктивные технологии (экстракорпоральное оплодотворение), должны иметь иной классификационный критерий, а именно один из следующих дополнительных классификационных критериев:

ivf1 — Размораживание криоконсервированных эмбрионов с последующим переносом эмбрионов в полость матки (криоперенос) (A11.20.030.001 Внутриматочное введение криоконсервированного эмбриона);

ivf2 — Проведение I этапа ЭКО: стимуляция суперовуляции;

ivf3 — Проведение I–II этапов ЭКО: стимуляция суперовуляции, получение яйцеклетки (A11.20.019 Получение яйцеклетки);

ivf4 – Проведение I–III этапов ЭКО: стимуляция суперовуляции, получение яйцеклетки (A11.20.019 Получение яйцеклетки), экстракорпоральное оплодотворение и культивирование эмбрионов (A11.20.027 Экстракорпоральное оплодотворение ооцитов; A11.20.028 Культивирование эмбриона); без последующей криоконсервации эмбрионов;

ivf5 — Проведение I–III этапов ЭКО: стимуляция суперовуляции, получение яйцеклетки (A11.20.019 Получение яйцеклетки),

экстракорпоральное оплодотворение и культивирование эмбрионов (A11.20.027 Экстракорпоральное оплодотворение ооцитов; A11.20.028 Культивирование эмбриона); с последующей криоконсервацией эмбрионов (A11.20.031 Криоконсервация эмбрионов) без переноса эмбрионов;

ivf6 — Проведение I–IV этапов ЭКО: стимуляция суперовуляции, получение яйцеклетки (A11.20.019 Получение яйцеклетки), экстракорпоральное оплодотворение и культивирование эмбрионов (A11.20.027 Экстракорпоральное оплодотворение ооцитов; A11.20.028 Культивирование эмбриона), внутриматочное введение (перенос) эмбрионов (A11.20.030 Внутриматочное введение эмбриона); без осуществления криоконсервации эмбрионов;

ivf7 — Проведение I–IV этапов ЭКО: стимуляция суперовуляции, получение яйцеклетки (A11.20.019 Получение яйцеклетки), экстракорпоральное оплодотворение и культивирование эмбрионов (A11.20.027 Экстракорпоральное оплодотворение ооцитов; A11.20.028 Культивирование эмбриона), внутриматочное введение (перенос) эмбрионов (A11.20.030 Внутриматочное введение эмбриона); с осуществлением криоконсервации эмбрионов (A11.20.031 Криоконсервация эмбрионов).

Отнесение случая применения вспомогательных репродуктивных технологий (экстракорпорального оплодотворения) к одной из клинико-статистических групп ds02.008 – ds02.011 осуществляется следующим образом. Критерий ivf1 соответствует клинико-статистической группе ds02.008 с коэффициентом относительной затратоемкости (КЗ) 1,70. Критерии ivf2, ivf3, ivf4 соответствуют клинико-статистической группе ds02.009 с коэффициентом относительной затратоемкости 5,38. Критерии ivf5, ivf6 соответствуют клинико-статистической группе ds02.010 с коэффициентом относительной затратоемкости 8,96. Критерий ivf7 соответствует клинико-статистической группе ds02.011 с коэффициентом относительной затратоемкости 9,86. Для целей данного клинико-экономического анализа был рассмотрен сценарий с наиболее

высокозатратным дополнительным классификационным критерием ivf7 и соответствующей клинико-статистической группой ds02.011 с коэффициентом относительной затратоемкости 9,86.

Положением предусмотрен следующий расчет тарифа на оплату медицинской помощи.

Тариф на оплату медицинской помощи, оказываемой федеральной медицинской организацией в условиях дневного стационара, определяется следующим образом. Тариф представляет собой произведение среднего норматива финансовых затрат на единицу объема предоставления медицинской помощи (НФЗ) на коэффициент приведения среднего норматива финансовых затрат на единицу объема предоставления медицинской помощи (КБС) на коэффициент дифференциации (КД) устанавливаемый для субъекта Российской Федерации, на территории которого расположена федеральная медицинская организация, в соответствии с методикой распределения субвенций, предоставляемых из бюджета Федерального фонда обязательного медицинского страхования бюджетам территориальных фондов обязательного медицинского страхования на осуществление переданных органам государственной власти субъектов Российской Федерации полномочий Российской Федерации в сфере обязательного медицинского страхования, утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 5 мая 2012 г. № 462 «О порядке распределения, предоставления и расходования субвенций из бюджета Федерального фонда обязательного медицинского страхования бюджетам территориальных фондов обязательного медицинского страхования на осуществление переданных органам государственной власти субъектов Российской Федерации полномочий Российской Федерации в сфере обязательного медицинского страхования», на коэффициент относительной затратоемкости на коэффициент специфики.

Произведение среднего норматива финансовых затрат на коэффициент приведения среднего норматива финансовых затрат

объединяется понятием базовая ставка, и в 2022 г. базовая ставка для медицинской помощи, оказываемой федеральными медицинскими организациями в условиях дневного стационара, составляет 13 915,62 руб.

Коэффициент относительной затратоемкости для рассматриваемого нами сценария с дополнительным классификационным критерием ivf7 и соответствующей клинико-статистической группой ds02.011 составляет 9,86.

В соответствии с Положением, коэффициент специфики принимается равным 1,4 в случае, если применяемый коэффициент относительной затратоемкости больше 2, как в рассматриваемом нами сценарии. Коэффициент дифференциации для города федерального значения Москва на 2022 г. составляет 1,672.

Таким образом, тариф на оплату медицинской помощи, оказанной в условиях дневного стационара по клинико-статистической группе ds02.011, рассчитывается следующим образом: $13\,915,62 \text{ руб.} \times 9,86 \times 1,4 \times 1,672 = 321\,176 \text{ руб.}$

Определение затрат на проведение преимплантационного генетического скрининга производилось с использованием методики учета затрат при определении стоимости данной услуги в порядке оказания платных медицинских услуг ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. При оценке затрат учитывали три эмбриона для криоконсервации для каждой анализируемой группы, в том числе при отсутствии проведения преимплантационного генетического тестирования. По итогам оценки затраты на проведение преимплантационного генетического тестирования были оценены в 243 613 руб.

Таким образом, затраты на применение вспомогательных репродуктивных технологий (экстракорпорального оплодотворения) без применения преимплантационного генетического тестирования принимались равными 321 176 руб., а затраты на применение вспомогательных репродуктивных технологий (экстракорпорального оплодотворения) с

применением преимплантационного генетического тестирования принимались равными $321\,176 + 243\,613 = 564\,789$ руб.

Далее полученные затраты использовались при построении марковских моделей в исходной матрице «затраты–полезный эффект».

Представление результатов моделирования

Результаты моделирования включают:

- затраты на каждый из сценариев;
- исходы при каждом из сценариев (число живорождений);
- инкрементный показатель «затраты – эффективность» (англ. incremental cost-effectiveness ratio – ICER) при сравнении моделируемого и базового сценариев.

ICER показывает, какие дополнительные затраты требуются для достижения одной дополнительной единицы эффективности (одного живорождения) при использовании моделируемого сценария по сравнению с базовым в виде дополнительных затрат на одно живорождение, и рассчитывается по формуле:

$$ICER = (DC1 - DC2) / (Ef1 - Ef2),$$

где DC1, DC2 — ожидаемые затраты на каждый из сценариев; Ef1, Ef2 – эффективность применения каждого из анализируемых сценариев (количество живорождений).

ICER, полученный в результате расчетов, оценивали относительно порога готовности платить (ПГП) за одно живорождение, который в соответствии с рекомендациями ВОЗ для стран с развивающейся экономикой может быть рассчитан как трехкратное значение валового внутреннего продукта (ВВП) на душу населения. В Российской Федерации, исходя из данных о численности населения и значении ВВП за 2020 г., порог готовности платить будет составлять 2 180 093,06 руб. Если в моделируемом сценарии по сравнению с базовым сценарием затраты были меньше, а размер клинического эффекта больше, моделируемый сценарий расценивали как доминирующий (более эффективный и ресурсосберегающий).

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Оценка структуры обращаемости пациентов с бесплодием для проведения преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах ВРТ

За период с 2016 по 2021 г. на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России было проведено 13 595 циклов лечения бесплодия методами ВРТ. Анализ проводимых программ позволяет сформировать «портрет» пары, которые проходят лечение бесплодия методами ВРТ.

Из 13 595 проанализированных за 6-летний период циклов ВРТ было проведено 1 108 протоколов ВРТ с применением ПГТ с биопсией клеток эмбриона на 5-е и 6-е сутки культивирования (трофэктодерма) у 3 092 бластоцист хорошего/отличного качества (рис.10).

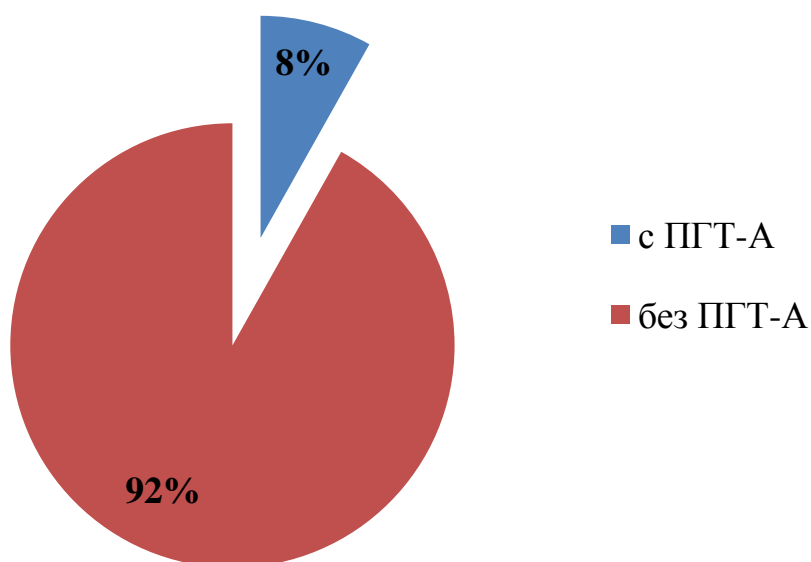


Рис. 10. Анализ программ ВРТ с применением ПГТ-А в 2016–2021 гг. в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В.Леонова

Совершенствование технологий ПГТ-А делает данную методику все более востребованной среди пар разного репродуктивного возраста. В процентном соотношении относительное число программ ВРТ с проведением ПГТ за 2016–2021 гг. составляет 6%, 8%, 8%, 14%, 13% и 13% соответственно, что отражает значительное увеличение числа циклов ВРТ с определением хромосомного статуса эмбриона. Динамика роста числа программ ПГТ показана на рисунке 11.

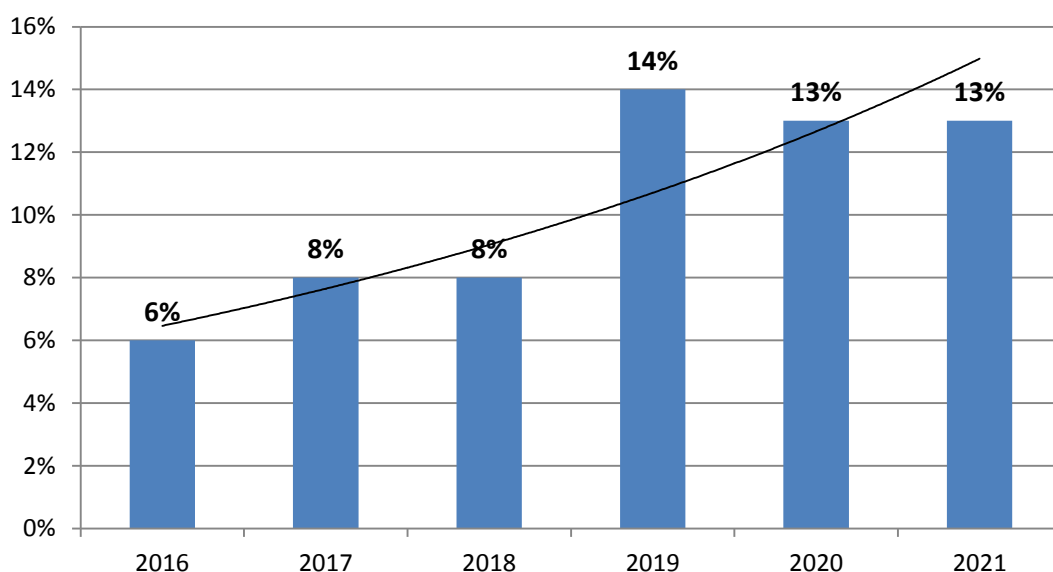


Рис. 11. Динамика роста доли программ ВРТ с применением ПГТ в 2016–2021 гг. в общем количестве циклов

Согласно проанализированным данным, основными причинами проведения ПГТ были поздний репродуктивный возраст (266, 26%), фактор мужского бесплодия (нарушения сперматогенеза) (343, 34%), множественные неудачные попытки ЭКО в анамнезе, в том числе самопроизвольные выкидыши (122, 12%), СПКЯ (100, 10%), наружный генитальный эндометриоз (122, 12%), а также нарушение кариотипа и носительство моногенных заболеваний (66, 6%). Выявленная структура обращаемости пациентов по нозологиям для проведения преимплантационного генетического тестирования в программах лечения бесплодия методами ВРТ показана на рисунке 12. На диаграмме отражены как абсолютные, так и относительные значения.

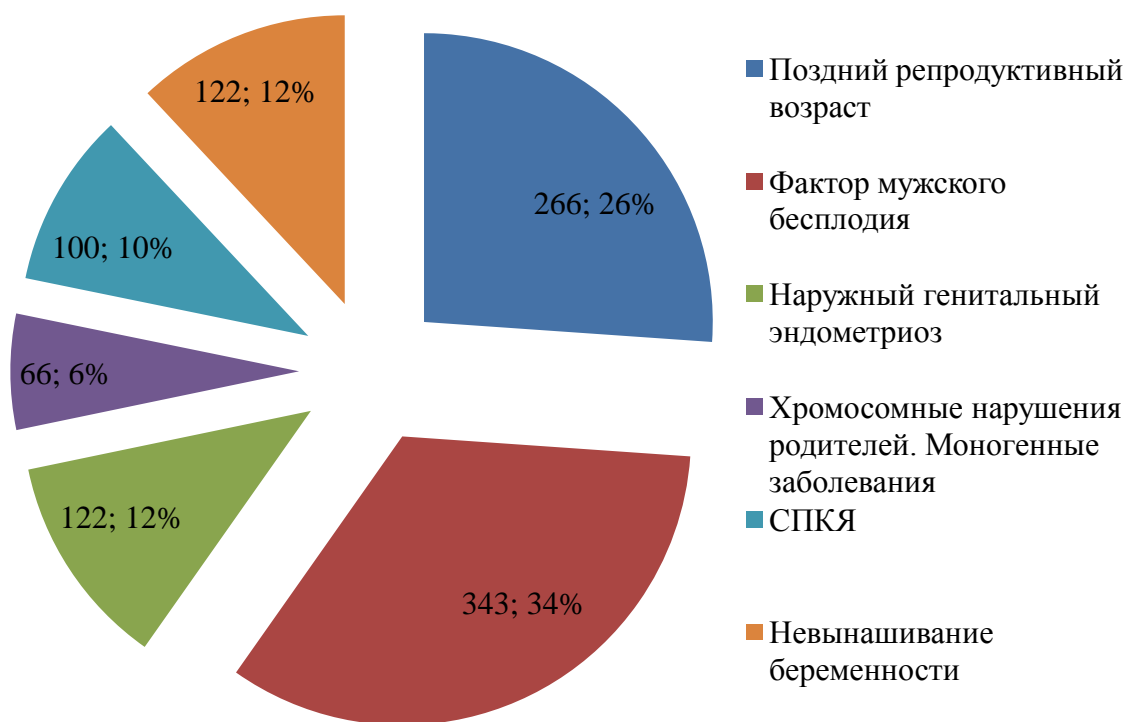


Рис. 12. Структура обращаемости пациентов, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ, для проведения преимплантационного генетического тестирования

4.2. Анализ эффективности программ лечения бесплодия методами ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием у пациенток разного возраста

При анализе циклов лечения бесплодия методами ВРТ обратила на себя внимание устойчивая тенденция к увеличению среднего возраста женщины, вступающей в программу ЭКО. Согласно данным отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова, за 5 лет произошло резкое увеличение возраста пациенток, с $33,7 \pm 2,1$ года до $36,1 \pm 1,5$ года. Тенденция отражена на рисунке 13.

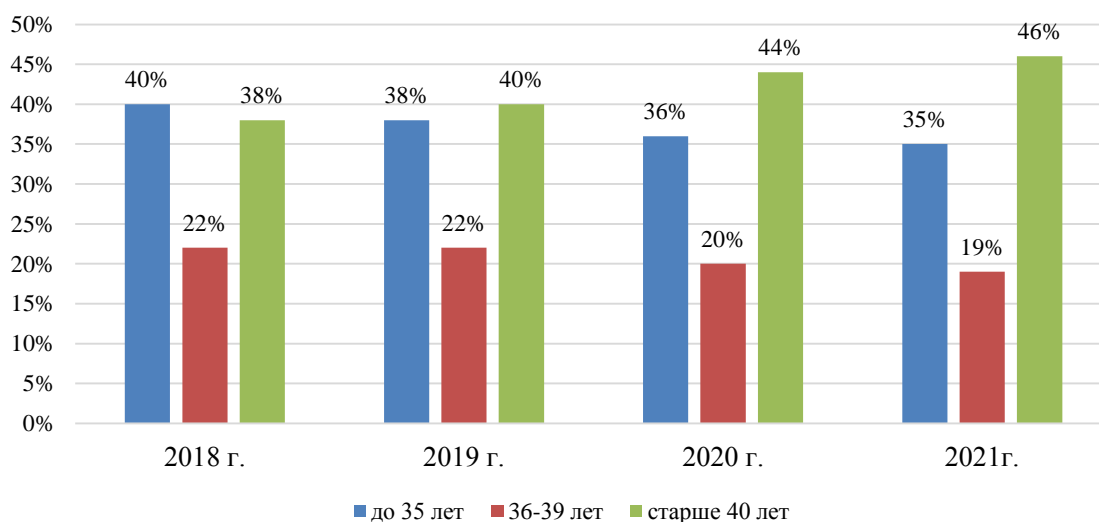


Рис. 13. Распределение пациенток в программах ВРТ по возрасту. Данные отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В.Леонова

За последние 5 лет количество пациенток до 35 лет уменьшилось в среднем на 5%, а пациенток старше 40 лет увеличилось в среднем на 10%. Динамика роста когорты пациенток позднего репродуктивного возраста ставит вопрос о необходимости снижения рисков рождения детей с хромосомными патологиями, и основным методом профилактики является обязательное преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии.

Именно поэтому на данном этапе работы была проанализирована эффективность лечения бесплодия у женщин разных возрастных групп с применением преимплантационного генетического тестирования. Все пациенты, проходящие лечение бесплодия с помощью ВРТ с ПГТ-А, были разделены на три группы в зависимости от возраста: 1-я группа (22–30 лет, n=190), 2-я группа (31–36 лет, n=387), 3-я группа (37–42 года, n=531). Возрастная структура показана на рисунке 14.

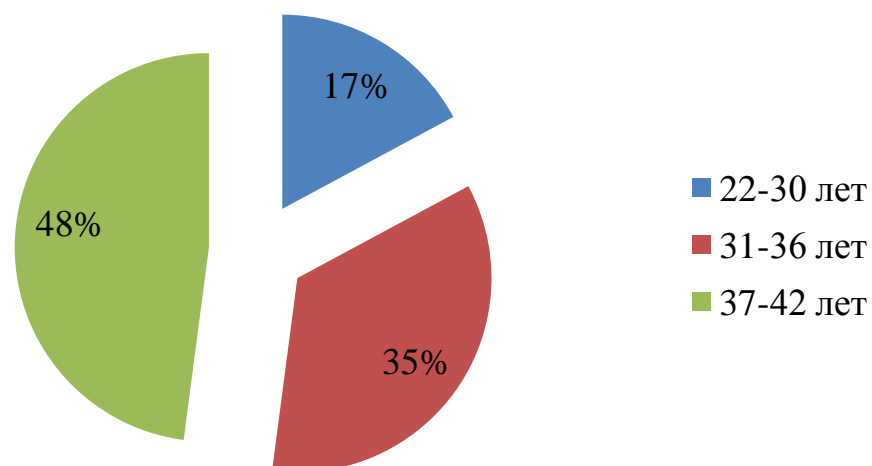


Рис. 14. Распределение пациенток, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием, по возрасту

Был рассчитан процент отмены переноса эмбриона в полость матки по причине отсутствия генетически нормальных эмбрионов по результатам ПГТ в каждой возрастной группе (рисунок 15). Данные показывают, что у женщин с любой причиной бесплодия в возрасте 37–42 лет в половине циклов ВРТ (57,1%) отсутствуют эмбрионы, пригодные для переноса, что может привести к рождению детей с хромосомными патологиями и снижает эффективность ВРТ. Тем не менее, у женщин позднего репродуктивного возраста проведение ПГТ целесообразно.

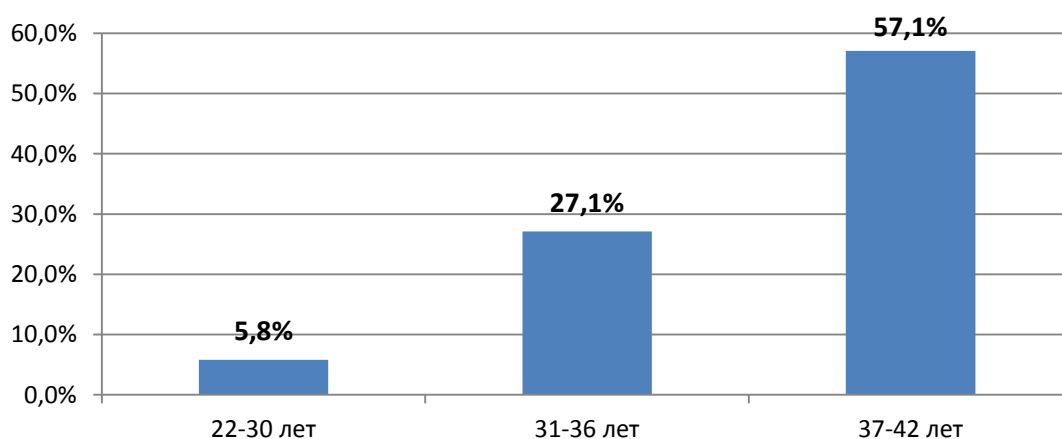


Рис. 15. Отмена переноса эмбриона по причине отсутствия генетически нормальных бластоцист в цикле лечения бесплодия методами ВРТ у женщин разного возраста

При анализе эффективности программ ВРТ с использованием ПГТ-А определялась частота наступления беременности и живорождений у пациенток в разных возрастных группах. За период с 2016 по 2021 г. было выполнено 627 криопротоколов с переносом размороженного зуплоидного эмбриона. Проанализирована зависимость эффективности программ ВРТ с использованием ПГТ-А от возраста. Пациенткам 22–30 лет было проведено 117 криоциклов с ПГТ-А (группа 1), пациенткам в возрасте 31–36 лет — 282 криоцикла (группа 2) и женщинам позднего репродуктивного возраста (37–42 года) было проведено 228 переносов размороженного эмбриона (группа 3).

В 1-й группе положительный результат имплантации при переносе зуплоидного эмбриона после ПГТ-А был у 46 пациенток (39%). У 8 пациенток диагностирована неразвивающаяся беременность на раннем сроке, у 4 пациенток — биохимическая беременность, 1 пациентки — внематочная беременность. Роды живым здоровым плодом были у 33 женщин (84,6% в расчете на беременность), из них у 11 — путем операции кесарево сечения. Во 2-й группе беременность наступила у 126 женщин (41%): 1 беременность шеечной локализации, 12 биохимических, 8 неразвивающихся и 94 родов (81,7% в расчете на беременность), из них 46 путем операции кесарево сечения, у одной пациентки были роды двойней. В 3-й группе успешное наступление беременности диагностировано у 84 пациенток (39%). Неразвивающаяся беременность в данной группе обнаружена у 13 женщин, биохимическая беременность — у 7, роды живым здоровым плодом были у 64 женщин (28%), у двух пациенток роды двойней. Путем кесарево сечения было родоразрешено 30 пациенток (таблица 4).

При статистическом анализе с помощью χ^2 -теста не обнаружено различий в частоте наступления беременности и живорождения у пациенток, проходящих лечение бесплодия методом ВРТ с использованием ПГТ-А, в зависимости от возрастной группы ($p=0,188$).

Таким образом, согласно полученным данным, эффективность программ ВРТ с ПГТ-А сопоставима у пациенток различного возраста.

Частота живорождения незначительно отличалась у женщин разных возрастных групп.

Таблица 4. Эффективность программ ВРТ с ПГТ-А у пациенток разного возраста в расчете на перенос эмбриона

Возраст	Положительный результат имплантации	Количество б/х беременностей	Количество неразвивающихся беременностей	Роды, расчет на перенос
22–30 лет (n=117)	46 (39%)	4 (8%)	8 (17%)	33 (28,2%)
31–36 лет (n=282)	126 (41%)	12 (10%)	8 (7%)	94 (33,3%)
37–42 года (n=228)	84 (39%)	7 (8%)	13 (14%)	64 (28,0%)

Различия в частоте неразвивающихся беременностей были статистически не значимы, что также указывает на целесообразность проведения ПГТ-А при наличии указанных показаний для повышения эффективности программ ВРТ. Проведенный анализ показал также, что при переносе генетически нормального эмбриона частота родов живым плодом в группе женщин позднего репродуктивного возраста и в группах более молодых пациенток сопоставима. Данные статистически незначимы, что указывает на необходимость оценки на большей выборке пар, а также требует проведения исследований, связанных со здоровьем рожденных детей у матерей в возрасте 37–42 лет. У женщин старше 37 лет чаще возникают осложнения беременности, и использование в программах ВРТ преимплантационного генетического тестирования позволяет существенно снизить риски рождения детей с хромосомными патологиями, нивелируя влияние возраста, приблизить рождение ребенка, сократив количество множественных неудачных попыток ЭКО, и возможно, уменьшит нагрузки на клиники по длительному хранению нетестированных эмбрионов в условиях жидкого азота (в том числе оплату хранения из личных средств пациентов).

4.3. Решение проблемы бесплодия у пар с невынашиванием беременности в программах ВРТ

На данном этапе исследования было отобрано 290 пар для оценки целесообразности ПГТ для увеличения частоты наступления беременности и родов здоровым ребенком и снижения частоты невынашивания беременности. Следует отметить, что работы по изучению эффективности ВРТ с ПГТ в группе пациенток с невынашиванием беременности были начаты под руководством профессора Н.В. Долгушиной в 2019 г. В нашем исследовании все женщины были моложе 35 лет. Группу с невынашиванием беременности в анамнезе составила 161 пара, у которой было 2 и более прерываний беременности после ЭКО на сроке до 12 недель гестации. Выполняли ПГТ-А у 81 пары, переносили размороженный нетестированный эмбрион 80 женщинам.

В группу без НБ вошли 129 женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия (ТПФ), 62 из них проводилось ПГТ-А, 67 — не проводилось. Расчет эффективности программ ВРТ делали по частоте наступления беременности при переносе размороженного эмбриона во всех группах, поскольку витрификация и последующее размораживание могут влиять на развитие эмбриона и приводить к неразвивающейся беременности. Показано, что при переносе именно размороженного эмбриона частота неразвивающихся беременностей в общей когорте пациентов выше по сравнению с переносом нативного эмбриона. Достоверные причины таких событий до сих пор найти не удалось, однако чаще всего повышение частоты НБ связывают с процессом витрификации.

Все пациентки были сопоставимы по клинико-анамнестическим данным (таблица 5). По всем выделенным параметрам в таблице 5 статистическая значимость $p > 0,05$. В таблице 6 представлены результаты преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии эмбрионов, полученных в программах ВРТ с ПГТ-А.

Таблица 5. Клинико-анамнестические данные пациенток с невынашиванием беременности в анамнезе

	Женщины с НБ с ПГТ-А n=81	Женщины с НБ без ПГТ-А n=129	Женщины без НБ с ПГТ-А n=62	Женщины без НБ без ПГТ-А n=67
Длительность менструации, дней*	4,1±1,2	5,1±2,1	4,3±1,1	4,2±1,4
Продолжительность менструального цикла, сут*	28,7±2,2	28,9±2,3	28,4±2,1	29,2±1,5
НГЭ	11 (13,5%)	23 (17,8%)	10 (16,1%)	10 (14,9%)
Возраст М, лет**	38 (31,0; 42,0)	35 (32,0; 40)	37 (33; 41,0)	36 (31; 40)
Общая концентрация сперматозоидов в 1 мл, млн/мл**	54 (38,0; 81,0)	62,5 (31,0, 82,0)	74 (58,0; 89,0)	74 (58,0; 89,0)
Количество ОКК**	9 (4; 17)	8 (6,0; 11)	10 (5,0; 17,0)	9 (4,0; 14,0)
Количество зигот 2PN**	7 (3,0; 16,0)	6 (2,0; 10,0)	8 (4,0; 16,0)	7 (2,0; 11,0)

*Данные представлены как среднее ±ст.откл

**Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом

Таблица 6. Результаты преимплантационного генетического тестирования у пациентов анализируемых групп

	Женщины с НБ с ПГТ-А n=81	Женщины без НБ с ПГТ-А n=62	p (критерий Хи-квадрат)
Общее число эмбрионов для ПГТ-А	164	189	
Количество эуплоидных эмбрионов, n (%)	73 (44,5%)	82 (43,3%)	p=0,895
Количество анеуплоидных эмбрионов, n (%)	84 (51,2%)	98 (51,8%)	p=0,947
Количество эмбрионов с мозаицизмом, n (%)	7 (4,2%)	9 (4,7%)	p=0,832

Клинические исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ с использованием ПГТ-А и без такового в изучаемых группах проиллюстрированы в таблице 7.

Таблица 7. Клинические результаты лечения бесплодия пациенток анализируемых групп

	Женщины с НБ с ПГТ-А n=81	Женщины с НБ без ПГТ-А n=129	Женщины без НБ с ПГТ-А n=62	Женщины без НБ без ПГТ- А n=67
Частота клинической беременности, n (%)	34/81 (41,9%)	46/129 (35,6%)	24/62 (38,7%)	20/67 (29,8%)
Ранние репродуктивные потери, n (%)	10/34 (29,4%)	19/46 (41,3%)	4/24 (16,6%)	4/20 (20,0%)
Частота живорождения в расчете на перенос эмбриона, n (%)	24/81 (29,6%)	27/129 (20,9%)	20/62 (32,2%)	16/67 (23,8%)

Полученные данные указывают на отсутствие эффекта от проведения преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии пациенткам до 35 лет с невынашиванием беременности в анамнезе ($p=0,285$). Частота генетически нормальных бластоцист в программах ВРТ статистически не различается между пациентками с невынашиванием беременности в анализируемых группах и группах сравнения. Можно говорить о том, что в данной нозологической группе генетическое качество эмбриона не является основной причиной бесплодия. Привычное невынашивание беременности является более широким «синдромом», причины патологии необходимо искать в области иммунологии, рецептивности эндометрия и, возможно, микробиома матки.

4.4. Особенности лечения бесплодия методами ВРТ у женщин молодого возраста с синдромом поликистозных яичников с применением преимплантационного генетического тестирования

На следующем этапе работы оценивались особенности лечения женщин с бесплодием и СПКЯ в программах ВРТ с ПГТ. Всего было проанализировано 244 цикла ВРТ, из них 115 женщин с СПКЯ и 129 пациенток включили в группу сравнения. Все женщины в анализируемых протоколах ВРТ были моложе 35 лет. Пациенток разделили на группы в зависимости от наличия или отсутствия ПГТ-А в программе ВРТ.

Были проанализированы клиничко-анамнестические параметры женщин в группах с ПГТ-А и без. Данные, представленные в таблице 8, показывают, что результаты в набранных группах сопоставимы, существенной разницы между ними не выявлено, кроме числа полученных ооцит-кумулюсных комплексов. Разница в значениях параметра в группе СПКЯ и группе сравнения объяснима паритетом бесплодия.

В таблице 9 представлены результаты преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии у пациенток с СПКЯ и в группе сравнения. Результаты лечения бесплодия методами ВРТ с применением преимплантационного генетического тестирования и без такового показаны в таблице 10.

Полученные результаты свидетельствуют от том, что частота наступления клинической беременности в группах с ПГТ-А у пациенток до 35 лет с СПКЯ и группы сравнения статистически значимо не различалась ($p=0,984$). Частота появления генетически аномальных эмбрионов также статистически значимо не различалась в анализируемых группах ($p=0,638$). Частота наступления беременности в группах с ПГТ-А выше, но данные не являются статистически значимыми ($p=0,499$).

Результаты убедительно показывают отсутствие необходимости проведения преимплантационного генетического тестирования для

повышения эффективности программ лечения бесплодия методами ВРТ у молодых пациенток с СПКЯ.

Таблица 8. Клинические данные женщин в программах ВРТ в анализируемых группах

	Женщины с СПКЯ с ПГТ-А n=59	Женщины с СПКЯ без ПГТ-А n=56	Женщины без СПКЯ с ПГТ-А n=62	Женщины без СПКЯ без ПГТ-А n=67
Возраст M, лет*	36 (29,0; 40,0)	35 (30,0; 39,0)	37 (33; 41,0)	36 (31; 40)
Длительность бесплодия, лет**	5,4±1,2	5,1±1,1	4,2±2,1	4,9±1,8
Общая концентрация сперматозоидов, млн/мл*	64 (35,4; 91,0)	69 (41,0; 82,0)	74 (58,0; 89,0)	74 (58,0; 89,0)
Количество ОКК***	19 (7; 23)	18 (8,0; 26)	10 (5,0; 17,0)	9 (4,0; 14,0)
Количество зигот 2PN*	6 (3,0; 16,0)	7 (2,0; 10,0)	8 (4,0; 16,0)	7 (2,0; 11,0)

* Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом

** Данные представлены как среднее ±ст.откл

***p=0,024 критерий Манна–Уитни.

Таблица 9. Результаты преимплантационного генетического тестирования у пациенток анализируемых групп

	Женщины с СПКЯ с ПГТ-А n=59	Женщины без СПКЯ с ПГТ-А n=62	p (критерий Хи-квадрат)
Общее число эмбрионов для ПГТ-А	112	189	
Количество эуплоидных эмбрионов, n (%)	45 (40,1%)	82 (43,3%)	0,728
Количество анеуплоидных эмбрионов, n (%)	63 (56,2%)	98 (51,8%)	0,686
Количество мозаичных эмбрионов, n (%)	4 (3,5%)	9 (4,7%)	0,638

Таблица 10. Клинические результаты у пациенток анализируемых групп (СПКЯ)

	Женщины с СПКЯ с ПГТ-А n=59	Женщины с СПКЯ без ПГТ-А n=56	Женщины без СПКЯ с ПГТ-А n=62	Женщины без СПКЯ без ПГТ-А n=67
Частота клинической беременности, n (%)	23/59 (38,9%)	17/56 (30,3%)	24/62 (38,7%)	20/67 (29,8%)
Ранние репродуктивные потери, n (%)	3/23 (13,0%)	2/17 (11,7%)	4/24 (16,6%)	4/20 (20,0%)
Частота живорождения в расчете на перенос эмбриона, n (%)	20/59 (33,8%)	15/56 (26,7%)	20/62 (32,2%)	16/67 (23,8%)

4.5. Результаты лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А у пациенток с наружным генитальным эндометриозом в анамнезе

Ввиду большой доли женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения (НГЭ) среди пациенток, обращающихся за проведением преимплантационного генетического тестирования, был выполнен анализ данной когорты больных. Проанализированы и сопоставлены клинические данные 324 пар, обратившихся за лечением бесплодия методами ВРТ.

В группу женщин с НГЭ I и II стадии распространения вошли 113 пациенток, в группу сравнения — 211 пациенток без НГЭ. Каждая группа была разделена на три подгруппы в зависимости от возраста (<35 лет, 35–37 лет, >37 лет), чтобы минимизировать влияние возрастного фактора на результаты исследования. Сравнение одновозрастных групп пациенток позволило получить наиболее объективную оценку влияния НГЭ I и II стадии распространения на частоту анеуплоидии и на этапы программ ВРТ.

В ходе сравнительного анализа двух групп было показано, что среднее количество ОКК, полученных в день ТВП, число зрелых ооцитов и число нормально оплодотворенных ооцитов (зигот 2PN2PB) в группе

женщин с НГЭ I и II стадии распространения было статистически значимо выше, чем аналогичные показатели в группе сравнения, что обусловлено определенными критериями отбора: в группу сравнения вошли женщины как с трубно-перитонеальным фактором (ТПФ), так и с «бедным» ответом на стимуляцию овуляции и низким уровнем АМГ. Стоит отметить, что в группе сравнения большой вклад внесла когорта пациентов позднего репродуктивного возраста (>37 лет, n=103) (таблица 11).

Таблица 11. Клинико-anamнестические характеристики анализируемых групп

	Женщины с НГЭ I и II стадии распространения n=113			Женщины без НГЭ n=211		
	<35	35–37	>37	<35	35–37	>37
Возраст, лет	<35	35–37	>37	<35	35–37	>37
Количество пациенток	79	23	11	62	46	103
Возраст Ж, лет	31 (29; 33)	35 (35; 36)	39 (38,0; 42,0) p=0,009	31 (30,0; 33,0)	36 (35,0; 37,0)	41 (40; 43) p=0,009
Возраст М, лет	33 (31, 37)	38 (34; 41)	43 (41,0; 54,0)	34 (32,0; 37,0)	37 (34,8; 41,3)	43 (38, 47)
Попытка	1 (1, 2) p=0,025	2 (2; 3)	2 (1, 3)	2 (1; 3) p=0,025	2 (1; 3)	2 (1, 3)
Общая концентрация сперматозоидов, млн/мл	60 (33; 85)	66,5 (38,8; 79,0)	63 (46; 81)	56 (26,3; 82,0)	56,5 (29,0; 78,0)	51 (24,0; 85,0)
Прогрессивно подвижные сперматозоиды, %	51 (41, 61)	46 (36,5, 57,5)	52 (46, 57)	48,5 (37,3, 64,0)	55,5 (37,5, 63,5)	47 (34,0, 61,0)
Морфологически нормальные сперматозоиды, %	3 (2, 3)	2 (1,8, 3,0)	2 (1, 3)	2 (1, 2)	2 (2, 3)	2 (1, 3)
Количество ОКК	12 (7, 17)	7 (6, 10)	4 (3, 8)	10,5 (7,8, 16,0)	7 (4,8, 12,0)	5 (2,0, 9,0)
Частота зрелости ооцитов, %	82,35 (71,4, 100)	77,78 (65,8, 85,71)	100 (100, 100)	77,78 (70,24, 96,25)	80 (74,1, 100)	90,91 (75, 100)
Частота оплодотворения, %	87,5 (80,0, 100)	100 (80, 100)	100 (72,6, 100)	90,0 (77,56, 100)	100 (83,33, 100)	100 (83,33, 100)

Количество программ ВРТ статистически значимо больше у пациенток в группе без НГЭ I и II стадии распространения по сравнению с группой с НГЭ I и II стадии распространения в подгруппе пациенток моложе 35 лет. У партнеров пациенток с НГЭ I и II стадии распространения моложе 35 лет анализ показателей эякулята в день ТВП показал, что процент морфологически нормальных сперматозоидов был ниже, чем в группе сравнения (2% против 3%) ($p=0,001$). В отношении других характеристик эякулята не было выявлено статистически значимых различий. Сравнительный анализ эмбриологического этапа показал сходные параметры по количеству полученных ОКК и зрелых ооцитов, а также частоте оплодотворения между сопоставимыми по возрасту подгруппами женщин как в группе с НГЭ I и II стадии распространения, так и в группе без НГЭ I и II стадии распространения.

В группе женщин без НГЭ I и II стадии распространения частота анеуплоидии составила 52,9% (283/535) против 47,8% (160/335) в группе с НГЭ, что не имеет статистически значимой разницы (таблица 12). Аналогичные результаты были получены при сравнении одновозрастных подгрупп пациенток. Однако стоит отметить, что частота анеуплоидии среди пациенток с НГЭ I и II стадии распространения в подгруппах <35 и 35 – 37 лет была выше, чем в аналогичных по возрасту подгруппах женщин группы сравнения: 42,4% и 61% против 31,8% и 47,2% соответственно. Таким образом, статистически значимых различий при сравнении анализируемых характеристик между двумя сопоставимыми по возрасту подгруппами двух анализируемых групп не было выявлено ($p>0,05$) (критерий Хи-квадрат).

Частота имплантации в группе с НГЭ составила 49,3% (34/69), что было сопоставимо с аналогичным показателем в группе сравнения — 46,9% (45/96).

Таблица 12. Частота анеуплоидных, эуплоидных, мозаичных эмбрионов в анализируемых группах, сопоставимых по возрасту

	Женщины с НГЭ I и II стадии распространения с ПГТ, n=113			Женщины без НГЭ I и II стадии распространения с ПГТ, n=211		
	<35	35–37	>37	<35	35–37	>37
Возраст Ж, лет	<35	35–37	>37	<35	35–37	>37
Общее число эмбрионов для ПГТ-А	250	59	26	192	125	218
Кол-во эуплоидных эмбрионов, n (%)	127 (50,8%)	20 (33,9%)	8 (30,8%)	113 (58,9 %)	59 (47,2%)	48 (22,0%)
Кол-во анеуплоидных эмбрионов, n (%)	106 (42,4%)	36 (61,0%)	18 (69,2%)	61 (31,8%)	59 (47,2%)	163 (74,8%)
Кол-во эмбрионов с мозаицизмом, n (%)	17 (6,8%)	3 (5,1%)	0 (0%)	18 (9,4%)	7 (5,6%)	7 (3,2%)

В группе с НГЭ I и II стадии распространения было описано 2 случая неразвивающейся беременности и 1 случай внематочной беременности. В группе сравнения было 2 случая самопроизвольного прерывания беременности на ранних сроках. Частота живорождения в группе женщин с НГЭ составила 46,4%, в том числе одна двойня, а в группе сравнения данный показатель составил 44,8%. Статистически значимых различий при сравнении анализируемых характеристик между двумя сопоставимыми по возрасту подгруппами двух анализируемых групп не было выявлено ($p>0,05$) (критерий Хи–квадрат) (таблица 13).

Таблица 13. Клинические исходы программ ВРТ с применением ПГТ-А

	Женщины с НГЭ I и II стадии распространения с ПГТ-А			Женщины без НГЭ I и II стадии распространения с ПГТ-А		
	<35	35–37	>37	<35	35–37	>37
Возраст Ж, лет	<35	35–37	>37	<35	35–37	>37
Число перенесенных эмбрионов	54	10	5	38	28	30
Частота клинической беременности, %	28 (51,9%)	6 (60%)	0	19 (50%)	13 (46,4%)	13 (43,3%)
Частота живорождения, %	25 (46,3%)	7 (70%)	0	18 (47,4%)	13 (46,4%)	12 (40%)

Таким образом, проведенное исследование женщин с НГЭ I и II стадии распространения, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ, показывает отсутствие необходимости проведения ПГТ у таких пар, если единственная причина бесплодия — НГЭ I и II стадии распространения у женщины. При наличии в анамнезе других причин бесплодия такая тактика ведения пациенток с НГЭ I и II стадии распространения является некорректной. Сам по себе НГЭ I и II стадии распространения не увеличивает частоту появления анеуплоидных эмбрионов, статистически значимо не снижает частоту оплодотворения, дробления и частоту бластуляции на эмбриологическом этапе программ ВРТ. Однако данное заключение относится к женщинам до 35 лет. НГЭ I и II стадии распространения, усугубляющийся поздним репродуктивным возрастом, повышает частоту анеуплоидий, и таким пациенткам рекомендовано проведение ПГТ для снижения риска рождения детей с хромосомными нарушениями.

4.6. Результаты лечения бесплодия методами ВРТ у пар с различными типами нарушений сперматогенеза

Для определения степени влияния возраста партнера на эффективность эмбриологического этапа программ ВРТ было проанализировано 2225 пар, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ. Возраст женщин >35 лет был критерием исключения. Сформированы две группы: 1 918 программ с возрастом мужчин ≤ 40 лет и 307 программ с возрастом мужчин >40 лет. Клинико-анамнестические характеристики женщин не различались между группами (таблица 14).

В результате сравнения характеристик эмбриологического этапа не были выявлены статистически значимые различия в группах мужчин разного возраста: частота оплодотворения – 100,0% (80,0%; 100,0%) в группе мужчин до 40 лет против 92,3% (75,0%; 100,0%) в группе мужчин старше 40 лет; частота бластуляции – 50,0% (33,3%; 75,0%) в группе мужчин до 40 лет

против 50,0% (33,3%; 75,0%) в группе мужчин старше 40 лет), таким образом, данные показатели в анализируемых группах не имели статистически значимых различий (таблица 15).

Таблица 14. Клинико-anamнестические характеристики женщин при оценке влияния возраста мужчины на эффективность программ ВРТ

Показатели женского здоровья	Мужчины до 40 лет n=1918 цикла	Мужчины старше 40 лет n=307 циклов	p, t-тест
Длительность менструации, дней	4,6±1,8	4,9±2,1	0,913
Продолжительность менструального цикла, сут	28,7±2,2	28,9±2,3	0,949
НГЭ	505 (26,3%)	91 (29,6%)	0,224
СПКЯ	97 (5,05%)	10 (3,25%)	0,172
Резекция яичников в анамнезе	345 (17,9%)	68 (22,1%)	0,082
Тубэктомия	460 (23,9%)	79 (25,7%)	0,507

Таблица 15. Характеристика эмбриологического этапа ВРТ в группах мужчин разного возраста

Показатель эмбриологического этапа программ ВРТ	Мужчины до 40 лет n=1918 циклов	Мужчины старше 40 лет n=307 циклов	p (U-критерий Манна – Уитни)
Число ооцит-кумулюсных комплексов	8,0 (4,0; 13,0)	6,0 (4,0; 11,0)	0,142
Зрелые ооциты (стадия МII)	6,0 (4,0; 10,0)	5,0 (4,0; 9,0)	0,106
Частота оплодотворения, %	100,0 (80,0; 100,0)	92,3 (75,0; 100,0)	0,356
Частота бластуляции, %	50,0 (33,3; 75,0)	50,0 (33,3; 75,0)	0,597

Результаты, полученные на данном этапе, указывают на отсутствие влияния возраста мужчины в изучаемом диапазоне (до 48 лет) на такие показатели эмбриологического этапа программ ВРТ, как частота оплодотворения и частота формирования бластоцист, при условии возраста женщины меньше 35 лет. В парах, где возраст мужчин был старше 40 лет, статистически значимое увеличение числа получаемых ооцит-кумулюсных

комплексов у женщин ожидаемо, так как с большей частотой у женщин данной группы встречалась резекция яичников в анамнезе.

Для оценки влияния возраста мужчины на частоту анеуплоидий были проанализированы программы лечения бесплодия с переносом размороженного генетически нормального эмбриона (ПГТ-А), всего 341 цикл, суммарно 1022 эмбриона. Были исключены программы без переноса эмбриона (деградация эмбриона после размораживания, тотальная анеуплоидия, неудовлетворительное качество эндометрия). Когорта пациентов была разделена на 2 группы: мужчины до 40 лет и старше 40 лет. В группе мужчин до 40 (n=271) средний возраст мужчин составил 34 года (32; 36), средний возраст женщин 32 года (29; 34). В группе мужчин старше 40 (n=70) средний возраст мужчин составил 44 года (42; 48), средний возраст женщин — 33 года (31; 34).

Сравнение характеристик эмбриологического этапа не выявило статистически значимых различий в группах мужчин разного возраста: частота оплодотворения – 88,9% (77,8%; 100,0%) в группе мужчин до 40 лет против 87,5% (75,0%; 100,0%) в группе мужчин старше 40 лет; частота бластуляции – 50,0% (33,3%; 66,7%) в группе мужчин до 40 лет против 42,9% (26,7%; 66,7%) в группе мужчин старше 40 лет (таблица 16).

Таблица 16. Характеристика эмбриологического этапа циклов ВРТ с ПГТ-А в группах мужчин разного возраста.

Показатель эмбриологического этапа программы ВРТ	Мужчины до 40 лет, n=271 цикл	Мужчины старше 40 лет, n=70 циклов	p (U-критерий Манна – Уитни)
Число ооцит-кумулюсных комплексов	11,0 (7,0; 15,0)	8,0 (5,0; 13,3)	0,094
Зрелые ооциты на стадии МII	9,0 (6,0; 12,0)	7,5 (4,0; 12,0)	0,235
Частота оплодотворения, %	88,9 (77,8; 100,0)	87,5 (75,0; 100,0)	0,971
Частота бластуляции, %	50,0 (33,3; 66,7)	42,9 (26,7; 66,7)	0,307

Анализ частоты эуплоидных, анеуплоидных и мозаичных эмбрионов в группах мужчин до 40 лет и старше 40 лет показал отсутствие влияния возрастного фактора на генетический статус эмбриона: частота получения эуплоидных эмбрионов в группе мужчин до 40 лет составила 422/829 (50,9%), а в группе мужчин старше 40 лет – 91/193 (47,2%) (таблица 17). Наблюдалась тенденция к повышению числа генетически нормальных эмбрионов только у более молодых отцов. Частота получения мозаичных эмбрионов также значимо не отличалась между группами мужчин до 40 лет и старше 40 лет: 56/829 (6,8%) против 14/193 (7,2%) соответственно.

Таблица 17. Частота получения эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов в группах мужчин разного возраста

	Мужчины до 40 лет, n=829	Мужчины старше 40 лет, n=193	p (критерий Хи-квадрат)
Анеуплоидные эмбрионы, n (%)	351 (42,3%)	88 (45,6%)	0,411
Эуплоидные эмбрионы, n (%)	422 (50,9%)	91 (47,2%)	0,348
Мозаичные эмбрионы, n (%)	56 (6,8%)	14 (7,2%)	0,594

Принимая во внимание отсутствие значимого влияния возраста мужчины на эффективность эмбриологического этапа программ ВРТ в парах с женщиной до 35 лет, было решено оценить количественные характеристики эякулята и их влияние на процесс лечения бесплодия методами ВРТ, для чего были выделены 5 групп. Клинико-anamнестические характеристики женщин в данных группах показаны в таблице 18. Группы не отличались по сравниваемым показателям женского здоровья между собой.

При анализе клинических и эмбриологических параметров было выявлено отсутствие зависимости показателей спермограммы от возраста мужчины. Анализ числа ОКК и зрелых ооцитов между группами не выявил статистически значимых различий в стимуляции пациенток (таблица 18). При сравнении показателей эмбриологического этапа в группах с разной

патологией сперматогенеза при помощи критерия Крускала–Уоллиса было отмечено наличие статистически значимых различий между группами в отношении частоты оплодотворения и частоты бластуляции. Чтобы уточнить, между какими именно группами имеются различия, было выполнено попарное сравнение анализируемых групп с контрольной группой с помощью критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони.

Таблица 18. Клинико-anamнестические показатели женского здоровья в анализируемых группах в зависимости от показателей спермограммы

Показатели женского здоровья	ОАТ, n=214	Биопсия яичка, n=105	0–2%Т, n=1061	3%Т, n=588	Нормозооспермия, n=257
Длительность менструации, дней*	4,1±1,2	4,5±2,1	4,5±1,3	4,2±2,0	4,6±1,1
Длительность менструального цикла, суток*	29,0±1,1	28,4±1,6	28,4±1,1	28,9±1,3	28,9±1,5
НГЭ**	68 (31,1%)	35 (33,3%)	310 (29,2%)	176 (29,9%)	79 (30,7%)
СПКЯ**	10 (4,6%)	7 (6,6%)	53 (4,9%)	31 (5,2%)	12 (4,6%)
Резекция яичников в анамнезе**	38 (17,7%)	18 (17,1%)	196 (18,4%)	111 (18,8%)	40 (15,5%)
Тубэктомия**	30 (14,0%)	18 (17,1%)	204 (19,2%)	110 (18,7%)	50 (19,4%)

*Данные представлены как среднее ±ст.откл.

**Данные представлены в абсолютных единицах и в %

При сравнении всех анализируемых групп с помощью критерия Крускала–Уоллиса $p < 0,05$.

Были выявлены статистически значимые различия по частоте бластуляции между группой ОАТ и контрольной группой ($p=0,007$), а также группой с морфологией 0–2% и контрольной группой ($p=0,005$). Таким образом, в группах мужчин с ОАТ и в группе с показателями морфологии сперматозоидов 0–2% выявлено статистически значимое снижение частоты бластуляции по сравнению с контрольной группой. При попарном сравнении показателей частоты оплодотворения в группах с разными показателями

спермограммы и в контрольной группе не была преодолена величина нового критического уровня значимости $p=0,0125$.

Однако стоит отметить, что частота оплодотворения в группах ОАТ и при биопсии яичка в среднем была ниже, чем в группах с морфологией сперматозоидов 0–2% и 3% (таблица 19). Возможно, ввиду недостаточного количества наблюдений в группах различия не достигли уровня статистической значимости, но тенденция была отмечена.

Таблица 19. Характеристика эмбриологического этапа в группах с разными показателями спермограммы

	ОАТ, n=214	Биопсия яичка, n=105	0–2%Т, n=1061	3%Т, n=588	Нормозоо спермия, n=257	Р (критерий Крускала – Уоллиса)
Средний возраст мужчины, (искл. циклы с донорской спермой), n=2138	34,0 (32,0; 39,0)	35,0 (30,0; 40,0)	34,0 (32,0; 38,0)	34,0 (31,0; 38,0)	34,0 (31,0; 37,0)	0,057
ОКК	9,0 (4,8; 13,0)	8,0 (4,0; 13,0)	8,0 (4,0; 12,0)	7,0 (4,0; 12,0)	8,0 (4,0; 13,5)	0,161
Зрелые ооциты	7,0 (4,0; 10,0)	6,0 (3,5; 11,0)	6,0 (4,0; 10,0)	6,0 (4,0; 9,0)	6,0 (4,0; 11,0)	0,170
Частота оплодотворе- ния, %	90,0 (76,9; 100,0)	88,9 (66,7;100,)	100,0 (80,0;100,)	100,0 (80,0;100,)	92,3 (75,0;100,)	0,030
Частота бластуляции, %	50,0% ** (33,3; 66,7)	50,0% (33,3; 81,7)	50,0% (33,3; 71,4)	50,0% (33,3; 75,0)	60,0% ** (36,0; 77,8)	0,043
Отмена ЕТ по причине остановки эмбрионов в развитии, %	22 (10,2%)	13 (11,4% ***)	73 (6,9%)	42 (7,1%)	15 (5,8% ***)	*** χ^2 -тест p=0,037

* $p=0,005$ при сравнении группы пациентов с морфологией сперматозоидов 0-2% и группы пациентов с нормозооспермией;

** $p=0,007$ при сравнении группы пациентов с ОАТ и группы пациентов с нормозооспермией.

*** данные при сравнении с группой нормозооспермия, χ^2 -тест

Как показывают результаты данного исследования, показатели эмбриологического этапа зависят от вида нарушений сперматогенеза у мужчины. Частота формирования бластоцист значимо ниже в группах с олигоастенотератозооспермией и при оплодотворении сперматозоидами, полученными при биопсии яичка. Также получены статистически значимые результаты по числу отмен переноса по причине неудовлетворительного качества эмбриона на 5-е и 6-е сутки культивирования. При тяжелых формах мужского бесплодия в среднем в 10% случаев можно ожидать прекращения цикла лечения на эмбриологическом этапе из-за остановки эмбрионов на стадии делений дробления. Данное обстоятельство необходимо учитывать при консультировании пациентов, вступающих в программы лечения бесплодия методами ВРТ, с выраженным фактором мужского бесплодия. На рисунке 16 показаны относительные риски прекращения развития эмбриона при различных показателях эякулята в программах лечения бесплодия методами ВРТ.

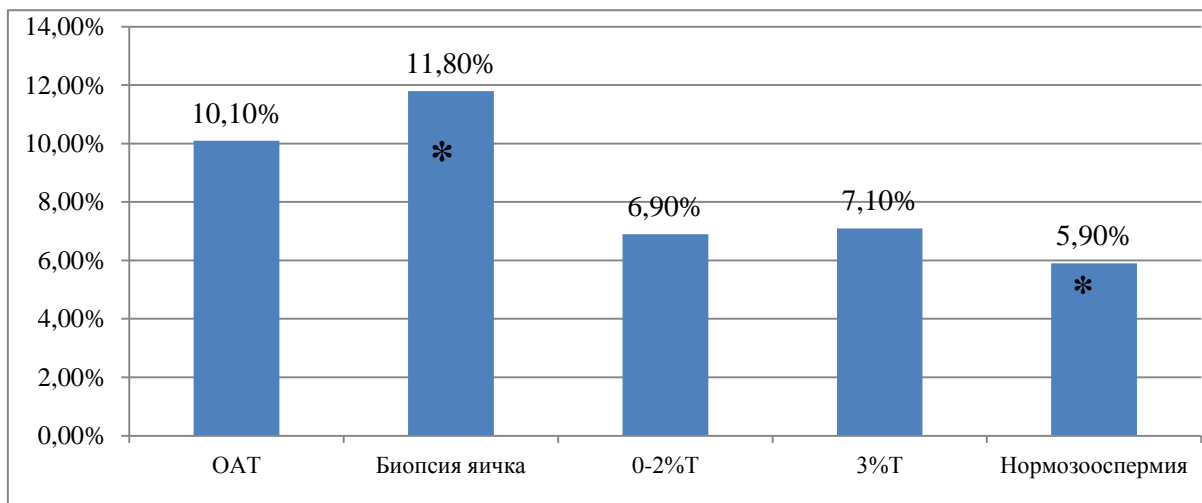


Рис. 16. Частота отмены переноса эмбрионов и завершение цикла лечения бесплодия методами ВРТ по причине неудовлетворительного качества полученных эмбрионов (остановка на стадии делений дробления, * $p < 0,05$)

Принимая во внимание отсутствие влияния возраста мужчины на частоту анеуплоидий в когорте получаемых эмбрионов, мы решили оценить влияние тяжелых нарушений сперматогенеза (группа с ОАТ и с биопсией

яичка) и других характеристик эякулята (морфология сперматозоидов 0–2% и 3%) на частоту анеуплоидий в циклах ВРТ с ПГТ-А. Структура мужской патологии на основании показателей спермограммы не отличалась в группах мужчин до 40 лет и старше 40 лет: группа ОАТ 34/271 (12,5%) против 11/70 (15,7%), группа с морфологией 0–2% 144/271 (53,1%) против 32/70 (45,7%), группа с морфологией 3% 69/271 (25,5%) против 20/70 (28,6%), группа сравнения 20/271 (7,4%) против 3/70 (4,3%) соответственно (таблица 20). Пациенты с биопсией яичка чаще встречались в группе мужчин старше 40 лет, по сравнению с группой мужчин до 40 лет: 4/70 (5,7%) против 4/271 (1,5%) соответственно ($p=0,037$).

Таблица 20. Структура патологии сперматогенеза в циклах ВРТ с ПГТ-А в группах мужчин разного возраста

Нарушение сперматогенеза, n (%)	Мужчины до 40 лет, n=271 цикл	Мужчины старше 40 лет, n=70 циклов	p (критерий Хи-квадрат)
ОАТ	34 (12,5%)	11 (15,7%)	0,486
Биопсия яичка	4 (1,5%)	4 (5,7%)	0,037 ОШ 4,045 ДИ [0,986, 16,601]
0–2%Т	144 (53,1%)	32 (45,7%)	0,268
3%Т	69 (25,5%)	20 (28,6%)	0,598
Нормозооспермия	20 (7,4%)	3 (4,3%)	0,358

Для определения степени влияния нарушений сперматогенеза на генетический статус эмбриона в программах ВРТ были проанализированы программы с ПГТ-А. Всего проанализировано 1022 эмбриона после преимплантационного генетического тестирования в группах пациентов с разными параметрами спермограммы. Ввиду малочисленности групп выраженный мужской фактор бесплодия суммировался. Показано, что частота получения анеуплоидных и эуплоидных эмбрионов, которые оценивались методом высокопроизводительного секвенирования, зависит от структуры мужской патологии (таблица 21). Выявлено статистически

значимое увеличение числа анеуплоидных эмбрионов при оплодотворении сперматозоидами, полученными при биопсии яичка, а также при единичных мужских половых клетках в эякуляте. Было показано, что частота получения мозаичных эмбрионов значимо отличалась в сравниваемых группах: от 6/155 (3,9%) в группе с выраженным фактором мужского бесплодия до 9/73 (12,3%) в группе сравнения с нормальными параметрами спермограммы ($p=0,022$).

Таблица 21. Частота получения эуплоидных, анеуплоидных и мозаичных эмбрионов в группах мужчин с разными параметрами спермограммы

	ОАТ и Биопсия яичка, n=155	0–2%Т, n=517	3%Т, n=277	Нормозооспермия, n=73	p (критерий Хи-квадрат)
Анеуплоидные эмбрионы, n (%)	81 (52,3%)	215 (41,6%)	129 (46,6%)	27 (37,0%)	0,032
Эуплоидные эмбрионы, n (%)	68 (43,9%)	273 (52,8%)	122 (44,0%)	37 (50,7%)	0,118
Мозаичные эмбрионы, n (%)	6 (3,9%)	29 (5,6%)	26 (9,4%)	9 (12,3%)	0,022

На следующем этапе были оценены исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ с учетом возраста партнера и тяжести нарушений сперматогенеза. Всего было выполнено 1169 переносов эмбриона в полость матки, при этом учитывали переносы нативных эмбрионов. Результаты показаны в таблице 22. Данные свидетельствуют о том, что частота наступления беременности зависит от вида нарушений сперматогенеза и наблюдается тенденция к увеличению данного показателя при улучшении характеристик сперматогенеза. Ранние репродуктивные потери оказались статистически значимо выше при оплодотворении сперматозоидами, полученными при биопсии яичка.

Таблица 22. Исходы программ ВРТ без ПГТ при переносе 1 нативного эмбриона в полость матки в цикле стимуляции в группах мужчин с разными показателями спермограммы

	ОАТ, n=107	Биопсия яичка, n=38	0–2%Т, n=554	3%Т, n=299	Нормозооспермия, n=151	Р (критерий Хи- квадрат)
Клиническая беременность	45 (42,1%)	11 (28,9%)	216 (39,0%)	115 (38,5%)	57 (37,7%)	p>0,05
Ранние потери (до 12 недель гестации)	7 (15,6%)	5* (36,3%)	33 (15,3%)	27 (23,5%)	10* (17,5%)	*0,041
Роды	31 (28,9%)	6* (10,5%)	153 (27,6%)	76 (25,4%)	47** (31,1%)	**0,0411

Для оценки вклада процесса витрификации и размораживания и для корректного сравнения циклов был проведен анализ эффективности программ ВРТ без ПГТ-А при переносе размороженного эмбриона при различных показателях спермограммы у мужчин. Результаты показаны в таблице 23. Сравнение исходов программ ВРТ в циклах стимуляции при переносе нативного эмбриона с исходами в криопротоколах без ПГТ-А показало увеличение частоты наступления беременности для всех групп пациентов. Частота наступления беременности у пар только с тератозооспермией (0–2%Т и 3%Т) была статистически значимо выше при переносе эмбриона в нативном цикле ЭКО. Частота ранних репродуктивных потерь достоверно повышалась в группе с выраженным фактором мужского бесплодия (сперматозоиды, выделенные из ткани яичка) по сравнению с группой мужчин с нормозооспермией при переносе эмбриона без проведения ПГТ. На рисунке 17 показана частота родов здоровым ребенком при различных нарушениях сперматогенеза. Данные показывают, что по сравнению с группой мужчин с нормозооспермией частота родов была значительно ниже в группе с тяжелыми нарушениями сперматогенеза. Именно поэтому в исследовании проанализированы репродуктивные исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ с применением

преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии, чтобы выяснить, можно ли улучшить эффективность лечения бесплодия пар с нарушениями сперматогенеза с помощью ПГТ. Результаты показаны в таблице 24.

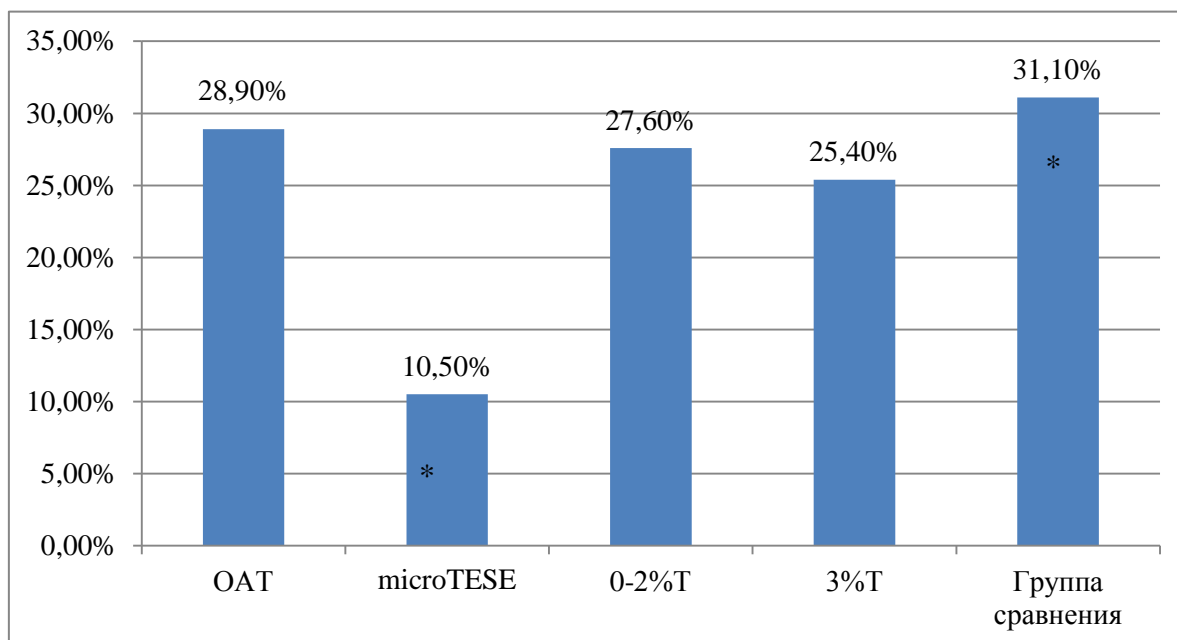


Рис. 17. Частота родов в расчете на цикл 1 нативного эмбриона в циклах лечения бесплодия без ПГТ при разных показателях эякулята у мужчин в день оплодотворения (* $p < 0,05$)

Таблица 23. Исходы программ ВРТ при переносе 1 размороженного эмбриона в полость матки в криоцикле без ПГТ-А в группах мужчин с разными нарушениями сперматогенеза

	OAT, n=47	Биопсия яичка, n=21	0-2%T, n=211	3%T, n=132	Нормо- зооспермия, n=68	р (критерий Хи- квадрат)
Клиническая беременность	11 (23,6%)	4 (19,7%)	61 (21,9%)	34 (23,8%)	33 (29,5%)	0,601
Ранние потери (до 12 недель гестации)	3 (31,3%)	2 (50%)	15 (31,6%)	8 (31,5%)	5 (17,1%)	0,886
Роды	8 (17,5%)	2 (11,3%)	46 (24,1%)	26 (17,1%)	18 (27,7%)	0,125

Таблица 24. Исходы программ ВРТ без ПГТ-А при переносе 1 зуплоидного эмбриона в полость матки в криоцикле в группах мужчин с разными показателями спермограммы

	ОАТ, n=29	microTESE, n=17	0–2%Т, n=116	3%Т, n=55	Группа сравнения, n=23	р (критерий Хи- квадрат)
Клиническая беременность	13 (44,8%)	6 (30,7%)	33 (28,9%)	14 (25,8%)	11 (48,5%)	0,921
Ранние репродуктивные потери, до 12 недели гестации	4 (31,3%)	2 (50,0%)	6 (24,6%)	3 (23,5%)	2 (15,1%)	0,482
Роды	7 (25,5%)	3 (17,0%)	25 (21,8%)	11 (19,6%)	9 (39,7%)	0,688

При сравнении исходов программ ВРТ в протоколах с переносом размороженного эмбриона с проведением генетического тестирования на анеуплоидии и без ПГТ-А было отмечено увеличение частоты наступления беременности при переносе зуплоидного эмбриона, снижение числа ранних потерь беременности, а также увеличение частоты родов, что обусловлено переносом генетически нормального эмбриона по результатам скрининга.

Таким образом, репродуктивные исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ у пар, в которых у мужчины выявлено нарушение морфологии сперматозоидов, значительно хуже по сравнению с группой мужчин с нормозооспермией. В группах тератозооспермии с морфологией сперматозоидов в день оплодотворения 0–2% и 3% почти в 2 раза ниже частота наступления беременности и частота родов при переносе эмбриона без преимплантационного генетического тестирования вне зависимости от возраста мужчин.

4.7. Эффективность лечения бесплодия методами ВРТ с применением преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии пациентов с хромосомными аномалиями в кариотипе

В рамках настоящей работы проанализировались программы лечения бесплодия методами ВРТ 54 пары, где у одного из пациентов по данным

цитогенетического кариотипирования были обнаружены структурные перестройки хромосом. Возраст женщин составлял от 28 до 42 лет. В зависимости от вида транслокации пары поделили на группы с робертсоновской и реципрокной хромосомной аномалией. Определялись частота и структура хромосомной патологии у эмбрионов в зависимости от пола носителя хромосомной aberrации в семье. Стимуляцию функции яичников проводили согласно стандартным протоколам в зависимости от гормонального профиля и индивидуальных особенностей женщины. Всего было проведено 65 циклов стимуляции функции яичников, остальные эмбрионы получены в естественных менструальных циклах. Пробиопсированы и отданы на генетическое тестирование 236 бластоцист. Анализ результата секвенирования показал, что из 236 эмбрионов 51 имел нормальный молекулярный кариотип, у 153 была выявлена хромосомная патология (рисунок 18). Частота и структура хромосомной патологии рассматривались в работе ранее (см. таблица 20 и 21). Парное сравнение исследуемых групп показало, что частота эмбрионов с патологией была статистически выше у пациентов с реципрокными транслокациями в кариотипе (таблица 25).

Следует отметить, что процент эмбрионов с анеуплоидией хромосом, не вовлеченных в транслокацию, также был статистически выше у пациентов с реципрокными транслокациями в кариотипе. В группе пациентов с реципрокными транслокациями, где носителем транслокации являлся мужчина, количество эмбрионов с несбалансированным кариотипом и мозаицизмом было статистически выше, чего не отмечалось в группе с робертсоновскими транслокациями.

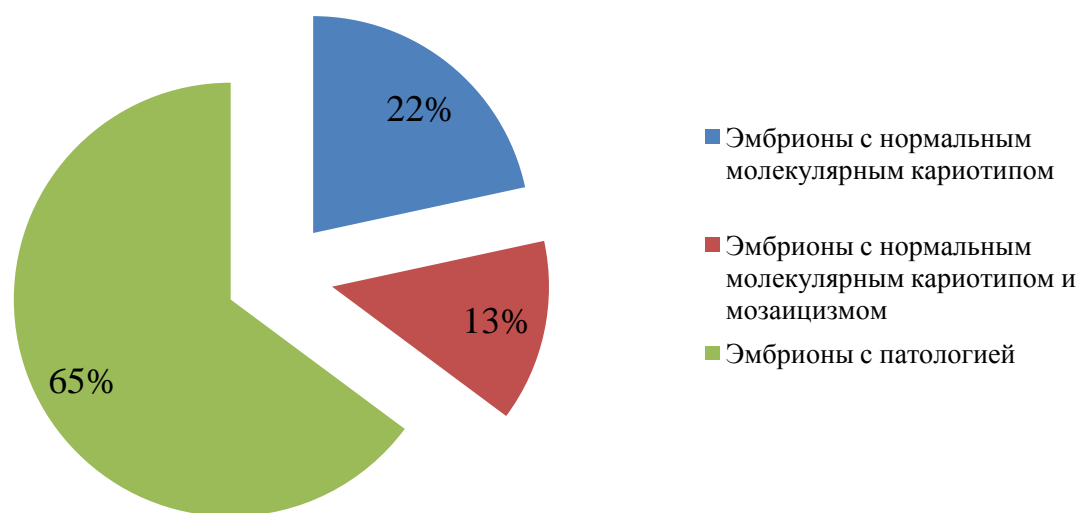


Рис. 18. Структура хромосомных нарушений в преимплантационных эмбрионах у пар с нарушениями кариотипа в программах ВРТ

Таблица 25. Результаты ПГТ-А и ПГТ-СП у пар с хромосомной транслокацией у одного из партнеров

Вид транслокации	Носитель транслокации	Группы	Возраст женщины, лет	Кол-во циклов ВРТ	Эмбрионы с нормальным молекулярным кариотипом	Эмбрионы с нормальным молекулярным кариотипом и мозаицизмом	Эмбрионы с патологией
Реци-прокная, n=28	М, n=17	1	32,00±0,8	20	11	5	56
	Ж, n=11	2	33,69±1,1	13	8	5	37
Роберт-соновская, n=26	М, n=16	3	35,06±1,1	68	19	13	34
	Ж, n=10	4	34,31±1,1	50	13	9	26

Процент эмбрионов с анеуплоидией хромосом, не вовлеченных в транслокацию, был статистически выше у пар с робертсоновскими транслокациями в кариотипе, что совпадает с данными других исследователей, показавших, что соотношение спорадических анеуплоидий и анеуплоидий, связанных с хромосомами, вовлеченными в транслокацию, 50 на 50%.

У пар с реципрокными транслокациями выявлена статистически значимая зависимость количества эмбрионов с несбалансированным кариотипом и мозаицизмом от пола носителя транслокации, чего не отмечалось в группе с робертсоновскими транслокациями (таблицы 27, 28).

Таблица 26. Структура хромосомной патологии, выявленной при ПГТ-А и ПГТ-СП у пар, с хромосомной транслокацией у одного из партнеров

Вид транслокации	Носитель транслокации	Несбалансированные эмбрионы	Несбалансированные эмбрионы с мозаицизмом	Эмбрионы с анеупloidией хромосом, вовлеченных в транслокацию	Эмбрионы несбалансированные и с анеупloidией	Другая патология
Реципрокна	М	24	5	11	14	2
	Ж	17	11	4	5	0
Робертсоновская	М	10	1	16	5	2
	Ж	10	0	11	5	0

Таблица 27. Статистическая значимость различий между группами сравнения, р

Группа (табл. 25)	Эмбрионы с нормальным молекулярным кариотипом	Эмбрионы с нормальным молекулярным кариотипом и мозаицизмом	Эмбрионы с патологией	Несбалансированные эмбрионы	Несбалансированные эмбрионы с мозаицизмом	Эмбрионы с анеупloidией, не вовлеченных в транслокацию	Эмбрионы несбалансированные и с анеупloidией	Другая патология
1	0,55353	0,388	0,3929	0,47	0,011	0,2	0,139	0,36
2	0,0429	0,0238	0,0011	0,146	0,26	0,0063	0,187	0,487
3	0,1377	0,1718	0,0328	0,37	0,0014	0,0049	0,392	-
4	0,5064	0,5483	0,4644	0,32	0,567	0,459	0,449	0,3169

Существующие на сегодняшний день современные диагностические морфокинетические предикторы не отражают генетического статуса

эмбриона. Только новые молекулярно-генетические методы исследования позволяют изменить известные представления о нарушении репродуктивной функции: о возможных причинах бесплодия, о плохих результатах эмбриологического этапа программ ВРТ, о причинах остановки развития беременности.

Пациенты с изменениями в кариотипе представляют собой одну из самых сложных групп, получающих лечение методами ВРТ. Женщины из этих пар часто имеют тяжелый отягощенный анамнез: самопроизвольные выкидыши, неразвивающиеся беременности на различных сроках, патологические изменения эндометрия и т.д. Включая их в программы ВРТ, врачи сталкиваются с проблемами не только генетическими, но и гинекологическими.

На базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В.Леонова выполнено 44 переноса генетически нормальных эмбрионов (перенос одного эмбриона в полость матки) у пар с аномалиями кариотипа. Беременность наступила в 18 случаях (40,9%), частота живорождения составила 88,8% (16 случаев рождения здоровых детей, в двух случаях произошел самопроизвольный выкидыш до 12 недель гестации). Частота наступления беременности была сравнима с группой переноса ПГТ-А у пациентов с другими причинами бесплодия. Таким образом, результаты диссертационной работы убедительно доказывают высокую эффективность лечения бесплодия у пар с нарушениями кариотипа в программах ВРТ с использованием ПГТ-А и ПГТ-СП, а также возможность использования собственных гамет у мужчин и женщин с нарушениями кариотипа для снижения репродуктивных потерь и рождения здоровых детей.

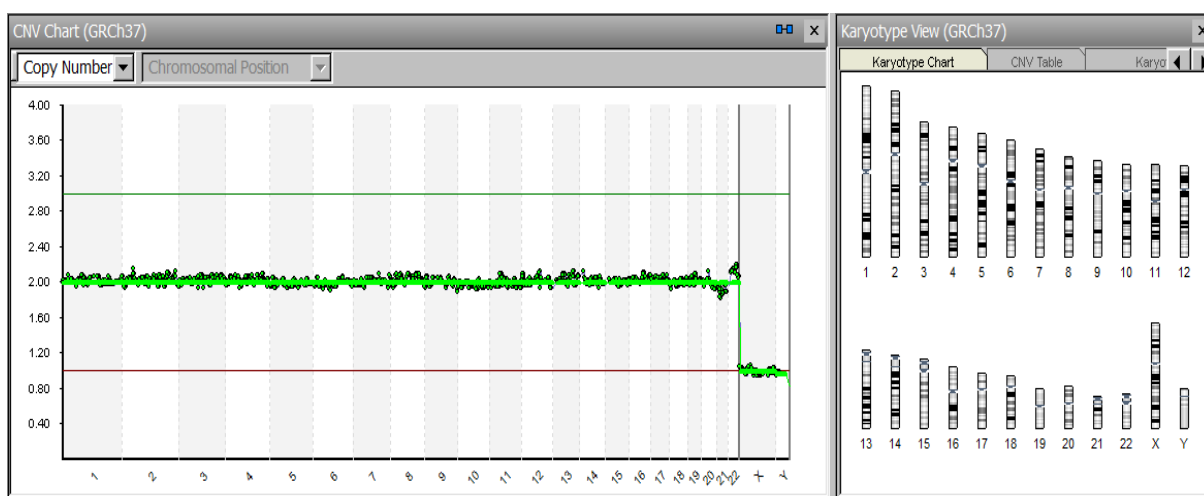
Клинический случай 1. Программа ВРТ с ПГТ у женщины с редкой хромосомной перестройкой: инсерция и инверсия хромосом одновременно, 46,XX,ins(13;4)(q34;p14p15.3),inv(4)(p14q12)

Пациентка З., 37 лет, в 2020 г. обратилась с жалобами на отсутствие наступления беременности в течение 5 лет регулярной половой жизни без контрацепции. Из анамнеза: менструации с 17 лет, цикл регулярный, по 5 дней через 26 дней, без особенностей. В 2015 г. была проведена лапароскопия с резекцией правого яичника по поводу эндометриоидной кисты. У женщины выявлены бронхоэктатическая болезнь и желудочковая экстрасистолия, гипотиреоз. При цитогенетическом анализе кариотипа пациентки выявили изменения в виде инсерции и инверсии одновременно: 46,XX,ins(13;4)(q34;p14p15.3),inv(4)(p14q12). Наследственность не отягощена. Кариотип родителей женщины и родного брата в норме. Муж, 44 года, соматически здоров, детей нет. Показатели спермограммы у мужа: объем 3 мл; концентрация сперматозоидов 30 млн./мл; подвижных сперматозоидов 82%; морфологически нормальных форм 4%. Брак у обоих супругов первый, неродственный. Пациенты изъявили желание пройти лечение с использованием программы ВРТ с ПГТ-СП методом NGS.

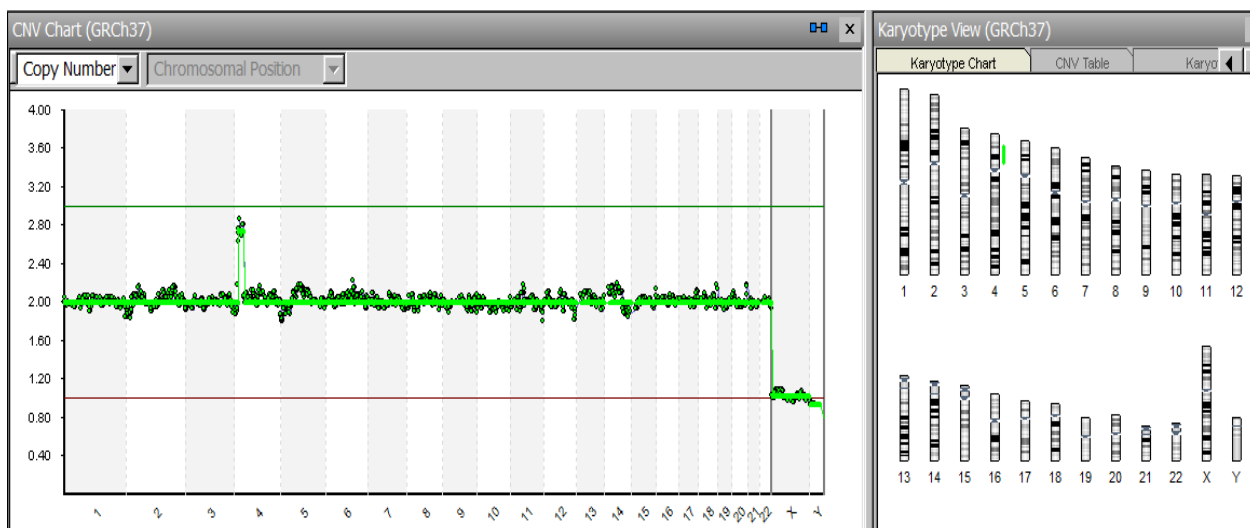
У пациентки было проведено 3 цикла стимуляции по стандартному протоколу с анТГнРГ с использованием препаратов Гонал-Ф, Оргалутран, Диферелин. После оплодотворения методом ИКСИ ооциты были перенесены в культуральную среду CSCM (Irvine Sc., США) в целях дальнейшего культивирования. Оценку наступления стадии двух пронуклеусов (формирования зиготы) проводили через 14–16 ч после оплодотворения. Все этапы культивирования проводили в мультигазовых инкубаторах COOK (Ирландия) в каплях по 25 мкл под маслом (Irvine Sc., США). Среду CSCM (Irvine Sc., США) не меняли в течение 4-х суток культивирования. На 5-е сутки после оплодотворения была проведена процедура биопсии трофэктодермы для ПГТ-А и ПГТ-СП по показаниям. В 1-м цикле ВРТ получили 3 эмбриона, пригодных для ПГТ-СП; во 2-м и 3-м — 7 и 6 соответственно. Всего для анализа после секвенирования было получено 16 эмбрионов. Эмбрионы были подвергнуты криоконсервации методом витрификации на средах Kitazato, хранение в условиях жидкого азота.

Перед секвенированием осуществляли полногеномную амплификацию ДНК клеток трофэктодермы. С помощью электрофореза проводили анализ качества полученного продукта WGA. ПГТ-СП осуществляли методом NGS на приборе MiSeq компании Illumina с применением коммерческого набора *VeriSeq PGS Kit*. Данные, полученные с использованием прибора, обрабатывали с помощью программного обеспечения BlueFuse Multi.

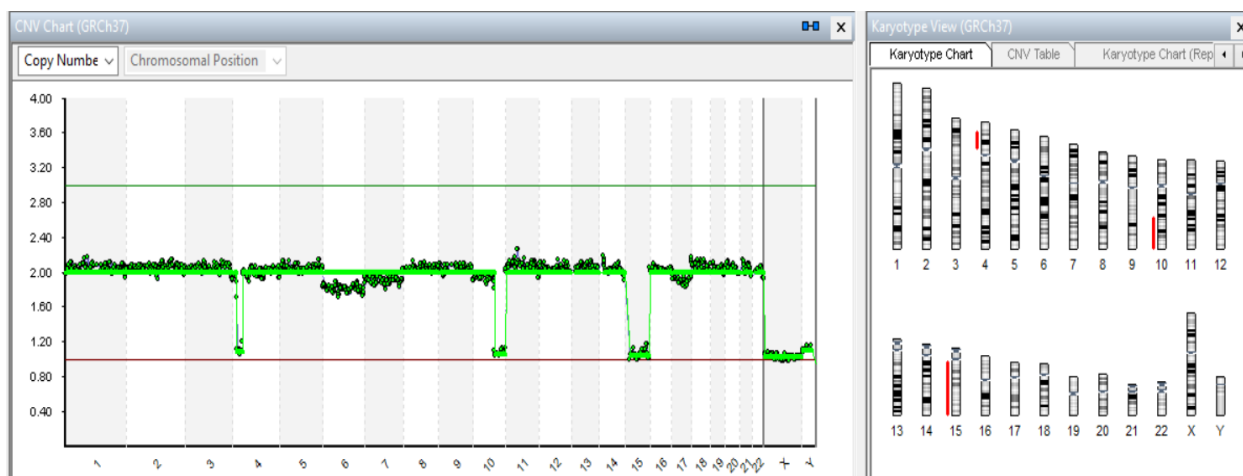
По результатам ПГТ-А и ПГТ-СП, выполненных по методике высокопроизводительного секвенирования (NGS), с нормальным молекулярным кариотипом было получено 2 эмбриона: один в 1-м цикле ВРТ и один в 3-м цикле стимуляции. Фото профилей секвенирования в программе BlueFuse Multi представлены на рисунке 19. В результате переноса здорового эмбриона в 1-м цикле стимуляции беременность не наступила. Здоровый эмбрион, полученный в 3-м цикле стимуляции, до настоящего времени хранится в условиях жидкого азота.



A) $Seq(1-22) \times 2, (XY) \times 1$, нормальный молекулярный кариотип



Б) $Seq(4p15.31-4p14) \times 3, (XY) \times 1$, выявлен дополнительный генетический материал участка 4p15.31-4p14 хромосомы 4



В) $Seq(4p15.32 \rightarrow 4p14) \times 1, (10q23.31 \rightarrow 10q26.3) \times 1, (15) \times 1, (XY) \times 1$, выявлена недостача генетического материала участка 4p15.31-4p14 хромосомы 4, участка 10q23.31 -> 10q26.3 хромосомы 10 и моносомия хромосомы 15

Рис. 19. Пример результатов анализа секвенирования клеток трофэктодермы методом NGS на платформе Illumina в программе BlueFuse Multi у пациентки с кариотипом 46,XX,ins(13;4)(q34;p14p15.3),inv(4)(p14q12).

Спектр хромосомной патологии во всех преимплантационных эмбрионах, выявленный при высокопроизводительном секвенировании, представлен в таблице 28.

Результат анализа секвенирования показал, что несбалансированные варианты по известной патологии определены в 9 из 16 наблюдений (56,3%),

при этом в 6 наблюдениях только по известной в кариотипе патологии (37%) и в 3 наблюдениях (19%) одновременно с патологией других хромосом или с мозаицизмом. Эмбрионы с анеуплоидией хромосом, не вовлеченных в хромосомную перестройку, были представлены в 3 наблюдениях из всей выявленной патологии, что составило 21% (таблица 29).

Таблица 28. Структура хромосомной патологии, выявленной при секвенировании образцов клеток трофэктодермы

Несбалансированные эмбрионы по известной перестройке	Несбалансированные эмбрионы по известной перестройке с мозаицизмом	Эмбрионы несбалансированные по известной перестройке и с патологией других хромосом	Эмбрионы с анеуплоидией хромосом, не вовлеченных в хромосомную перестройку	Мозаицизм хромосом
6	2	1	3	2

При переносе эмбриона с нормальным молекулярным кариотипом, полученного в первой попытке ВРТ, беременность не наступила. Перенос размороженного второго эмбриона с нормальным молекулярным кариотипом в следующей программе ВРТ привела к наступлению развивающейся беременности и рождению здорового ребенка.

Описанный клинический случай указывает на возможность родов здоровым ребенком даже при сложных сочетанных хромосомных перестройках в программах лечения бесплодия методами ВРТ с применением преимплантационного генетического тестирования с высокопроизводительным секвенированием нового поколения.

4.8. Оценка истинного мозаицизма эмбрионов человека в программах лечения бесплодия методами ВРТ. Перенос мозаичных эмбрионов

По результатам повторного ПГТ у 15 эмбрионов хромосомный набор в исходном образце клеток трофэктодермы совпадал с образцами клеток, полученными при разделении эмбриона на три части. Однако у двух эмбрионов были обнаружены дополнительные хромосомные нарушения в образце клеток из ВКМ и трофэктодермы 1 и 2. У первого эмбриона при проведении NGS были обнаружены дополнительные хромосомные

нарушения, не детектированные в общем образце клеток трофэктодермы (рис. 20). Клетки из ВКМ у первого эмбриона содержали делецию и дупликацию по одной из хромосом, а в образце трофэктодермы №2 была обнаружена моносомия.

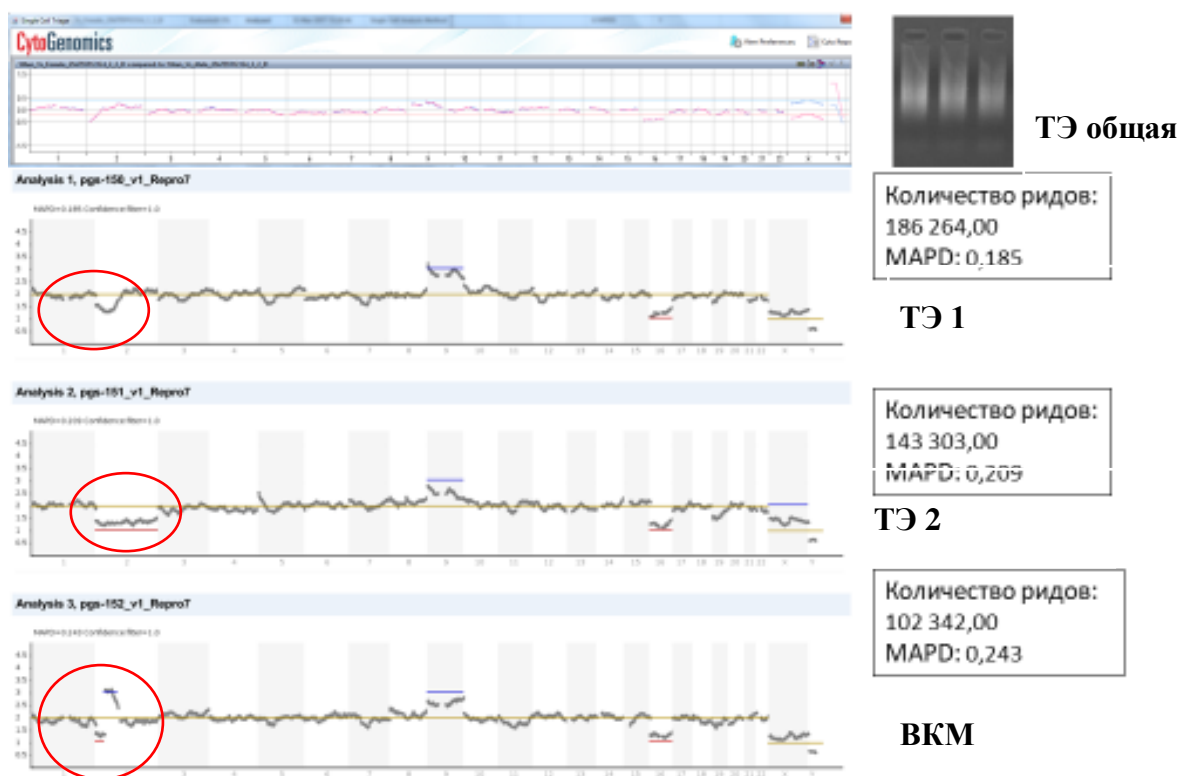


Рис. 20. Результат высокопроизводительного секвенирования (NGS) образца клеток ВКМ, ТЭ общей, ТЭ 1 и ТЭ 2 у первого эмбриона

В образце клеток ВКМ, полученном у второго эмбриона, были также обнаружены дополнительные хромосомные перестройки, не описанные в результатах NGS клеток общей трофэктодермы. По одной из хромосом была обнаружена дупликация, представленная на рисунке 21. Анализ сравнительно небольшого числа эмбрионов показывает, что уровень истинного мозаицизма составляет 13,3%, что соответствует международным данным и позволяет рекомендовать метод высокопроизводительного секвенирования преимплантационных эмбрионов как точный метод диагностики генетического статуса бластоцист.

Полученные данные еще раз подтверждают, что биопсия части трофэктодермы может быть нерепрезентативной относительно всех клеток трофэктодермы и ВКМ. Таким образом, несмотря на то что в настоящее время разработаны рекомендации по оптимизации выбора мозаичных эмбрионов для переноса в программах ВРТ, до сих пор остается ряд нерешенных вопросов. Один из них — адекватная и полная диагностика мозаицизма. Следовательно, неточности в диагностике связаны с методами получения биологического материала для генетического анализа, который зачастую не позволяют достоверно оценить наличие мозаицизма у анализируемого эмбриона.

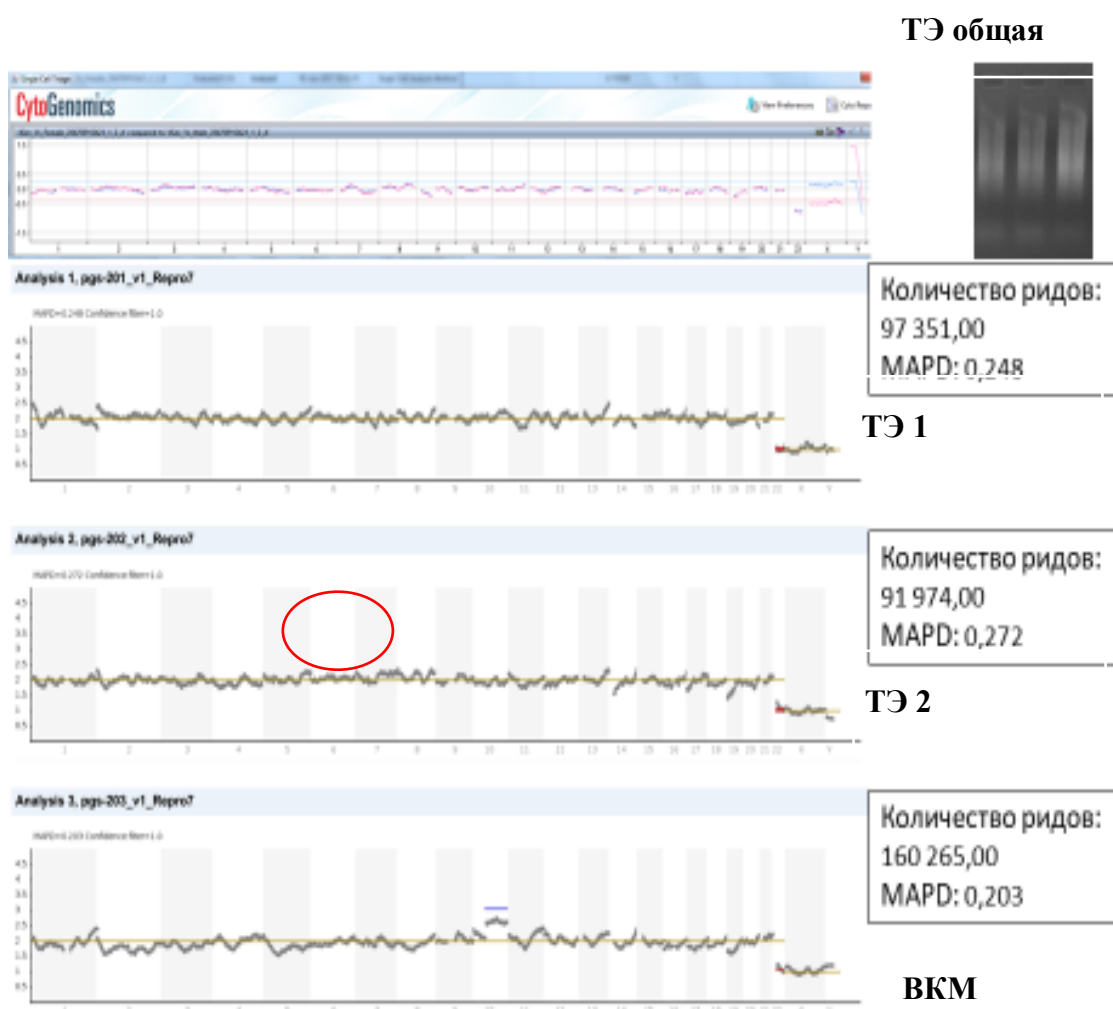


Рис. 21. Результат высокопроизводительного секвенирования (NGS) образца клеток ВКМ, ТЭ общей, ТЭ 1 и ТЭ 2 у второго эмбриона.

Ретроспективный анализ программ ВРТ с ПГТ на первом этапе исследования показал, что из 3092 бластоцит отличного и хорошего качества

163 были мозаичны по разным типам хромосом (5,3%). В клинической практике встречаются пары, у которых по результатам ПГТ нет эуплоидных эмбрионов, но есть мозаики. Именно поэтому в настоящей работе была оценена возможность переноса мозаичных эмбрионов в полость матки в программах лечения бесплодия. Выполнено 12 переносов размороженных мозаичных эмбрионов. Эуплоидных бластоцист у больных по результатам ПГТ не было.

Таблица 29. Спектр мозаицизма эмбрионов, перенесенных в полость матки, по результатам ПГТ-А

№	Тип мозаицизма эмбриона	Результат переноса в полость матки
1	mosaic(16)x0,4	Беременность не наступила
2	mosaic(20)x2,35	Беременность наступила, роды
3	mosaic(15)x0,6	Беременность не наступила
4	mosaic(8)x1,35	Беременность наступила, роды
5	mosaic(9)x1,7	Беременность не наступила
6	mosaic(1)x2,1	Беременность не наступила
7	mosaic(20)x0,6	Беременность не наступила
8	mosaic(5)x1,4	Беременность наступила, пренатальная диагностика подтвердила аномалии развития плода, прерывание беременности
9	mosaic(11p15q23)x2,6	Беременность наступила, роды
10	mosaic(20)x2,25	Беременность наступила, роды
11	mosaic(20)x2,4	Беременность не наступила
12	mosaic(2)x2,25	Беременность наступила, роды

Перед процедурой всех пациентов проконсультировал клинический генетик, рассчитаны и объяснены все риски рождения детей с генетическими нарушениями, подписаны информированные добровольные согласия, обсужден вопрос проведения пренатальной диагностики. Из 12 женщин

после переноса мозаичных эмбрионов беременность наступила у 6 (50%). Из 6 беременных пятерым выполнена инвазивная пренатальная диагностика, только у одной пациентки подтвердился аномальный кариотип плода, беременность была прервана. Одна пациентка от инвазивной пренатальной диагностики отказалась (см. клинический случай 2). Было рождено 5 детей. В настоящий момент дети развиваются согласно возрасту. Кариотипирование новорожденных не проводили. В таблице 29 показаны молекулярные кариотипы эмбрионов с мозаицизмом и указанием хромосом, вовлеченных в мозаицизм, которые были перенесены в полость матки пациенток.

Клинический случай 2. Рождение здорового ребенка после переноса мозаичного эмбриона в программе лечения бесплодия методами ВРТ

Пациентка К., 49 лет, в 2019 г. обратилась в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова с жалобами на отсутствие наступления беременности в течение 5 лет регулярной половой жизни без контрацепции. Из анамнеза: менструации с 13 лет, цикл регулярный, по 5 дней через 26 дней, без особенностей. Половая жизнь с 17 лет, брак первый. В 2015 г. выполнена лапароскопия, овариэктомия по поводу гнойного абсцесса левого яичника, в 2016 г. — диагностическая гистероскопия, раздельное диагностическое выскабливание (по данным гистологического исследования – хронический эндометрит, проходила курс физиотерапии). В анамнезе 3 самопроизвольные беременности и 1 беременность после криопереноса донорского эмбриона. В 1990 г. первая беременность закончилась рождением здорового мальчика, весом 3250 г., ростом 50 см (погиб во взрослом возрасте). В 1994 г. и 1996 г. была выполнена вакуум-аспирация полости матки для прерывания беременности на раннем сроке по желанию пациентки. В 2013 г. проведена 1-я программа ЭКО с переносом эмбриона, без эффекта. В 2016 г. криоконсервировано 3 эмбриона после программы ВРТ с использованием донорских ооцитов. В 2017 г. выполнен перенос эмбрионов, полученных из донорских ооцитов, в

криопротоколе, без эффекта. В 2018 г. наступила клиническая беременность после переноса эмбриона в криопротоколе на фоне циклической гормональной терапии. На сроке 8–9 недель была диагностирована неразвивающаяся беременность, проведена вакуум-аспирация содержимого полости матки. При цитогенетическом анализе кариотипа абортуса был обнаружен несбалансированный женский кариотип, триплоидия 69,XXX. В 2019 г. в отделении паре в виду выраженного снижения овариального резерва проведена программа ВРТ и ПГТ-А с использованием донорских ооцитов, криоконсервированных на базе НМИЦ АГП им ак. В.И. Кулакова. Оплодотворение донорских ооцитов выполнено криоконсервированной спермой супруга методом ИКСИ. Супруг К., 50 лет, соматически здоров, по данным спермограммы: тератозооспермия, 0%. После оплодотворения методом ИКСИ ооциты были перенесены в культуральную среду CSCM. Спустя 14–16 ч в условиях эмбриологической лаборатории проводилась оценка оплодотворения, которое считалось случившимся при наступлении стадии двух пронуклеусов. Все этапы культивирования были выполнены в мультигазовых инкубаторах СООК в индивидуальных каплях по 25 мкл. На 5-е сутки после оплодотворения была проведена процедура биопсии трофэктодермы для ПГТ-А по показаниям на одном эмбрионе качества 5AB с последующей криоконсервацией биопсированного эмбриона.

По результатам ПГТ-А, выполненного по методике высокопроизводительного секвенирования, у эмбриона был установлен мозаичный кариотип по 20-й хромосоме $seq(1-22) \times 2(XY) \times 1(mosaic(20) \times 2.35)$. Принимая во внимание анамнез женщины, возраст и наличие единственного эмбриона для переноса в полость матки, после консультации с врачом-генетиком решено выполнить перенос мозаичного эмбриона с последующей инвазивной пренатальной диагностикой (биопсией хориона) на сроке 11–14 недель беременности.

На этапе подготовки пациентки к криопротоколу проведено полное клиничко-лабораторное обследование. Перенос размороженного эмбриона в

полость матки осуществляли на фоне циклической гормональной терапии, назначенной с 6-го дня менструального цикла препаратом эстрадиола валерата в дозе 4 мг ежедневно. Поддержка лютеиновой фазы менструального цикла проводилась с 15-го дня цикла микронизированным прогестероном по 400 мг в сутки. На 21-й день менструального цикла выполнен перенос 1 эмбриона после ПГТ-А в полость матки, без технических трудностей. Поддержка посттрансферного периода осуществлялась микронизированным прогестероном по 600 мг в сутки. В результате проведенной программы переноса размороженного эмбриона наступила беременность. На 14-й день после переноса эмбриона уровень β -ХГ составил 818 мМЕ/мл. В первом триместре беременности от инвазивного пренатального скрининга пара отказалась. Беременность протекала физиологично. На 34-й неделе беременности родился живой здоровый мальчик весом 2560 г, ростом 48 см путем операции кесарево сечения. Ребенок соматически здоров, развивается соответственно возрасту.

Таким образом, представленный клинический случай показывает возможность рождения здорового ребенка при переносе мозаичных эмбрионов по результатам ПГТ-А.

Ввиду того, что перенос мозаичных эмбрионов в программах ВРТ осуществляют крайне редко, в мире учитываются такие случаи из многих клиник. По результатам, опубликованным в 2022 г., после переноса мозаичных эмбрионов родилось около 50 детей (здоровье не изучено), частота живорождения не превышает 40% (при переносе генетически нормальных эмбрионов – более 70%). Установлено, что эффективность программ ВРТ при переносе мозаичных эмбрионов связана с процентом мозаицизма и конкретными хромосомами, вовлеченными в мозаицизм. Также часто отмечаются ложноположительные результаты мозаицизма, которые необходимо исследовать более пристально.

4.9. Программы ВРТ с проведением ПГТ-А и ПГТ-М у пар с моногенными заболеваниями

Проанализированы программы ВРТ у 24 фертильных пар с носительством моногенных заболеваний. Спектр наследственной патологии показан в таблице 30. Всем пары прошли предварительное консультирование клинического и лабораторного генетика на предмет риска передачи наследственного заболевания (д.б.н., генеральный директор ООО «Хайтек Генетикс» Ж.И. Глинкина). ПГТ осуществляли методом NGS на приборе MiSeq компании Illumina с применением коммерческого набора VeriSeq PGS Kit. Результаты, полученные с использованием прибора, обрабатывали с помощью ПО BlueFuse Multi.

У всех пролеченных пациентов были получены эмбрионы, пригодные для переноса в полость матки. Суммарно родилось 8 здоровых детей. В одной семье женщина родила двух здоровых детей (клинический случай 3).

Таблица 30. Программы ВРТ с применением ПГТ-М у пар с наследственными заболеваниями в анамнезе

	Заболевание	Исследование
Мутации в гене <i>CFTR</i> (наследственный муковисцидоз)		
1	Мужчина – носитель мутации IVS8-5T в гене <i>CFTR</i>	Анализ STR-маркеров хромосом 7, 13, 18, 21, X, Y; ДНК-анализ мутации <i>IVS8-5T</i>
2	Мужчина – носитель мутации с.1521_1523delCTT(delF508) в гене <i>CFTR</i> (наследственный муковисцидоз)	ДНК-анализ семейной мутации delF508; анализ STR-маркеров хромосом 7, 13, 18, 21, X, Y
3	И мужчина, и женщина – носители мутаций F508del (с.1521_1523delCTT) (мать) и с.1766+2t->c (отец) в гене <i>CFTR</i> . Тип наследования заболевания аутосомно-рецессивный. Риск рождения больного ребенка составляет 25%.	Анализ на наличие семейных мутаций в гене <i>CFTR</i> , анализ STR-маркеров хромосомы 7, расположенных в непосредственной близости к гену <i>CFTR</i> , анализ STR-маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y методом КФ-ПЦР
4	Мужчина – носитель мутации delF508 в гетерозиготном состоянии в гене <i>CFTR</i>	Анализ семейной мутации delF508 в гене <i>CFTR</i> , анализ STR-маркеров 7-й хромосомы, сцепленных с геном <i>CFTR</i> ; анализ STR-маркеров X, Y; хромосом 21, 13, 18
Мутации в гене <i>HTT</i> (болезнь Гентингтона)		
1	Женщина – носитель гена болезни Гентингтона	Анализ тринуклеотидных повторов CAG в гене <i>HTT</i>

	Заболевание	Исследование
2	Женщина – носитель гена болезни Гентингтона	Анализ тринуклеотидных повторов CAG в гене <i>HTT</i> , анализ STR-локусов хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X, Y методом КФ-ПЦР
3	Женщина – носитель гена болезни Гентингтона. В гене <i>HTT</i> обнаружено >40 CAG повторов в гетерозиготном состоянии. Риск передачи заболевания потомству составляет 50%	Анализ гена <i>HTT</i> , STR-маркеров 4-й хромосомы, сцепленных с геном <i>HTT</i> ; анализ STR-локусов хромосом 13, 18, 21, X, Y
Мутации в гене COL (синдром Альпорта)		
1	Женщина – носитель мутации c.2451+1g->t в гетерозиготном состоянии в гене <i>COL1A1</i> . Страдает несовершенным остеогенезом	Анализ STR-маркеров 17-й хромосомы, сцепленных с геном <i>COL1A1</i> ; анализ STR-локусов хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X, Y
2	Женщина – носитель мутации Gly1107Arg в гене <i>COL4A5</i> (синдром Альпорта).	Анализ семейной мутации Gly1107Arg в гене <i>COL4A5</i> , анализ STR-маркеров X хромосомы, сцепленных с геном <i>COL4A5</i> ; анализ STR-маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y
3	Оба партнера – носители мутаций в гене <i>COL6A3</i> . Учитывая семейный анамнез, заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Риск рождения больного ребенка составляет 25%	Анализ на наличие семейных мутаций c.8331_8338dupGGTGAACA и c.4837_4849delTTTGGACCTCCG в гене <i>COL6A3</i> ; анализ STR-маркеров хромосомы 2, расположенных в непосредственной близости к гену <i>COL6A3</i> ; анализ STR-маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y методом КФ-ПЦР
Мутации в гене CYP (адрено-генитальный синдром)		
1	Оба партнера – носители мутаций – IVS2-13 a->g в гене <i>CYP21A2</i> (мать) и конверсия генов <i>CYP21A2/CYP21A1P</i> (отец). Мутации в гене <i>CYP21A2</i> обуславливают развитие адрено-генитального синдрома. Тип наследования заболевания аутосомно-рецессивный. Риск рождения больного ребенка составляет 25%	Анализ на наличие семейных мутаций в гене <i>CYP21A2</i> , анализ STR-маркеров хромосомы 6, расположенных в непосредственной близости к гену <i>CYP21A2</i> ; анализ STR-маркеров хромосом 1-22, X, Y методом КФ-ПЦР
2	Женщина – носитель мутации Pro454Ser в гене <i>CYP21A2</i> . Мутации в гене <i>CYP21A2</i> обуславливают развитие адреногенитального синдрома. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Риск рождения больного ребенка составляет 25%	ДНК-анализ на выявление семейной мутации Pro454Ser в гене <i>CYP21A2</i> ; дополнительный анализ STR-маркеров 6-й хромосомы, сцепленных с геном <i>CYP21A2</i> ; анализ STR-локусов хромосом 13, 18, 21, X, Y
Другие наследственные заболевания		
1	Женщина – синдром Кальмана	Анализ семейной мутации Leu173Arg в гене <i>PROKR2</i> , анализ STR-маркеров 20-й хромосомы, сцепленных с геном <i>PROKR2</i> ; анализ STR-маркеров хромосом X, Y; хромосомы 21, 13, 18

	Заболевание	Исследование
2	Женщина – болезнь Гиппеля-Линдау	Анализ семейной мутации Leu63Arg в гене <i>VHL</i> ; анализ STR-маркеров 3-й хромосомы, сцепленных с геном <i>VHL</i> ; анализ STR-маркеров хромосом 13, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y
3	Женщина – носитель гемофилии А. Был подтвержден диагноз гемофилии А у брата пациентки и выявлена мутация – <i>F8 inv22</i>	Анализ на выявление мутации <i>F8 inv22</i> и анализ STR-маркеров X хромосомы, сцепленных с геном F8 (гемофилия А): Fint25, DXSxx87, DXxxS97, HA472, HA544, DXS1073; анализ STR-маркеров хромосом 13–16, 18, 21, 22, X, Y
4	Оба партнера – носители патогенных мутаций в гене <i>SCO2</i> (кардиоэнцефаломиопатия). Риск передачи заболевания потомству составляет 25%	Анализ семейных мутаций в гене <i>SCO2</i> , STR-маркеров хромосомы 22, сцепленных с геном <i>SCO2</i> ; анализ STR-локусов хромосом 13, 16, 18, 21, X, Y
5	Оба партнера – носители мутации Gln70Term в гене <i>IDUA</i> (наследственный мукополисахаридоз тип I)	Анализ семейной мутации Gln70Term в гене <i>IDUA</i> ; анализ STR-маркеров 4-й хромосомы, сцепленных с геном <i>IDUA</i> ; анализ STR-маркеров хромосом 13, 18, 21, 22, X, Y
6	Мужчина – синдромом Марфана. В гене <i>FBNI</i> обнаружена мутация Arg1125Term в гетерозиготном состоянии. Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу. Риск рождения больного ребенка составляет 50%	Анализ на наличие семейной мутации в гене <i>FBNI</i> ; анализ STR-маркеров хромосомы 15, расположенных в непосредственной близости к гену <i>FBNI</i> ; анализ STR-маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y методом КФ-ПЦР
7	Женщина – носитель гена болезни мышечной дистрофии Беккера. Риск болезни для каждого из будущих сыновей – 50%, дочери имеют 50%-й риск гетерозиготного носительства	Анализ на наличие делеций экзонов 8–11 в гене <i>DMD</i> , анализ STR-локусов, сцепленных с геном <i>DMD</i> ; анализ STR-локусов хромосом 13, 18, 21, X, Y
8	Мужчина – страдает наследственным поликистозом почек. В гене <i>HNF1B</i> обнаружена мутация с.1334_1339+17del23. Риск передачи заболевания потомству составляет 50%	ДНК-анализ на выявление семейной мутации с.1334_1339+17del23 в гене <i>HNF1B</i> ; дополнительный анализ STR-маркеров 17-й хромосомы, сцепленных с геном <i>HNF1B</i> ; анализ STR-локусов хромосом 13, 18, 21, X, Y
9	Мужчина – наследственная ретинобластома. В гене <i>RB</i> обнаружена мутация IVS6+1insG в гетерозиготном состоянии. Риск рождения больного ребенка составляет 50%	Анализ на наличие семейной мутации IVS6+1insG в гене <i>RB</i> , анализ STR-маркеров хромосомы 13, расположенных в непосредственной близости к гену <i>RB</i> ; анализ STR-маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y методом КФ-ПЦР и хромосом 1–22, X, Y методом КФ-ПЦР
10	Оба партнера – носители мутации Tyr63Cys в гене <i>STAMBP</i> . Мутации в гене <i>STAMBP</i> обуславливают развитие microcephaly-capillary malformation	Анализ на наличие семейной мутаций в гене <i>STAMBP</i> ; анализ STR-маркеров хромосомы 2, расположенных в непосредственной близости к гену

	Заболевание	Исследование
	syndrome. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Риск рождения больного ребенка составляет 25%	<i>STAMBP</i> ; анализ STR-маркеров хромосом 1–22, X, Y методом КФ-ПЦР
11	Оба партнера – носители мутаций в гене <i>LAMA2</i> . Мутации в гене <i>LAMA2</i> обуславливают развитие врожденной мерозин-негативной мышечной дистрофии. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Риск рождения больных детей составляет 25%	Анализ STR-маркеров хромосомы 6, сцепленных с геном <i>LAMA2</i> ; анализ STR-локусов хромосом 13, 18, 21, X, Y
12	Оба партнера – носители мутаций в гене <i>DARS2</i> . Риск рождения больного ребенка составляет 25%	Анализ STR-маркеров хромосомы 1, сцепленных с геном <i>DARS2</i> ; анализ STR-локусов хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X, Y

Необходимо отметить, что все пары, рассматриваемые в таблице 24, после программ ВРТ с применением ПГТ-А и ПГТ-М родили здоровых детей. Всего родилось 15 здоровых детей. Некоторые пары настояли на переносе 2 эмбрионов в полость матки.

Клинический случай 3. Рождение двух здоровых детей у пары с гетерозиготным носительством генетического варианта F508del в гене CFTR

Пациентка Р., 32 года, в 2017 г. обратилась в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова с жалобами на отсутствие наступления беременности в течение 5 лет регулярной половой жизни без контрацепции. Из анамнеза: менструации с 13 лет, цикл регулярный, по 5 дней через 30 дней, без особенностей. Половая жизнь с 15 лет, брак первый. Индекс массы тела 24 кг/м² (рост 163 см, масса тела 63 кг). Соматические и гинекологические заболевания отрицает. В анамнезе одна самопроизвольная беременность в 2012 г., завершившаяся своевременными самопроизвольными родами. Родилась девочка весом 3350 г, ростом 52 см, оценка по шкале Апгар — 8/9 баллов. Ребенку произведена срочная операция по поводу непроходимости кишечника, установлено наличие меконеального

илеуса. Поставлен диагноз муковисцидоз. С помощью анализа высокополиморфных генетических маркеров STR (Simple Tandem Repeats) проведена косвенная ДНК-диагностика образцов периферической крови больного ребенка и его родителей. По данным молекулярно-генетического анализа оба партнера являются гетерозиготными носителями генетического варианта F508del в гене CFTR. У больного ребенка данная мутация выявлена в гомозиготном состоянии. Тип наследования – аутосомно-рецессивный, высокий риск повторного рождения ребенка с муковисцидозом в данном браке — 25%. Паре рекомендовано лечение в программе ЭКО/ИКСИ с проведением ПГТ всех эмбрионов. На этапе подготовки проведено полное клинико-лабораторное обследование. По данным ультразвукового исследования молочных желез выявлена фиброзно-кистозная мастопатия, пациентка проконсультирована маммологом: противопоказаний к проведению программ ВРТ и беременности нет. Мужчине 39 лет, брак первый. Соматически здоров, по данным спермограммы — астенотератозооспермия. Кариотипирование обоих партнеров по лимфоцитам периферической крови отклонений не выявило: 46, XX; 46, XY. Проведена овариальная стимуляция по протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (антГнРГ) (Цетротид, «Merck Serono», Германия) с 3-го дня менструального цикла с использованием препарата Менопур («Ferring A/S», Германия) в сочетании с препаратом Гонал-Ф («Merck Serono», Германия), суммарная доза гонадотропинов составила 2175 МЕ, длительность стимуляции – 9 дней. Триггер овуляции (Овитрель 500 мкг, «Merck Serono», Германия) был назначен при достижении доминантных фолликулов диаметра 18 мм. Трансвагинальная пункция (ТВП) была выполнена через 36 часов после введения триггера под УЗ-контролем. Аспирировано 18 ооцитов, из них зрелых — 11, дегенеративных — 7. Эмбриологический этап проводили на одноступенчатых культуральных средах Irvine Scientific (США). Условия культивирования: мультигазовая смесь с пониженным содержанием кислорода (5,5% CO₂, 5% O₂, остаточный

№2). Учитывая показатели спермограммы в день ТВП, оплодотворение проводили методом ПИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида, отобранного по физиологическому признаку) (Sperm Slow, Origio, Дания). После оплодотворения на 1-е сутки получено 11 зигот 2PN2PB. Морфология эмбрионов оценивалась согласно классификации Гарднера. На 5-е сутки культивирования произведена биопсия трофэктодермы и криоконсервация 3 бластоцист: 4AA, 4AA, 4BA. На 6-е сутки культивирования были пробиопсированы и криоконсервированы еще 2 бластоцисты: 6BA и 6AA. Криоконсервация эмбрионов выполнена методом витрификации с использованием наборов Kitazato («Kitazato Corporation», Япония) по инструкции производителя. По результатам ПГТ на анеуплоидии (ПГТ-А), выполненного по методике сравнительной геномной гибридизации (a-CGH) 3 эмбриона из 5 имели эуплоидный набор хромосом. В результате проведения ПГТ на моногенные заболевания (ПГТ-М) на эуплоидных эмбрионах установлено, что эмбрион №2 с вероятностью более 75% не является носителем генетического варианта F508del в гене CFTR, эмбрионы №1 и №3 с вероятностью более 95% являются гетерозиготными носителями генетического варианта F508del в гене CFTR. К переносу рекомендовано три эмбриона. Перенос размороженного эмбриона в полость матки осуществляли на фоне циклической гормональной терапии. С 5-го дня менструального цикла начата гормональная подготовка эндометрия препаратом Дивигель («Orion Corporation», Финляндия), с 15-го дня менструального цикла – формирование лютеиновой фазы цикла препаратом Дюфастон («Abbot Healthcare Products», B.V., Нидерланды). Перенос размороженного эмбриона №1 с гетерозиготным носительством мутации F508del в гене CFTR осуществлялся на 20-й день цикла. Через 12 дней после переноса эмбриона уровень β -субъединицы хорионического гонадотропина человека в крови составил 860 мМЕ/мл. Через 21 день после переноса эмбриона по данным УЗИ в полости матки визуализировалось плодное яйцо. Беременность протекала без особенностей, пренатальный скрининг I и II триместров

отклонений не выявил. Родоразрешение произведено в сроке 40 недель беременности путем операции кесарево сечения. Родилась живая доношенная девочка весом 3330 г ростом 51 см, оценка по шкале Апгар – 8/9 баллов, здорова. В лаборатории молекулярно-генетических методов проведена ДНК-диагностика образцов периферической крови ребенка, в результате которой подтверждено носительство патогенного генетического варианта аллеля. В 2020 г. пара повторно обратилась в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова в целях проведения программы переноса размороженного эмбриона. Гормональная подготовка эндометрия осуществлялась препаратами Прогинова («Bayer Pharma», AG, Германия) и Утрожестан («Besins Healthcare», SA, Бельгия). На 18-й день цикла произведен перенос в полость матки размороженного эмбриона №2, не являющегося носителем патогенного генетического варианта. В результате проведенной программы переноса размороженного эмбриона наступила беременность. На 16-й день после переноса эмбриона уровень β -субъединицы хорионического гонадотропина человека составил 5650 мМЕ/мл. Беременность протекала без особенностей. В сроке 39 недель беременности путем операции кесарево сечения родилась живая доношенная девочка весом 3260 г ростом 50 см, оценка по шкале Апгар – 8/9 баллов, здорова.

4.10. Возможности повышения эффективности программ лечения бесплодия методами ВРТ при переносе зуплоидного эмбриона с помощью культуральных сред с гиалуроновой кислотой

В исследование было включено 309 женщин. Средний возраст женщин, составлял 34 года, средний возраст мужчин — 38 лет. Общие результаты программы ВРТ у пациенток представлены в таблице 31. Относительная частота наступления клинической беременности у пациенток, которым был проведен перенос эмбриона в среде, обогащенной гиалуроновой кислотой, составляла 32,0%, а в контрольной группе с использованием стандартной

культуральной при переносе эмбриона – 43,7%. У одной пациентки в группе с использованием гиалуроновой кислоты была диагностирована неразвивающаяся беременность (5,8%), в контрольной группе неразвивающаяся беременность была у 13 пациенток (13,1%) и у одной – внематочная беременность. После переноса эмбриона в культуральной среде, обогащенной гиалуроновой кислотой, у 15 пациенток были роды живым плодом (88,3%), и из контрольной группы было родоразрешено 90 женщин (80,3%). У 8 пациенток из контрольной группы был диагностирован выкидыш на раннем сроке беременности, сопровождающийся кровянистыми выделениями и болями внизу живота. Наиболее вероятной причиной выкидыша на раннем сроке послужили акушерские синдромы, в том числе нарушения свертывающей системы крови.

Таблица 31. Общая характеристика эффективности программ ВРТ у пациенток в зависимости от среды переноса

	Количество пациенток	Количество пациенток с клинической беременностью	Количество пациенток с прогрессирующей беременностью	Количество пациенток, родивших здорового ребенка	% невынашивания
Перенос в культуральной среде с гиалуроновой кислотой, n=53					
Имплантация +	17	17 (32,0%)	16 (94,2%)	15 (88,3%)	11,7%
Имплантация -	36				
Перенос в культуральной среде CSCM, n=256					
Имплантация +	112	112 (43,7%)	98 (87,5%)	90 (80,3%)	20,7%
Имплантация -	144				
Критерий Хи-квадрат, p		0,11	0,4	0,3	

В дальнейшем в ходе исследования всех женщин разделили на 3 группы: 24–30 лет, 31–36 лет и 37–43 года. В каждой возрастной группе выделили 2 подгруппы: в 1-й подгруппе перенос эмбриона осуществлялся с использованием гиалуроновой кислоты, во 2-й использовали стандартную

культуральную среду. В группе 1 (24–30 лет, 72 женщины) частота наступления клинической беременности у пациенток первой подгруппы, составила 27,2%, во 2-й — 42,6%. В первой подгруппе все забеременевшие пациентки в программе ВРТ были успешно родоразрешены, во второй – частота родоразрешений составила 76,9% (таблица 30).

У 5 пациенток в данной подгруппе был диагностирован выкидыш на раннем сроке беременности, у 1 пациентки диагностирована внематочная беременность с последующим проведением тубэктомии (перенос эмбриона в культуральной среде CSCM).

Таблица 32. Характеристика эффективности программ ВРТ у пациенток в возрасте от 24-30 лет в зависимости от среды переноса

	Количество пациенток	Количество пациенток с клинической беременностью	Количество пациенток с прогрессирующей беременностью	Количество пациенток, родивших здорового ребенка	% невынашивания
Перенос в культуральной среде с гиалуроновой кислотой, n=11					
Имплантация +	3	3 (27,2%)	3 (100%)	3 (100%)	0%
Имплантация -	8				
Перенос в культуральной среде CSCM, n=61					
Имплантация +	26	26 (42,6%)	25 (96,1%)	20 (76,9%)	23,1%
Имплантация -	35				
Критерий Хи-квадрат, p		0,3	1,0	0,5	

В группу 2 вошли пациентки в возрасте 31–36 лет (148 пациенток). Частота наступления клинической беременности в 1-й подгруппе составила 25,0%, во второй — 46,8%. У 1 пациентки во второй подгруппе была диагностирована анэмбриония и у 1 пациентки было прерывание беременности на раннем сроке. Частота родов живым плодом в 1-й составляла 100%, в 2-й – 96,1% в расчете на наступление беременности (таблица 33).

В группе 3 (37–43 года, 89 женщин) у 22 пациенток был проведен перенос эмбриона в среде с гиалуроновой кислотой. У 2-х пациенток во второй подгруппе был диагностирован выкидыш на раннем сроке беременности, у 1-й пациентки беременность наступила при переносе эмбриона в среде с гиалуроновой кислотой. У 12 пациенток 2-й подгруппы была диагностирована неразвивающаяся беременность на сроке 7–8 недель. Частота наступления клинической беременности в 1-й подгруппе составляла 40,9%, во 2-й — 38,8%. Относительная частота родоразрешений в 1-й подгруппе составила 88,8% в расчете на беременность, во 2-й подгруппе — 11,9% в расчете на беременность ($p=0,02$) (таблица 34).

Таблица 33. Характеристика эффективности программ ВРТ у пациенток в возрасте 31-36 лет в зависимости от среды переноса

	Количество пациенток	Количество пациенток с клинической беременностью	Количество пациенток с прогрессирующей беременностью	Количество пациенток, родивших здорового ребенка	% невынашивания
Перенос в культуральной среде с гиалуроновой кислотой, n=20					
Имплантация +	5	5 (25,0%)	5 (100%)	5 (100%)	0%
Имплантация -	15				
Перенос в культуральной среде CSCM, n=128					
Имплантация +	60	60 (46,8%)	59 (98,3%)	58 (96,6%)	3,4%
Имплантация -	68				
Критерий Хи-квадрат, p		0,06	0,7	0,5	

В результате исследования мы не выявили различий по частоте наступления клинической беременности и частоте родов в группах женщин разного возраста в зависимости от использования среды с гиалуроновой кислотой ($p \geq 0,05$). Внутри каждой возрастной группы был проведен анализ клиничко-анамнестических характеристик пациенток, которым был проведен перенос с использованием культуральной среды с гиалуроновой кислотой и

стандартной культуральной среды. Результаты анализа показали, что группы сопоставимы по клинико-anamnestическим данным.

Таблица 34. Характеристика эффективности программ ВРТ у пациенток в возрасте от 37-43 лет в зависимости от среды переноса

	Количество пациенток	Количество пациенток с клинической беременностью	Количество пациенток с прогрессирующей беременностью	Количество пациенток, родивших здорового ребенка	% невынашивания
Перенос в культуральной среде с гиалуроновой кислотой, n=22					
Имплантация +	9	9 (40,9%)	8 (36,3%)	8 (88,8%)	11,2%
Имплантация -	13				
Перенос в культуральной среде CSCM, n=67					
Имплантация +	26	26 (38,8%)	8 (11,9%)	8 (11,9%)	50,0%
Имплантация -	41				
Критерий Хи-квадрат, p		0,8	0,02	0,9	

Как показали результаты, положительное влияние на развитие зуплоидного эмбриона при переносе в культуральной среде с гиалуроновой кислотой обнаружено в группе пациенток позднего репродуктивного возраста 37–43 года ($p=0,02$). Можно рекомендовать такой категории больных использовать среду с гиалуроновой кислотой в программах с преимплантационным генетическим тестированием для снижения риска неразвивающейся беременности. Для женщин моложе 37 лет значимой разницы выявлено не было, что, возможно, связано с небольшими выборками пациенток.

4.11. Оценка уровня копийности митохондриальной ДНК эмбриона в качестве предиктора эффективности программы ВРТ

Было проведено когортное исследование, в которое были включены 244 зуплоидные немозаичные бластоцисты после проведения ПГТ-А. Бластоцисты получены в результате проведения программы ВРТ у 187 пар после подписания информированного добровольного согласия.

Проанализировано 218 селективных переносов размороженных эмбрионов в полость матки.

Количественная оценка мтДНК была выполнена на всех анализируемых 244 образцах. Распределение количества копий мтДНК в клетках ТЭ эуплоидных эмбрионов показало положительную асимметрию (1,508) и длительный эксцесс (3,568) (рисунок 22).

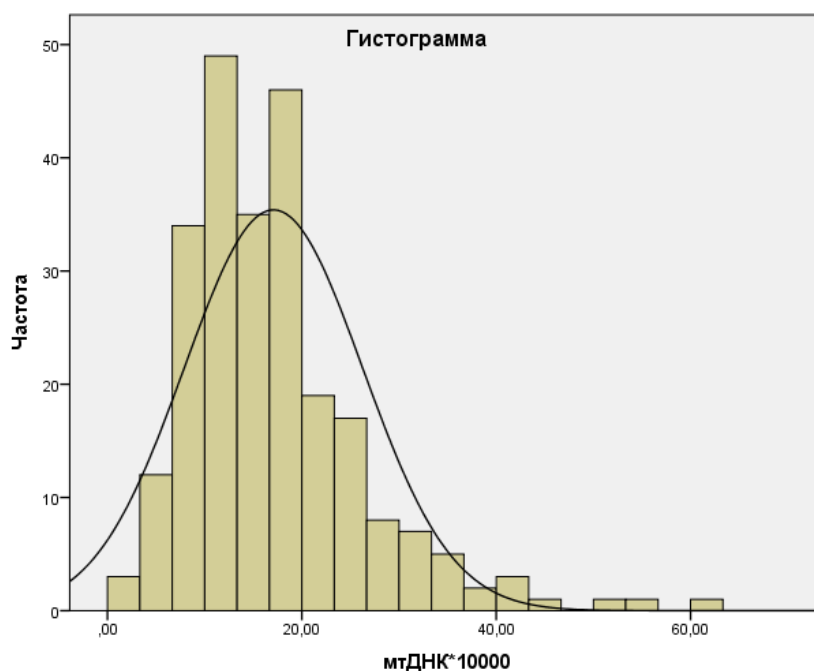


Рис. 22. Распределение содержания мтДНК, оцененное с помощью методики NGS, в клетках ТЭ эуплоидных бластоцист человека

Медиана количества копий мтДНК и межквартильные интервалы составляли 15,40 (10,67; 20,78), при этом стоит отметить большой разброс значений количества копий мтДНК: минимальное значение составило 2,06, максимальное – 60,70.

Количественная оценка мтДНК в зависимости от возраста матери

Материнский возраст выступал в качестве непрерывной переменной. Средний возраст женщин на момент ТВП составил $34,07 \pm 4,08$ года (диапазон: 26,0–43,0 года). Мы проанализировали корреляцию между количественным определением мтДНК и возрастом матери с помощью непараметрической ранговой корреляции Спирмена. Количественный уровень мтДНК в общем количестве клеток ТЭ эуплоидных эмбрионов

показал статистически незначимую и очень слабую корреляцию с возрастом матери (коэффициент корреляции Спирмена $r=-0,064$, $p=0,320$).

Количественная оценка мтДНК и эмбриологические факторы

В настоящем исследовании был проанализирован ряд эмбриологических факторов, которые потенциально могут повлиять на содержание мтДНК в клетках эмбриона. При оценке эмбриологических факторов изучалась связь между количеством мтДНК и сутками, на которые выполнялась биопсия клеток ТЭ. В данном исследовании у 215 эмбрионов (88%) биопсию проводили на 5-й день (Д5) культивирования, 29 (12%) эмбрионам биопсию выполнили на 6-й день (Д6) после оплодотворения. При проведении статистической обработки данных было показано, что эмбрионы Д5 культивирования имели более высокое количество мтДНК по сравнению с эмбрионами Д6: 15,70 (11,10; 21,80) VS 11,50 (7,53; 16,55) соответственно, $p=0,001$ (критерий Манна–Уитни) (рисунок 23).

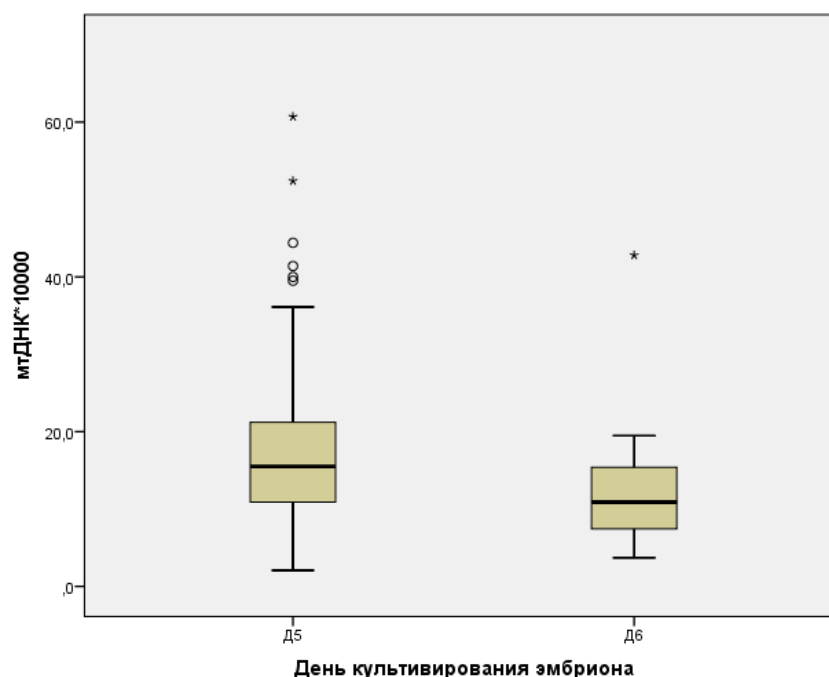


Рис. 23. Количественная оценка уровня мтДНК у эмбрионов в зависимости от суток культивирования

Для ПГТ-А проводили биопсию бластоцист хорошего и отличного качества, определяемого с помощью оценки степени экспансии бластоцисты (2–6 баллов), качества ВКМ (А или В) и клеток ТЭ (А или В). Была обнаружена статистически незначимая связь степени экспансии бластоцисты и количества копий мтДНК ($p=0,178$). Стоит отметить взаимосвязь между степенью экспансии ранних бластоцист (1–2 балла) и повышенным количественным уровнем копий мтДНК, а бластоцист, у которых экспансия соответствовала 6 баллам, – с пониженным содержанием мтДНК. Уровень значимости составил 0,041 при попарном сравнении двух групп, используя критерий Манна–Уитни. Однако при введении поправки Бонферрони различия между двумя группами не были статистически значимыми (рисунок 24).

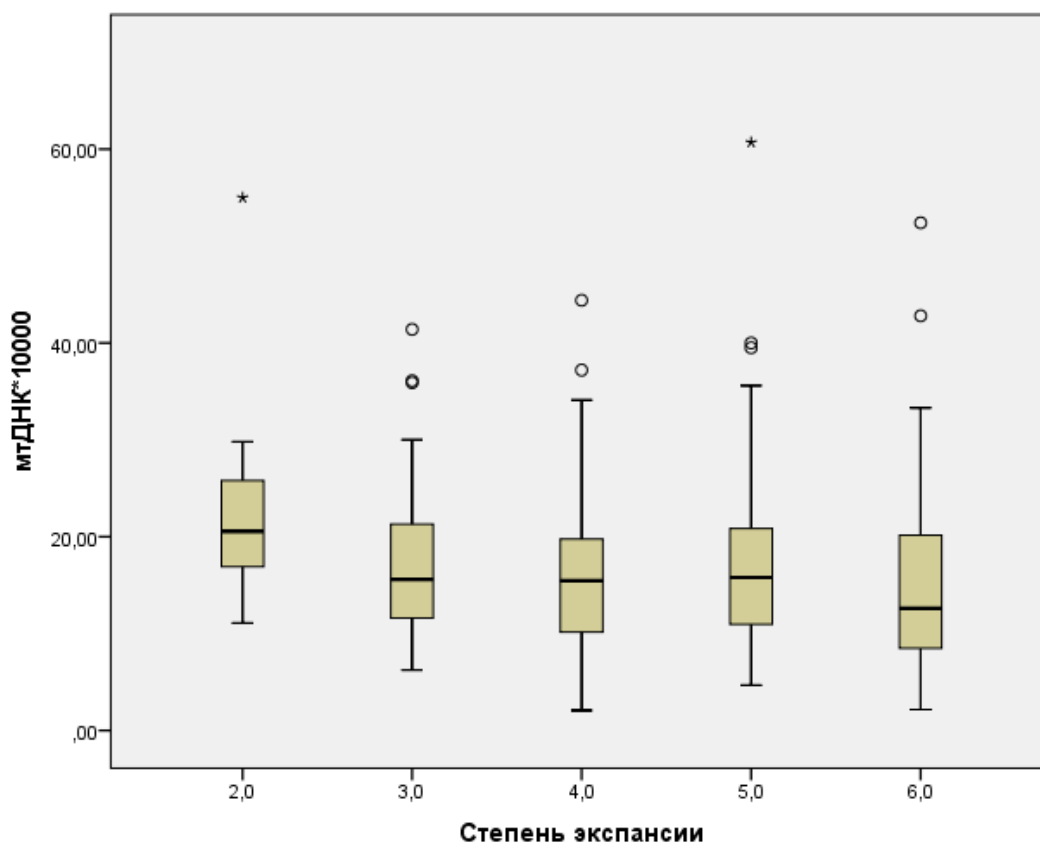


Рис. 24. Бокс-плотты кратности изменения уровня мтДНК в зависимости от степени экспансии бластоцист

При этом качество ВКМ бластоцисты не было связано с количеством копий мтДНК. Количество бластоцист с качеством ВКМ, соответствующей

степени А, составляло 179 (73,4%), Ме 15,60 (10,60; 22,10), степени В — 65 (26,6%), Ме 14,70 (10,55; 19,35), $p=0,253$ (рисунок 25). Сравнение количества копий мтДНК в клетках ТЭ показало, что бластоцисты с ТЭ, соответствующей категории отличного качества А, (100 бластоцист, 41%) имели более высокие значения мтДНК (Ме 16,85 (12,12; 22,25) по сравнению с эмбрионами, имеющие ТЭ хорошего качества В (144 бластоцист, 59%), (Ме 14,50 (9,72; 19,60), $p=0,007$. Значение корреляции по Спирмену между качеством клеток ТЭ и количеством копий мтДНК составило $-0,174$ с уровнем значимости $p=0,006$ (рисунок 26).

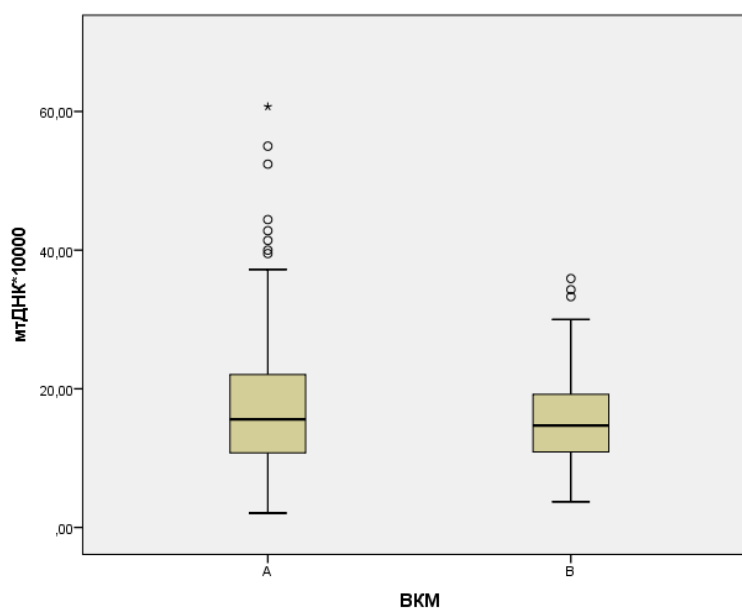


Рис. 25. Бокс-плотты кратности изменения уровня мтДНК в зависимости от качества ВКМ бластоцисты

В исследовании была также проанализирована взаимосвязь между полом эмбриона и числом копий мтДНК. Статистически значимых различий в отношении пола эмбриона и уровня мтДНК обнаружено не было. В исследование было включено 110 эмбрионов ХУ (45,1%) и 134 эмбриона ХХ (54,9%): Ме 15,55 (10,60; 20,43) против 15,30 (10,83, 21,23) соответственно, $p=0,917$ (рисунок 27).

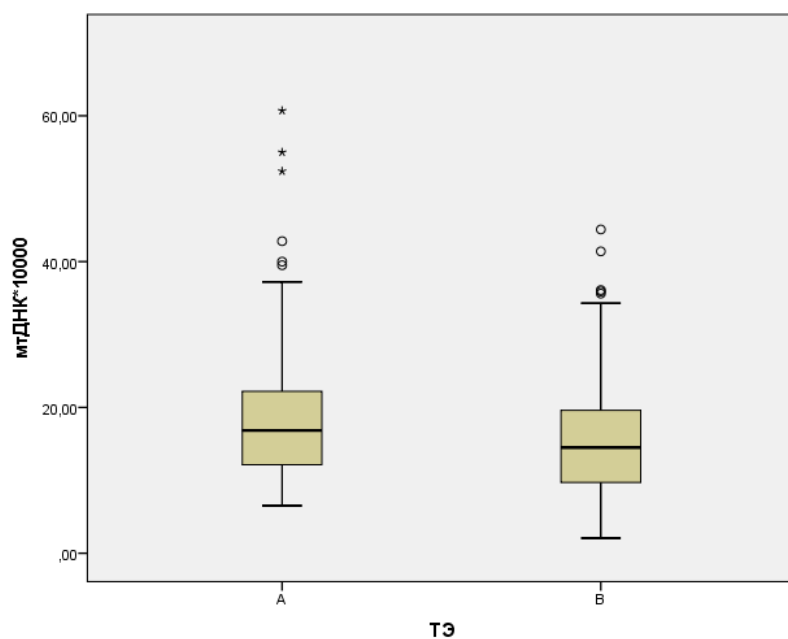


Рис. 26. Бокс-плотты кратности изменения уровня мтДНК в зависимости от качества ТЭ бластоцисты

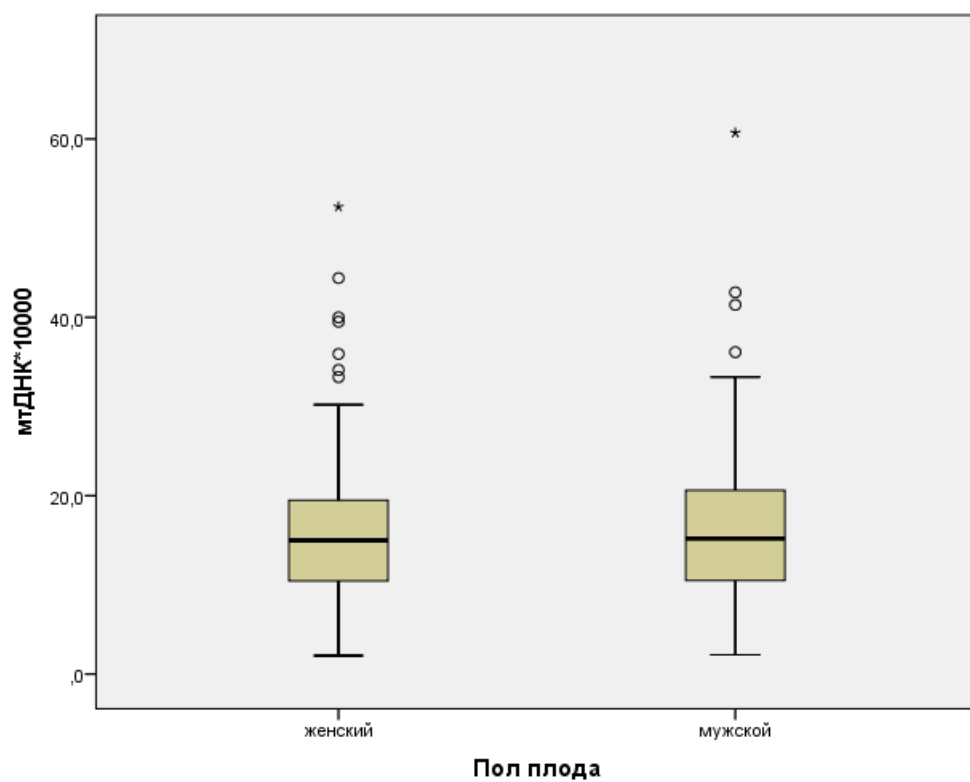


Рис. 27. Бокс-плотты кратности изменения уровня мтДНК в зависимости от пола плода

Оценка количественного уровня мтДНК в зависимости от исходов программы ВРТ

В данном исследовании средний возраст пациенток в группе с положительным результатом имплантации соответствовал $34,35 \pm 4,31$ года, а в группе с отрицательным результатом – $33,47 \pm 3,91$ года, $p=0,144$ (рисунок 28). Группу с положительным результатом имплантации составили 102 пациентки (46,8%), из них у 1 женщины была диагностирована внематочная беременность, у 9 пациенток произошел самопроизвольный выкидыш на 4–8-й неделе беременности, у 92 женщин диагностировали подтверждённая клиническая беременность. В группу с отрицательным результатом имплантации было включено 116 пациенток (53,2%), из них биохимическая беременность наступила у 5 женщин, отрицательный результат ХГ получен у 111 пациенток.

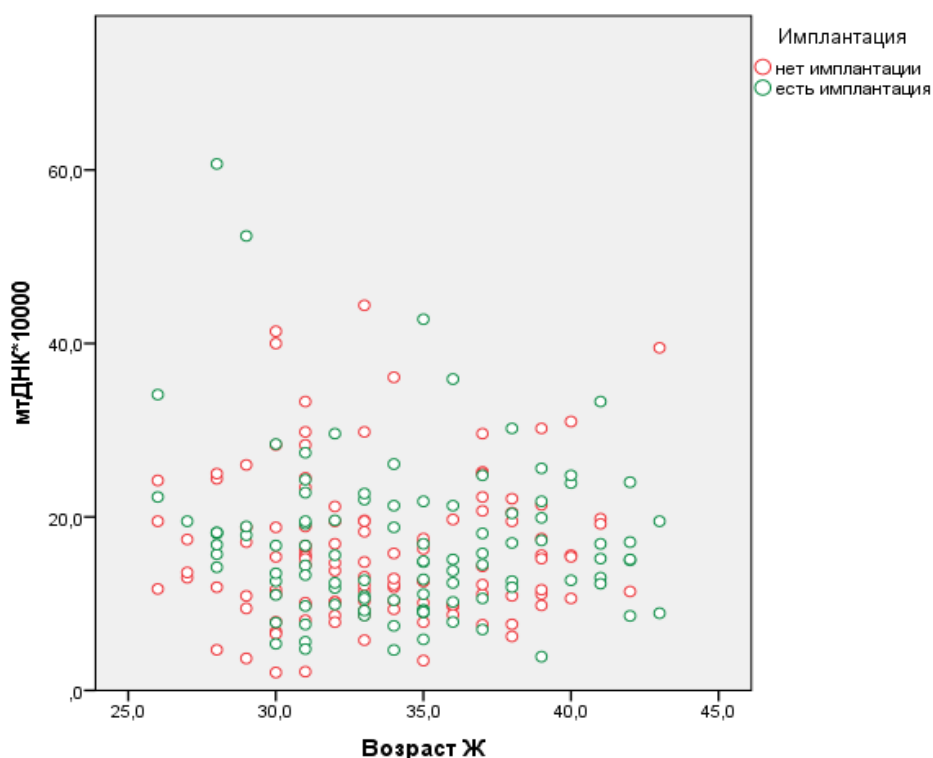


Рис. 28. Бокс-плотты кратности изменения уровня мтДНК в зависимости от возраста женщины (возраст Ж)

Существенной разницы в уровне мтДНК у пациенток в группах с положительным и отрицательным результатом имплантации получено не

было: Me 15,15 (10,60; 20,63) против 14,47 (10,23; 19,68) соответственно, $p=0,56$ (рисунок 29). В обеих группах были зафиксированы выбросы, соответствующие повышенному уровню мтДНК. Была собрана информация по исходам беременности и живорождению от 92 пациенток с подтвержденной клинической беременностью. Ранние репродуктивные потери (до 12 недель беременности) статистически значимо коррелировали с повышенным уровнем экспрессии мтДНК в клетках трофобласта, оцененных методом высокопроизводительного секвенирования: Me 21,17 против 13,17 ($p=0,048$). Частота живорождения составила 35,6%. У 92 пациенток, родивших детей, 3 эмбриона имели уровень мтДНК выше 40 копий, а в когорте пациенток с неудачной имплантацией был всего 1 эмбрион с количественным уровнем мтДНК, превышающим 40 копий на клетку.

Полученные результаты показывают, что, несмотря на некоторые статистические выбросы, уровень копийности мтДНК в клетках трофобласта может быть использован как дополнительный критерий при отборе эуплоидного эмбриона для переноса.

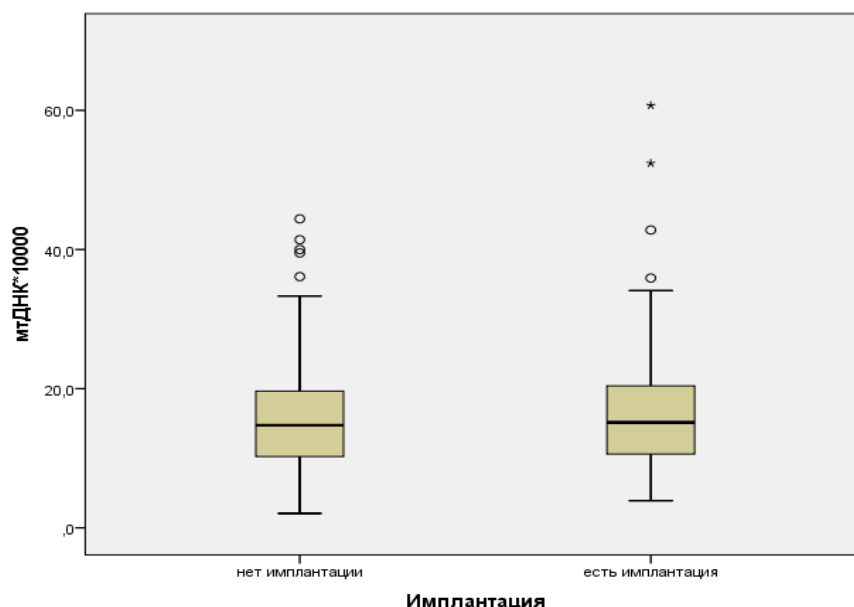


Рис. 29. Бокс-плотты кратности изменения уровня мтДНК в зависимости от наличия или отсутствия имплантации при переносе эуплоидного эмбриона в криопротоколе

4.12. Клинико-экономический анализ эффективности программ ВРТ с применением преимплантационного генетического тестирования у пар с различными факторами бесплодия

Сводные результаты после построения 20 марковских моделей, представляющих собой марковские процессы с дискретным временем, представлены в таблице 35. Всего в рамках построения моделей было рассмотрено 10 возможных попарных сценариев для пар.

Исходя из порога готовности платить 2 180 093,06 руб., наиболее эффективными и ресурсосберегающими сценариями являются: применение преимплантационного генетического тестирования у женщин в возрасте 22–30 лет, у женщин в возрасте 31–36 лет, у женщин до 35 лет с НГЭ и у женщин до 35 лет с СПКЯ, причем на всех пяти годах моделирования. Также применение преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) является ресурсосберегающим сценарием в группе мужчин с нормозооспермией на всех пяти годах моделирования и в группе женщин до 35 лет с НБ только на первом и втором году моделирования. Остальные сценарии являются клинически эффективными, однако с точки зрения порога готовности платить НЕ являются ресурсосберегающими.

Таблица 35. Сводные результаты клинико-экономического анализа с применением марковских процессов с дискретным временем

Год	Число живорождений (нарастающим итогом) за 5 лет		Кумулятивные затраты на 1 живорождение, руб.	
	с применением ПГТ	без применения ПГТ	с применением ПГТ	без применения ПГТ
	Женщины 22-30 лет			
1-й	368,00	280,00	1 534 752,72	1 147 042,86
2-й	544,64	432,04	1 692 375,97	1 278 621,98
3-й	629,43	514,60	1 763 888,86	1 350 638,47
4-й	670,13	559,43	1 796 911,55	1 389 984,43
5-й	689,66	583,70	1 812 373,90	1 411 447,02
	Женщины 31-36 лет			
1-й	333,00	290,00	1 696 063,06	1 107 489,66
2-й	507,49	445,73	1 855 208,09	1 232 145,29
3-й	598,93	529,36	1 929 892,04	1 300 306,19
4-й	646,84	574,26	1 966 102,27	1 337 423,98

Год	Число живорождений (нарастающим итогом) за 5 лет		Кумулятивные затраты на 1 живорождение, руб.	
	с применением ПГТ	без применения ПГТ	с применением ПГТ	без применения ПГТ
5-й	671,94	598,38	1 984 127,73	1 357 564,14
Женщины 37-42 лет				
1-й	281,00	120,00	2 009 925,27	2 676 433,33
2-й	432,74	196,80	2 243 546,45	3 068 106,50
3-й	514,68	245,95	2 367 423,33	3 284 428,73
4-й	558,93	277,41	2 433 395,32	3 407 652,91
5-й	582,82	297,54	2 468 662,91	3 479 837,10
Женщины до 35 лет с НГЭ				
1-й	374,00	260,00	1 510 131,02	1 235 276,92
2-й	554,64	413,40	1 655 747,16	1 351 812,48
3-й	641,89	503,91	1 723 149,46	1 415 969,87
4-й	684,03	557,30	1 754 753,55	1 451 828,54
5-й	704,39	588,81	1 769 725,84	1 472 143,57
Женщины до 35 лет с СПКЯ				
1-й	350,00	277,00	1 613 682,86	1 159 465,70
2-й	531,65	438,49	1 752 848,40	1 262 008,47
3-й	625,93	532,64	1 816 876,52	1 318 423,58
4-й	674,86	587,53	1 847 440,89	1 349 858,17
5-й	700,25	619,53	1 862 465,40	1 367 573,85
Женщины до 35 лет с НБ				
1-й	310,00	210,00	1 821 900,00	1 529 390,48
2-й	434,00	287,70	2 199 293,57	1 998 254,71
3-й	483,60	316,45	2 363 798,46	2 266 834,98
4-й	503,44	327,09	2 433 537,86	2 407 691,26
5-й	511,38	331,02	2 462 480,75	2 476 526,13
Мужчины с ОАТ				
1-й	255,00	170,00	2 214 858,82	1 889 247,06
2-й	360,06	258,40	2 737 201,59	2 274 554,02
3-й	403,34	304,37	3 013 143,60	2 504 223,15
4-й	421,18	328,27	3 150 523,20	2 637 538,42
5-й	428,53	340,70	3 215 647,67	2 713 103,82
Мужчины с биопсией яичка				
1-й	170,00	110,00	3 322 288,24	2 919 745,45
2-й	226,10	150,70	4 571 268,77	4 027 970,01
3-й	244,61	165,76	5 204 048,55	4 662 796,10
4-й	250,72	171,33	5 493 728,02	4 995 729,12
5-й	252,74	173,39	5 616 417,13	5 158 429,73
Мужчины с тератозооспермией				
1-й	207,00	205,00	2 728 449,28	1 566 692,68
2-й	321,47	304,43	3 150 102,74	1 893 746,37

Год	Число живорождений (нарастающим итогом) за 5 лет		Кумулятивные затраты на 1 живорождение, руб.	
	с применением ПГТ	без применения ПГТ	с применением ПГТ	без применения ПГТ
3-й	384,77	352,65	3 381 230,69	2 087 595,40
4-й	419,78	376,03	3 508 173,12	2 198 023,01
5-й	439,14	387,38	3 578 015,84	2 258 770,24
Мужчины с нормозооспермией с ПГТ				
1-й	397,00	270,00	1 422 642,32	1 189 525,93
2-й	576,44	421,20	1 570 589,28	1 319 153,75
3-й	657,55	505,87	1 649 872,87	1 396 753,33
4-й	694,21	553,29	1 690 685,99	1 442 623,86
5-й	710,78	579,84	1 710 991,54	1 469 427,68

В таблице 36 представлены результаты расчета кумулятивной стоимости 1 добавленного живорождения при моделируемом сценарии относительно базового сценария за пятилетний цикл при моделировании на 1000 пар.

Таблица 36. Результаты расчета кумулятивной стоимости 1 добавленного живорождения при моделируемом сценарии относительно базового сценария за пятилетний цикл при моделировании на 1000 пар

Исследуемая группа	Стоимость 1 добавленного живорождения (ICER), руб.	Количество добавленных живорождений за 5 лет
Женщины 22–30 лет с ПГТ	3 786,21	105,89
Женщины 31–36 лет с ПГТ	5 917,04	73,56
Женщины 37–42 лет с ПГТ	-3 544,51	285,28
Женщины до 35 лет с НГЭ с ПГТ	2 574,72	115,58
Женщины до 35 лет с СПКЯ с ПГТ	6 130,92	80,72
Женщины до 35 лет с НБ с ПГТ	-77,88	180,35
Мужчины с ОАТ с ПГТ	5 722,15	87,82
Мужчины с биопсией яичка с ПГТ	5 772,03	79,35
Мужчины с тератозооспермией с ПГТ	25 486,76	51,76
Мужчины с нормозооспермией с ПГТ	1 844,80	130,94

В качестве наиболее затрато-эффективных сценариев по результатам моделирования выделяется применение преимплантационного генетического тестирования в группе женщин в возрасте 37–42 лет с ПГТ и в группе

женщин до 35 лет с НБ с ПГТ. Важно, что эти сценарии не только являются ресурсосберегающими с точки зрения готовности платить, но и сохраняют средства обязательного медицинского страхования параллельно со значимой клинической эффективностью.

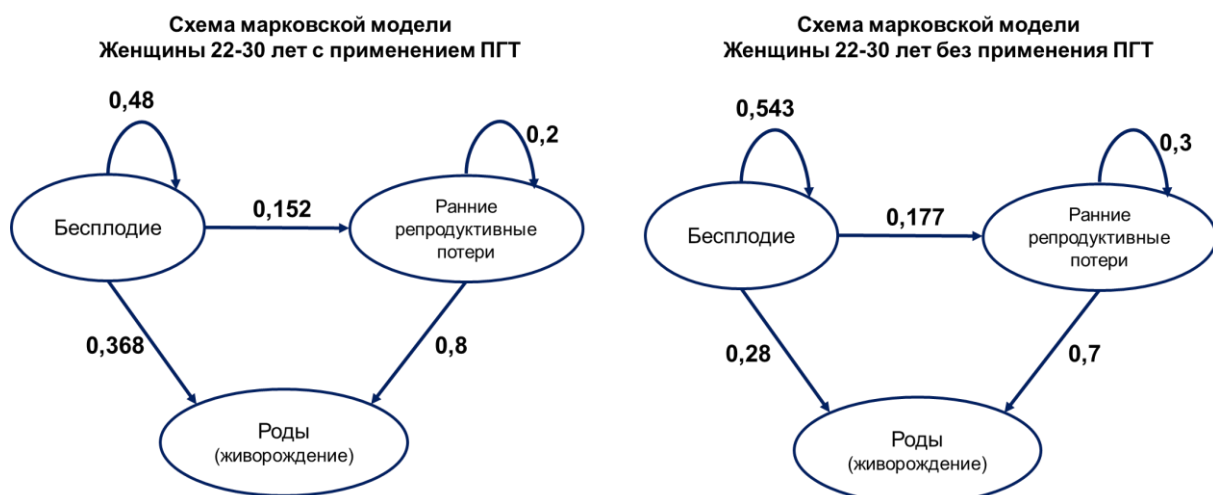
Остальные сценарии характеризуются выраженной клинической эффективностью и низкой стоимостью 1 добавленного живорождения, за исключением применения преимплантационного генетического тестирования в группе мужчин с тератозооспермией с ПГТ – минимальное количество добавленных живорождений и максимальная стоимость 1 добавленного живорождения.

Далее представлены подробные результаты для каждого из сценариев моделирования — всего 20 марковских процессов с дискретным временем для пятилетнего периода моделирования на 1000 пар.

Для каждого сценария представлены:

- схема перехода состояний с вероятностями каждого перехода;
- график числа живорождений (нарастающим итогом) в пятилетнем периоде для базового и моделируемого сценариев в сравнении;
- график кумулятивных затрат на 1 живорождение (нарастающим итогом) в рублях в пятилетнем периоде для базового и моделируемого сценариев в сравнении.

Сценарий 1. Оценка клинико-экономической эффективности применения преимплантационного генетического тестирования в группе женщин в возрасте 22–30 лет



При применении ПГТ вероятность перехода из состояния бесплодия в состояние ранних репродуктивных потерь составляет 0,152. Вероятность перехода бесплодия в роды (живорождение) – 0,368. Вероятность сохранения бесплодного состояния – 0,48. Вероятность перехода из состояния ранних репродуктивных потерь в роды (живорождение) составляет 0,8. Вероятность сохранения состояния ранних репродуктивных потерь – 0,2.

По результатам моделирования при применении ПГТ количество живорождений в данной группе за 5 лет возрастает с 368 за 1-й год до 689,66 на 5-й год, что более чем на 100 живорождений больше на каждый год моделирования по сравнению с базовым сценарием.

Затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) составляют от 1,534 млн. руб. на 1-м году до 1,812 млн. руб. к 5-му году (рисунок 30). Для сравнения – сценарий без применения ПГТ характеризуется затратами от 1,147 млн. руб. на 1 живорождение на 1-м году до 1,411 млн. руб. к 5-му году. Таким образом, вместе с нарастающим ростом числа живорождений с применением ПГТ одновременно возрастают и затраты на 1 живорождение, в среднем на 400 тыс. руб. по сравнению с базовым сценарием.

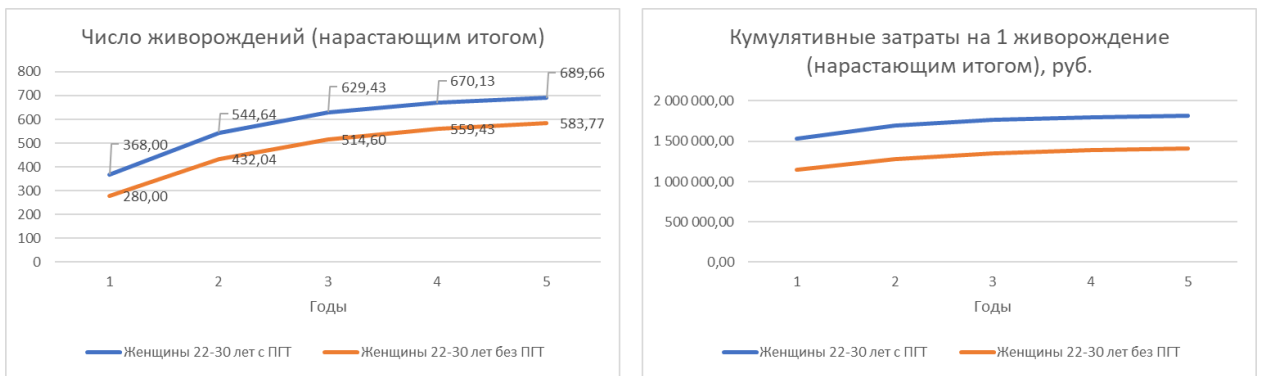
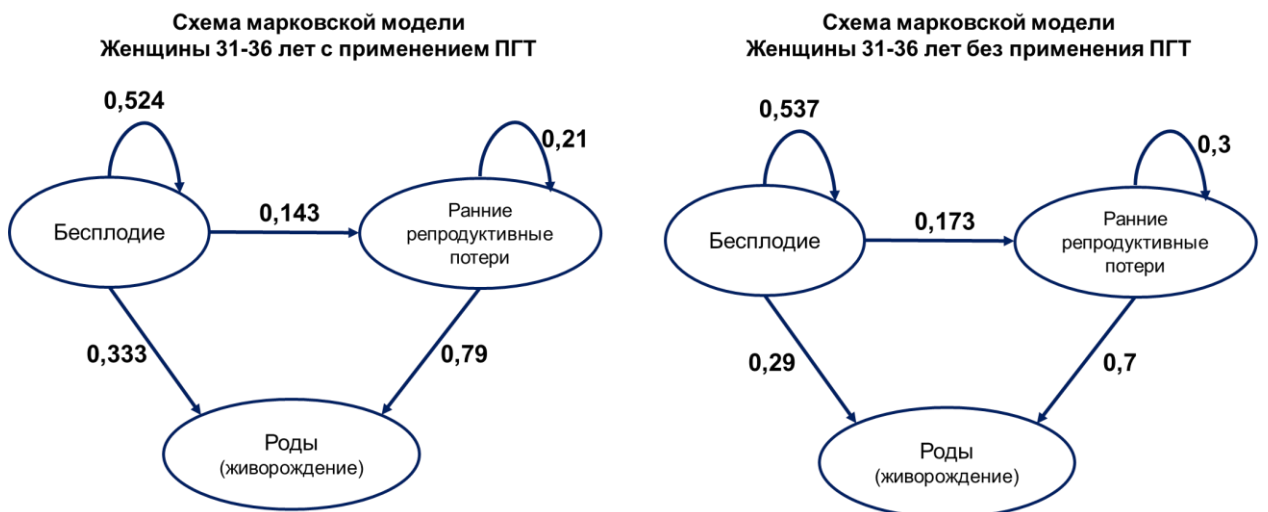


Рис. 30. Число живорождений и затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) для сценария 1

Таким образом, данный сценарий характеризуется высокой клинической эффективностью, но не является затратно-эффективным. Однако при этом с точки зрения порога готовности платить данный сценарий является ресурсосберегающим.

Сценарий 2. Оценка клинико-экономической эффективности применения преимплантационного генетического тестирования в группе женщин в возрасте 31–36 лет



При применении ПГТ вероятность перехода из состояния бесплодия в состояние ранних репродуктивных потерь составляет 0,143. Вероятность перехода бесплодия в роды (живорождение) – 0,333. Вероятность сохранения

бесплодного состояния – 0,524. Вероятность перехода из состояния ранних репродуктивных потерь в роды (живорождение) – 0,79. Вероятность сохранения состояния ранних репродуктивных потерь составляет 0,21.

По результатам моделирования при применении ПГТ количество живорождений в данной группе за 5 лет возрастает с 333 за 1-й год до 671,94 на 5-й год, что более чем на 70 живорождений больше на каждый год моделирования по сравнению с базовым сценарием.

Затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) составляют от 1,696 млн. руб. на 1-м году до 1,984 млн. руб. к 5-му году (рисунок 31). Для сравнения – сценарий без применения ПГТ характеризуется затратами от 1,107 млн. руб. на 1 живорождение на 1-м году до 1,357 млн. руб. к 5-му году. Таким образом, вместе с нарастающим ростом числа живорождений с применением ПГТ одновременно возрастают и затраты на 1 живорождение, в среднем на 500 тыс. руб. по сравнению с базовым сценарием.

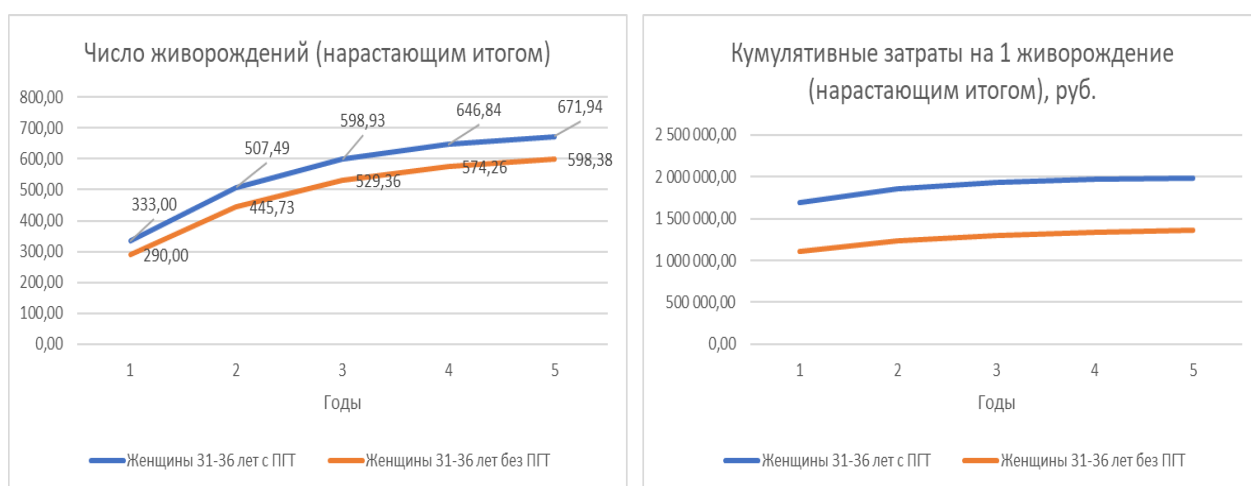
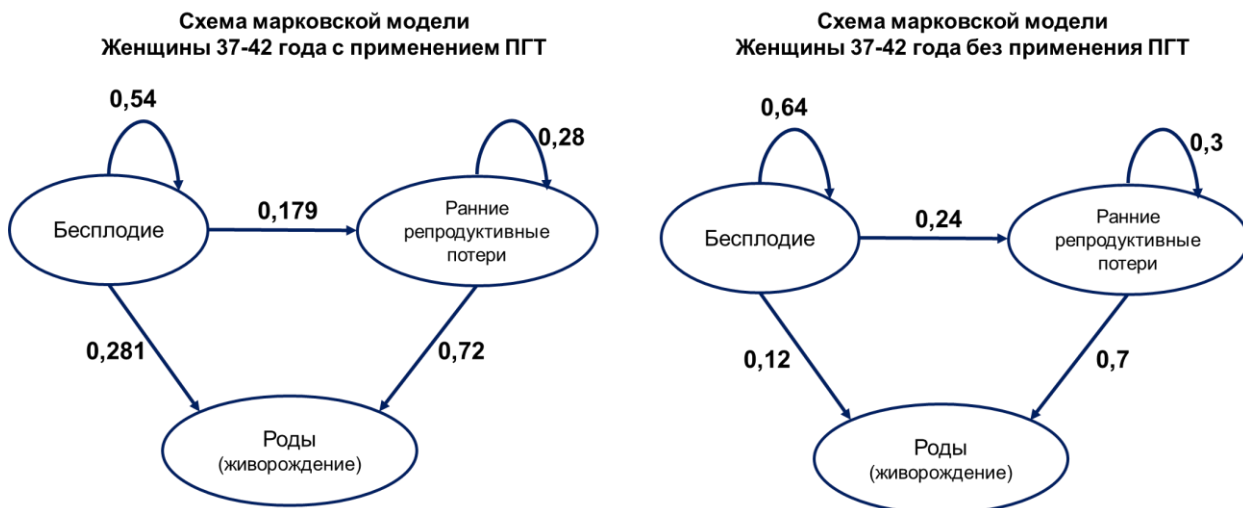


Рис. 31. Число живорождений и затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) для сценария 2

Таким образом, данный сценарий характеризуется высокой клинической эффективностью, но не является затратно-эффективным. При этом с точки зрения порога готовности платить данный сценарий является ресурсосберегающим.

Сценарий 3. Оценка клинико-экономической эффективности применения преимплантационного генетического тестирования в группе женщин в возрасте 37–42 года



При применении ПГТ вероятность перехода из состояния бесплодия в состояние ранних репродуктивных потерь составляет 0,179. Вероятность перехода бесплодия в роды (живорождение) – 0,281. Вероятность сохранения бесплодного состояния – 0,54. Вероятность перехода из состояния ранних репродуктивных потерь в роды (живорождение) составляет 0,72. Вероятность сохранения состояния ранних репродуктивных потерь – 0,28.

По результатам моделирования при применении ПГТ количество живорождений в данной группе за 5 лет возрастает с 281 за 1-й год до 582,82 на 5-й год, что более чем на 100 живорождений больше на каждый год моделирования по сравнению с базовым сценарием (рисунок 32).

Затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) составляют от 2,010 млн. руб. на 1-м году до 2,469 млн. руб. к 5-му году. Для сравнения – сценарий без применения ПГТ характеризуется затратами от 2,676 млн. руб. на 1 живорождение на 1-м году до 3,480 млн. руб. к 5-му году. Таким образом, вместе с нарастающим ростом числа живорождений с применением ПГТ одновременно сокращаются затраты на 1

живорождение, в среднем на 600 тыс. руб. по сравнению с базовым сценарием.

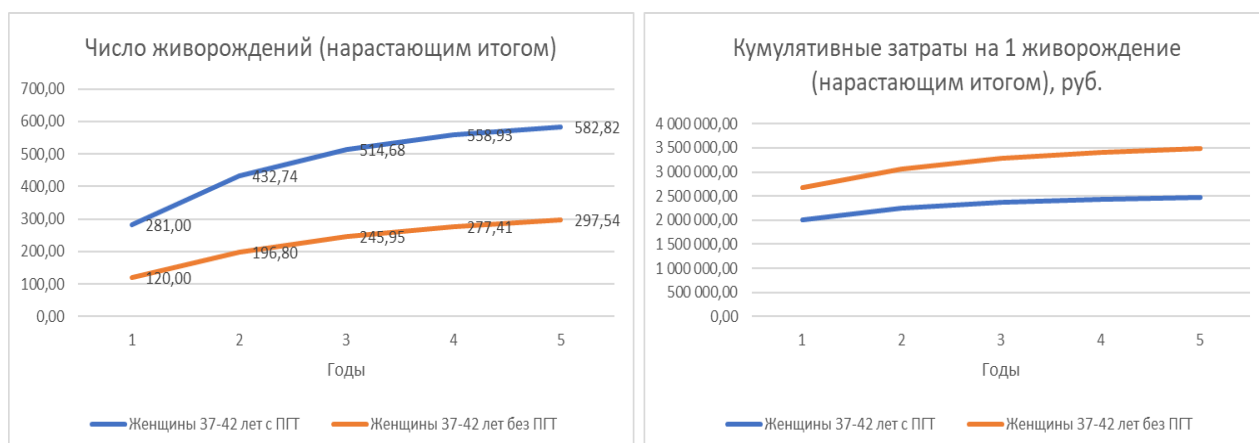
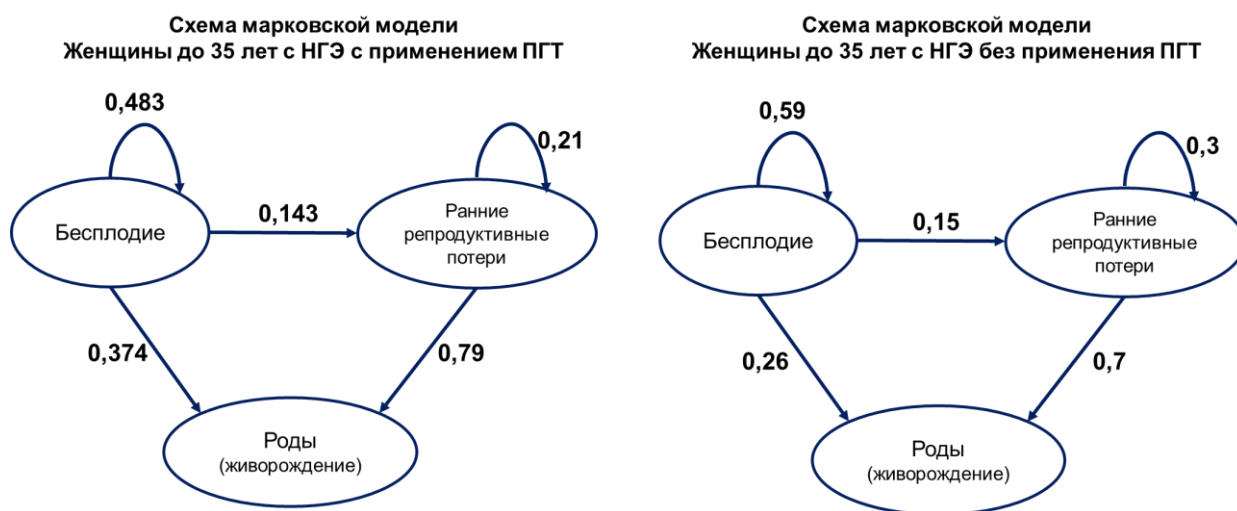


Рис. 32. Число живорождений и затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) для сценария 3

Данный сценарий характеризуется высокой клинической эффективностью и высокой затратной эффективностью, поскольку уже с первого года реализации позволяет не только добиваться дополнительного количества живорождений, но и сохранять средства обязательного медицинского страхования, которые могут быть направлены на другие, менее затрато-эффективные сценарии и привести к повышению затратной эффективности других сценариев. С точки зрения порога готовности платить, данный сценарий является ресурсосберегающим. Таким образом, данный сценарий является наиболее оптимальным для реализации в практическом здравоохранении, в том числе в масштабе всей системы здравоохранения Российской Федерации.

Сценарий 4. Оценка клинико-экономической эффективности применения преимплантационного генетического тестирования в группе женщин в возрасте до 35 лет с НГЭ I и II стадии распространения



При применении ПГТ вероятность перехода из состояния бесплодия в состояние ранних репродуктивных потерь составляет 0,143. Вероятность перехода бесплодия в роды (живорождение) – 0,374. Вероятность сохранения бесплодного состояния – 0,483. Вероятность перехода из состояния ранних репродуктивных потерь в роды (живорождение) составляет 0,79. Вероятность сохранения состояния ранних репродуктивных потерь – 0,21.

По результатам моделирования при применении ПГТ количество живорождений в данной группе за 5 лет возрастает с 374 за 1-й год до 704,39 на 5-й год, что более чем на 140 живорождений больше на каждый год моделирования по сравнению с базовым сценарием.

Затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) составляют от 1,510 млн. руб. на 1-м году до 1,770 млн. руб. к 5-му году. Для сравнения – сценарий без применения ПГТ характеризуется затратами от 1,235 млн. руб. на 1 живорождение на 1-м году до 1,472 млн. руб. к 5-му году (рисунок 33). Таким образом, вместе с нарастающим ростом числа живорождений с применением ПГТ одновременно возрастают и затраты на 1 живорождение, в среднем на 300 тыс. руб. по сравнению с базовым сценарием.

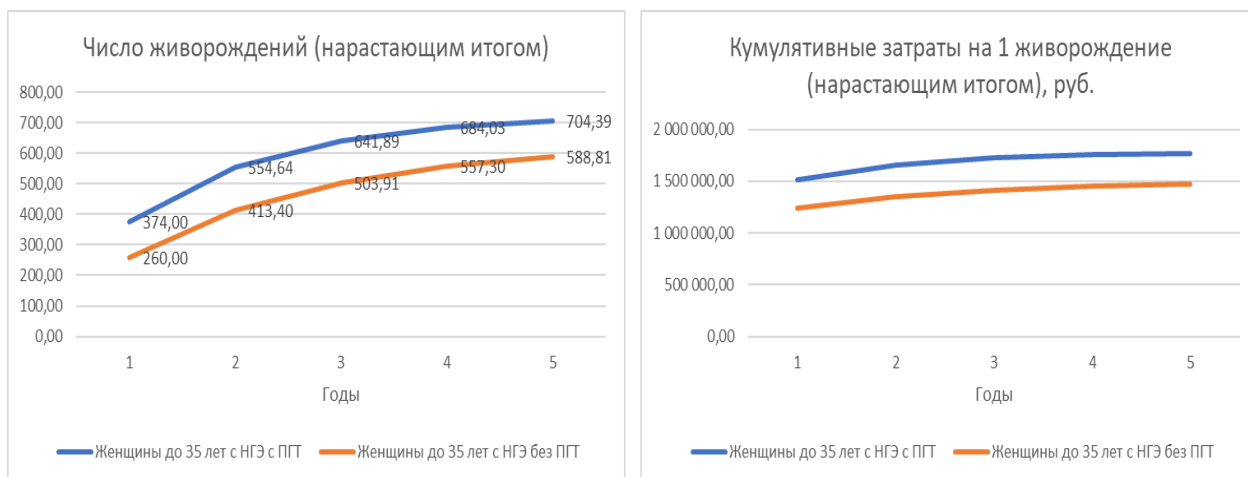
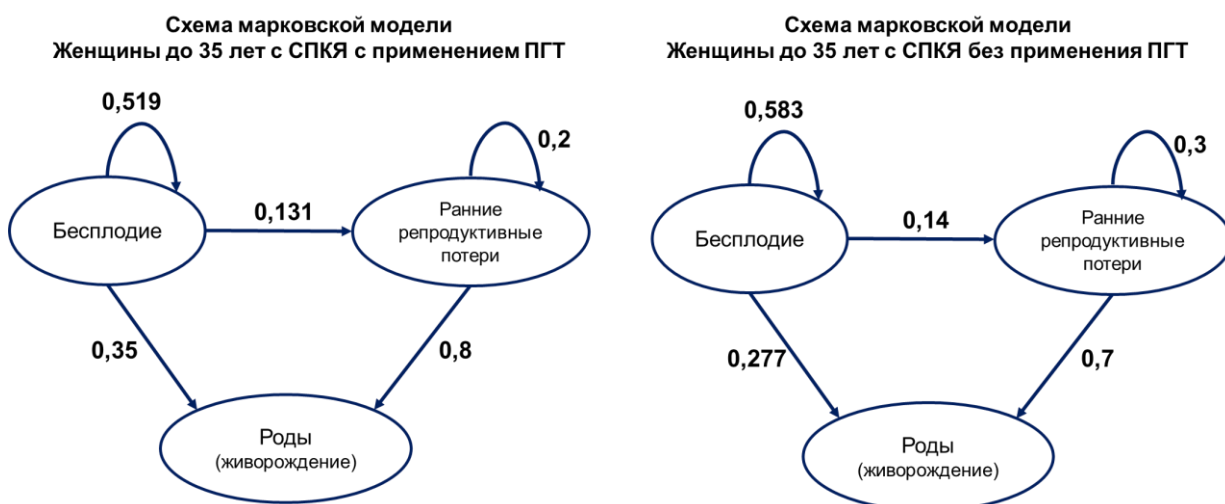


Рис. 33. Число живорождений и затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) для сценария 4

Таким образом, данный сценарий характеризуется высокой клинической эффективностью, но не является затратно-эффективным. При этом с точки зрения порога готовности платить данный сценарий является ресурсосберегающим.

Сценарий 5. Оценка клинико-экономической эффективности применения преимплантационного генетического тестирования в группе женщин в возрасте до 35 лет с СПКЯ



При применении ПГТ вероятность перехода из состояния бесплодия в состояние ранних репродуктивных потерь составляет 0,131. Вероятность перехода бесплодия в роды (живорождение) – 0,35. Вероятность сохранения бесплодного состояния – 0,519. Вероятность перехода из состояния ранних

репродуктивных потерь в роды (живорождение) составляет 0,8. Вероятность сохранения состояния ранних репродуктивных потерь – 0,2.

По результатам моделирования при применении ПГТ количество живорождений в данной группе за 5 лет возрастает с 350 за 1-й год до 700,25 на 5-й год, что более чем на 60 живорождений больше на каждый год моделирования по сравнению со сценарием без применения ПГТ.

Затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) составляют от 1,613 млн. руб. на 1-м году до 1,862 млн. руб. к 5-му году (рисунок 34). Для сравнения – сценарий без применения ПГТ характеризуется затратами от 1,159 млн. руб. на 1 живорождение на 1-м году до 1,367 млн. руб. к 5-му году. Таким образом, вместе с нарастающим ростом числа живорождений с применением ПГТ одновременно возрастают и затраты на 1 живорождение, в среднем на 500 тыс. руб. по сравнению с базовым сценарием.

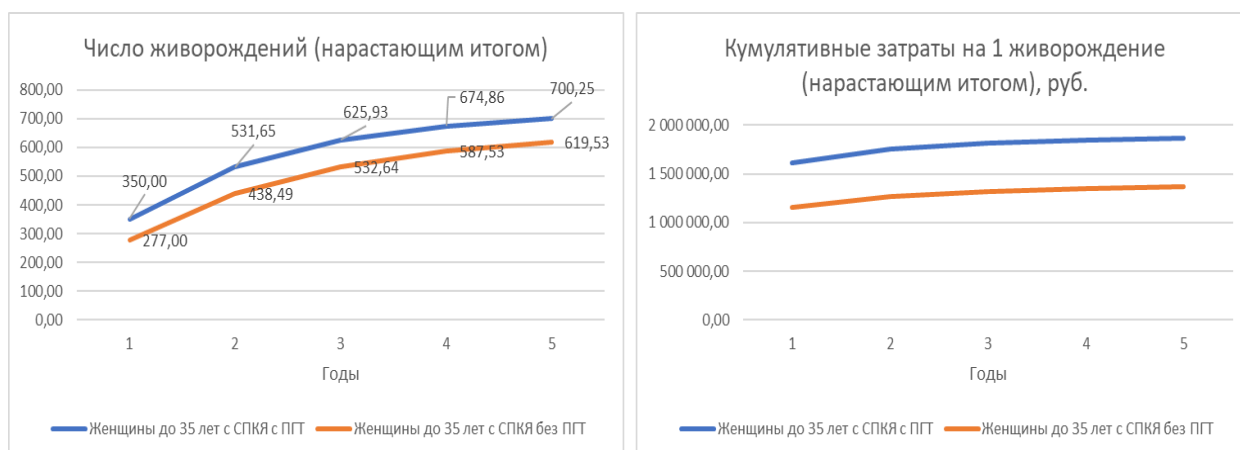
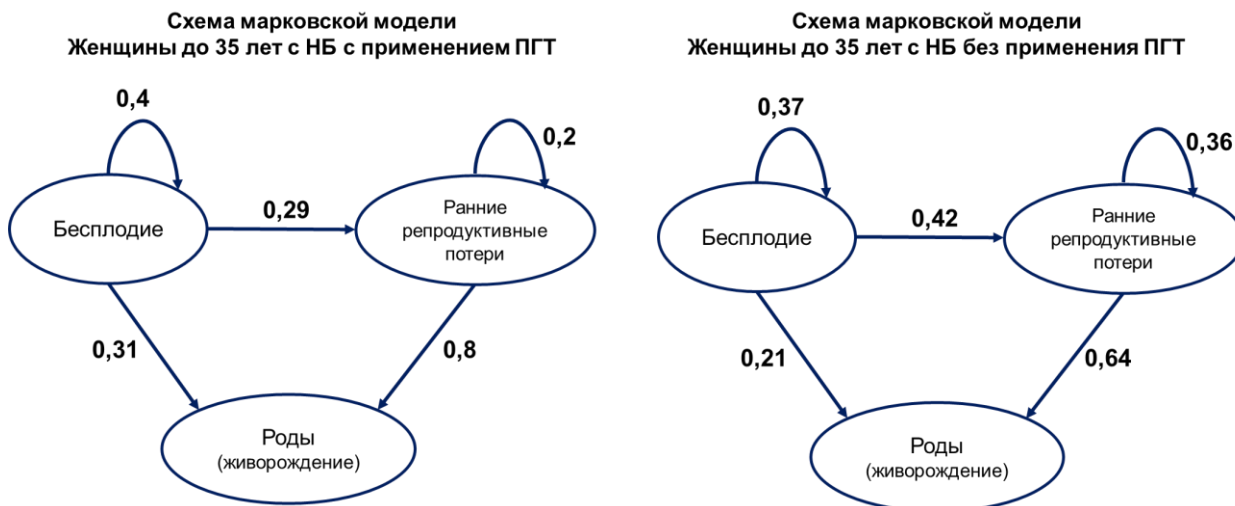


Рис. 34. Число живорождений и затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) для сценария 5

Таким образом, данный сценарий характеризуется высокой клинической эффективностью, но не является затратно-эффективным. При этом, с точки зрения порога готовности платить данный сценарий является ресурсосберегающим.

Сценарий 6. Оценка клинико-экономической эффективности применения преимплантационного генетического тестирования в группе женщин в возрасте до 35 лет с НБ



При применении ПГТ вероятность перехода из состояния бесплодия в состояние ранних репродуктивных потерь составляет 0,29. Вероятность перехода бесплодия в роды (живорождение) – 0,31. Вероятность сохранения бесплодного состояния – 0,4. Вероятность перехода из состояния ранних репродуктивных потерь в роды (живорождение) составляет 0,8. Вероятность сохранения состояния ранних репродуктивных потерь – 0,2.

По результатам моделирования при применении ПГТ количество живорождений в данной группе за 5 лет возрастает с 310 за 1-й год до 511,38 на 5-й год, что более чем на 170 живорождений больше на каждый год моделирования по сравнению со сценарием без применения ПГТ.

Затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) составляют от 1,821 млн. руб. на 1-м году до 2,462 млн. руб. к 5-му году (рисунок 35). Для сравнения — сценарий без применения ПГТ характеризуется затратами от 1,529 млн. руб. на 1 живорождение на 1-м году до 2,476 млн. руб. к 5-му году. Таким образом, вместе с нарастающим ростом числа живорождений с применением ПГТ затраты на 1 живорождение сначала незначительно возрастают, а к концу пятилетнего периода уже

наблюдается тенденция к затратной эффективности, то есть к сохранению финансовых ресурсов.

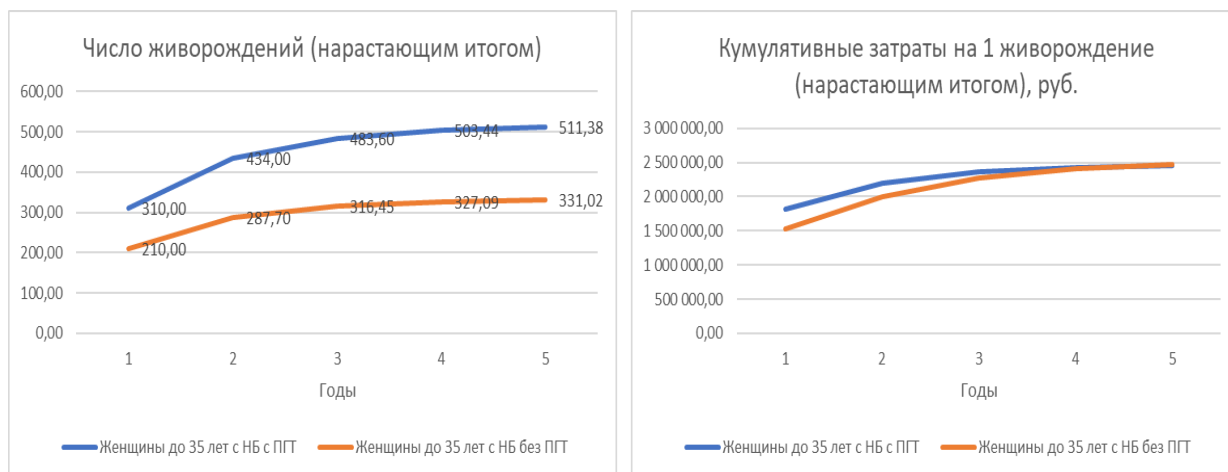
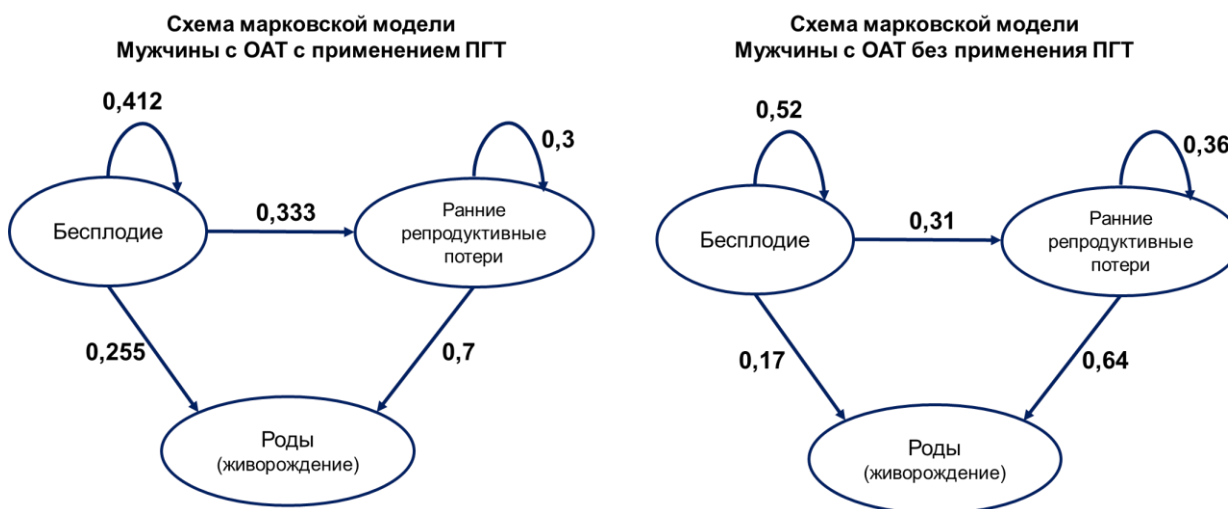


Рис. 35. Число живорождений и затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) для сценария б

Таким образом, данный сценарий характеризуется высокой клинической эффективностью и затратной эффективностью. Также с точки зрения порога готовности платить данный сценарий является ресурсосберегающим.

Сценарий 7. Оценка клинико-экономической эффективности применения преимплантационного генетического тестирования в группе мужчин с ОАТ



При применении ПГТ вероятность перехода из состояния бесплодия в состояние ранних репродуктивных потерь составляет 0,333. Вероятность перехода бесплодия в роды (живорождение) – 0,255. Вероятность сохранения бесплодного состояния – 0,412. Вероятность перехода из состояния ранних репродуктивных потерь в роды (живорождение) составляет 0,7. Вероятность сохранения состояния ранних репродуктивных потерь – 0,3.

По результатам моделирования при применении ПГТ количество живорождений в данной группе за 5 лет возрастает с 255 за 1-й год до 428,53 на 5-й год, что более чем на 90 живорождений больше на каждый год моделирования по сравнению со сценарием без применения ПГТ (рисунок 36).

Затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) составляют от 2,215 млн. руб. на 1-м году до 3,216 млн. руб. к 5-му году. Для сравнения – сценарий без применения ПГТ характеризуется затратами от 1,889 млн. руб. на 1 живорождение на 1-м году до 2,713 млн. руб. к 5-му году. Таким образом, вместе с нарастающим ростом числа живорождений с применением ПГТ одновременно возрастают и затраты на 1 живорождение, в среднем на 500 тыс. рублей по сравнению с базовым сценарием.

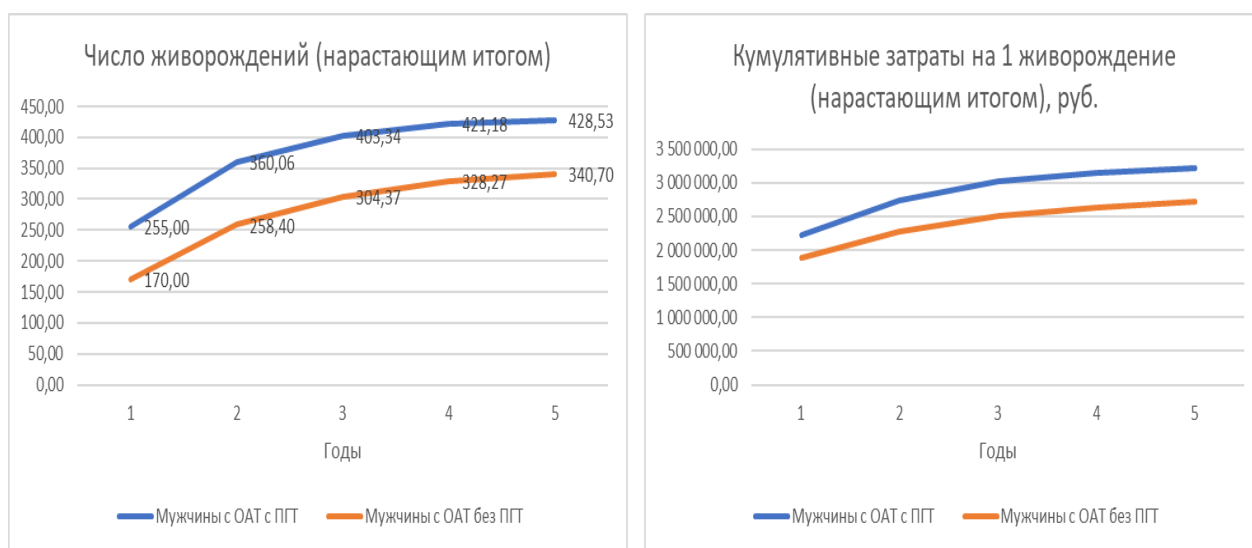
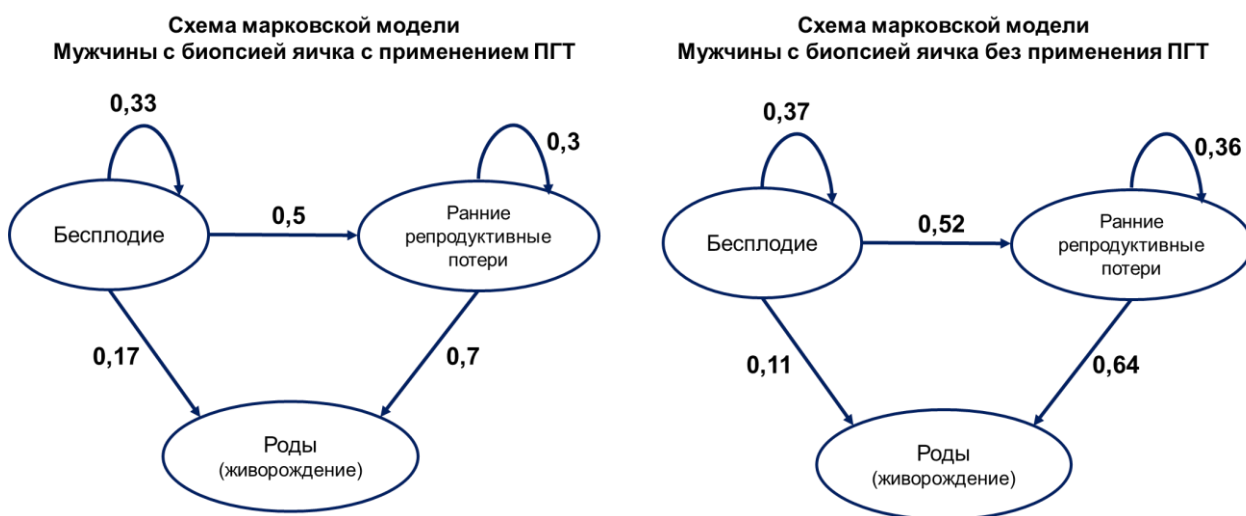


Рис. 36. Число живорождений и затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) для сценария 7

Таким образом, данный сценарий характеризуется клинической эффективностью, но не является затратно-эффективным. При этом с точки зрения порога готовности платить данный сценарий является ресурсосберегающим.

Сценарий 8. Оценка клинико-экономической эффективности применения преимплантационного генетического тестирования в группе мужчин с биопсией яичка

При применении ПГТ вероятность перехода из состояния бесплодия в состояние ранних репродуктивных потерь составляет 0,5. Вероятность перехода бесплодия в роды (живорождение) – 0,17. Вероятность сохранения бесплодного состояния – 0,33. Вероятность перехода из состояния ранних репродуктивных потерь в роды (живорождение) составляет 0,7. Вероятность сохранения состояния ранних репродуктивных потерь – 0,3.



По результатам моделирования при применении ПГТ количество живорождений в данной группе за 5 лет возрастает со 170 за 1-й год до 252,74 на 5-й год, что более чем на 60 живорождений больше на каждый год моделирования по сравнению со сценарием без применения ПГТ (рисунок 37).

Затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) составляют от 3,322 млн. руб. на 1-м году до 5,616 млн. руб. к 5-му

году. Для сравнения – сценарий без применения ПГТ характеризуется затратами от 2,919 млн. руб. на 1 живорождение на 1-м году до 5,158 млн. руб. к 5-му году. Таким образом, вместе с нарастающим ростом числа живорождений с применением ПГТ одновременно возрастают и затраты на 1 живорождение, в среднем на 500 тыс. руб. по сравнению с базовым сценарием.

Таким образом, данный сценарий характеризуется клинической эффективностью, но не является затрато-эффективным. Более того, данный сценарий характеризуется превышением порога готовности платить, то есть не является ресурсосберегающим.



Рис. 37. Число живорождений и затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) для сценария 8

Сценарий 9. Оценка клинико-экономической эффективности применения преимплантационного генетического тестирования в группе мужчин с тератозооспермией

Схема марковской модели
Мужчины с тератозооспермией с применением ПГТ

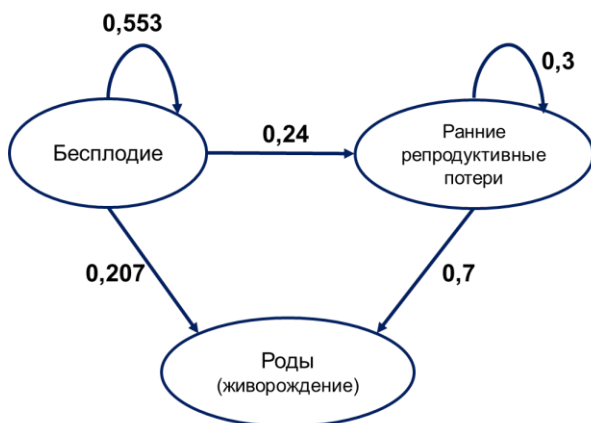
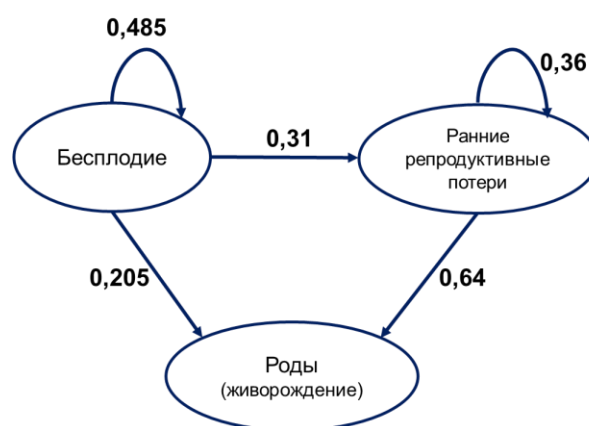


Схема марковской модели
Мужчины с тератозооспермией без применения ПГТ



При применении ПГТ вероятность перехода из состояния бесплодия в состояние ранних репродуктивных потерь составляет 0,24. Вероятность перехода бесплодия в роды (живорождение) – 0,207. Вероятность сохранения бесплодного состояния – 0,553. Вероятность перехода из состояния ранних репродуктивных потерь в роды (живорождение) составляет 0,7. Вероятность сохранения состояния ранних репродуктивных потерь – 0,3.

По результатам моделирования при применении ПГТ количество живорождений в данной группе за 5 лет возрастает с 207 за 1-й год до 439,14 на 5-й год, что более чем на 30 живорождений больше на каждый год моделирования по сравнению со сценарием без применения ПГТ (рисунок 38).

Затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) составляют от 2,728 млн. руб. на 1-м году до 3,578 млн. руб. к 5-му году. Для сравнения – сценарий без применения ПГТ характеризуется затратами от 1,567 млн. руб. на 1 живорождение на 1-м году до 2,259 млн. рублей к 5-му году. Таким образом, вместе с нарастающим ростом числа живорождений с применением ПГТ одновременно возрастают и затраты на 1 живорождение, в среднем на 1 300 тыс. руб. по сравнению с базовым сценарием.

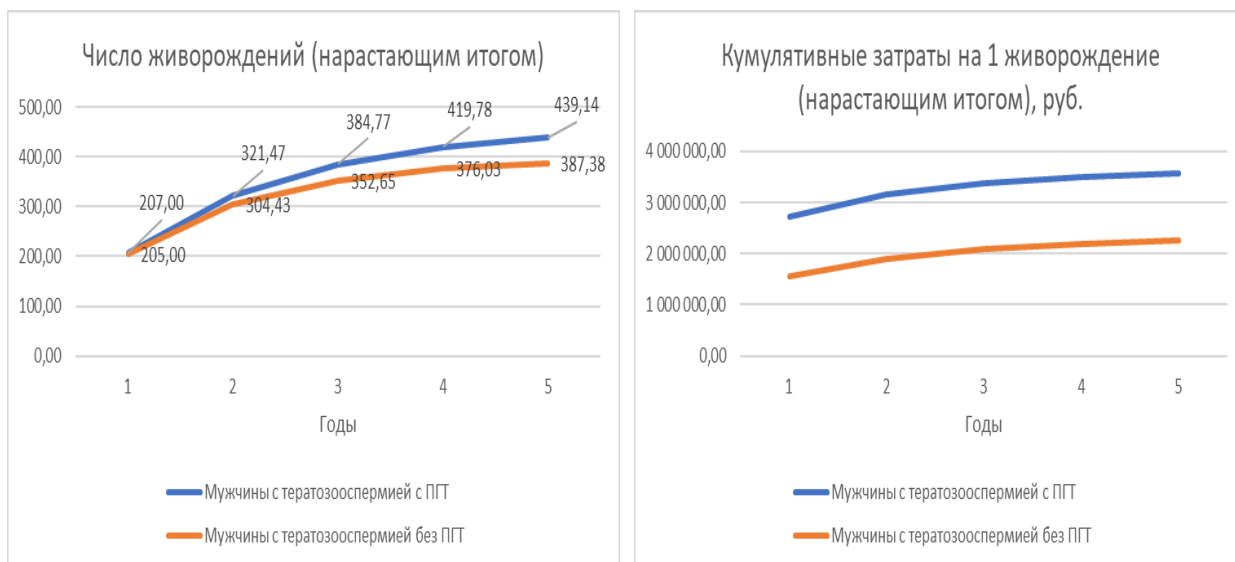
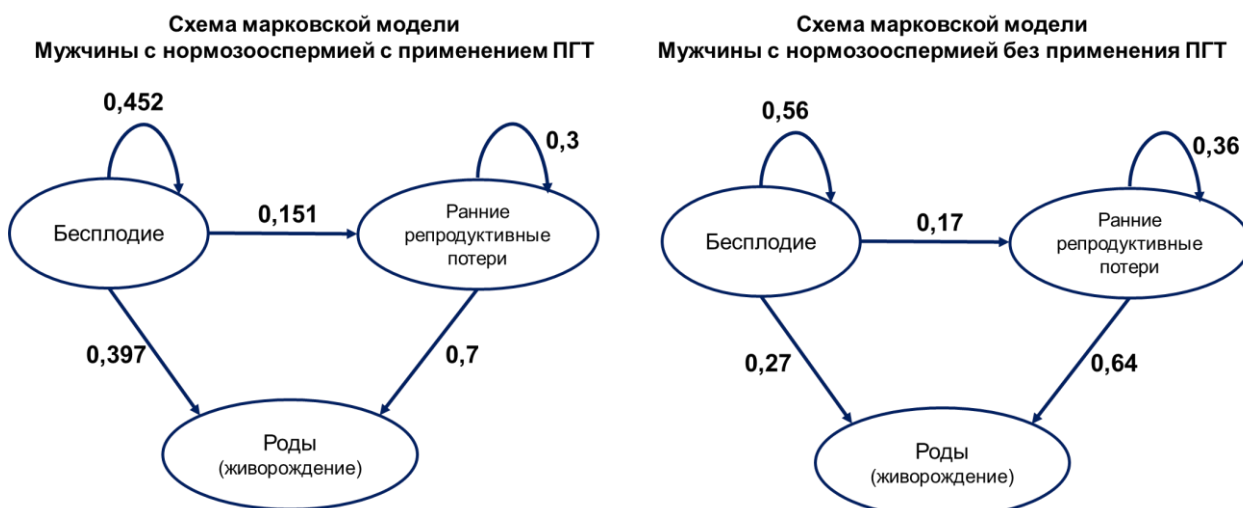


Рис. 38. Число живорождений и затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) для сценария 9

Таким образом, среди всех рассматриваемых сценариев данный сценарий характеризуется наименьшей клинической эффективностью и отсутствием затратной эффективности. Каждый добавленный случай живорождения требует наибольших затрат – более 25 000 руб. на одно добавленное живорождение. Кроме того, данный сценарий характеризуется превышением порога готовности платить, то есть не является ресурсосберегающим.

Сценарий 10. Оценка клинико-экономической эффективности применения преимплантационного генетического тестирования в группе мужчин с нормозооспермией



При применении ПГТ вероятность перехода из состояния бесплодия в состояние ранних репродуктивных потерь составляет 0,151. Вероятность перехода бесплодия в роды (живорождение) – 0,397. Вероятность сохранения бесплодного состояния – 0,452. Вероятность перехода из состояния ранних репродуктивных потерь в роды (живорождение) составляет 0,7. Вероятность сохранения состояния ранних репродуктивных потерь – 0,3.

По результатам моделирования при применении ПГТ количество живорождений в данной группе за 5 лет возрастает с 397 за 1-й год до 710,78 на 5-й год, что более чем на 100 живорождений больше на каждый год моделирования по сравнению со сценарием без применения ПГТ (рисунок 39).

Затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) составляют от 1,423 млн. руб. на 1-м году до 1,711 млн. руб. к 5-му году. Для сравнения – сценарий без применения ПГТ характеризуется затратами от 1,189 млн. руб. на 1 живорождение на 1-м году до 1,469 млн. руб. к 5-му году. Таким образом, вместе с нарастающим ростом числа живорождений с применением ПГТ одновременно возрастают и затраты на 1 живорождение, в среднем на 200 тыс. руб. по сравнению с базовым сценарием.

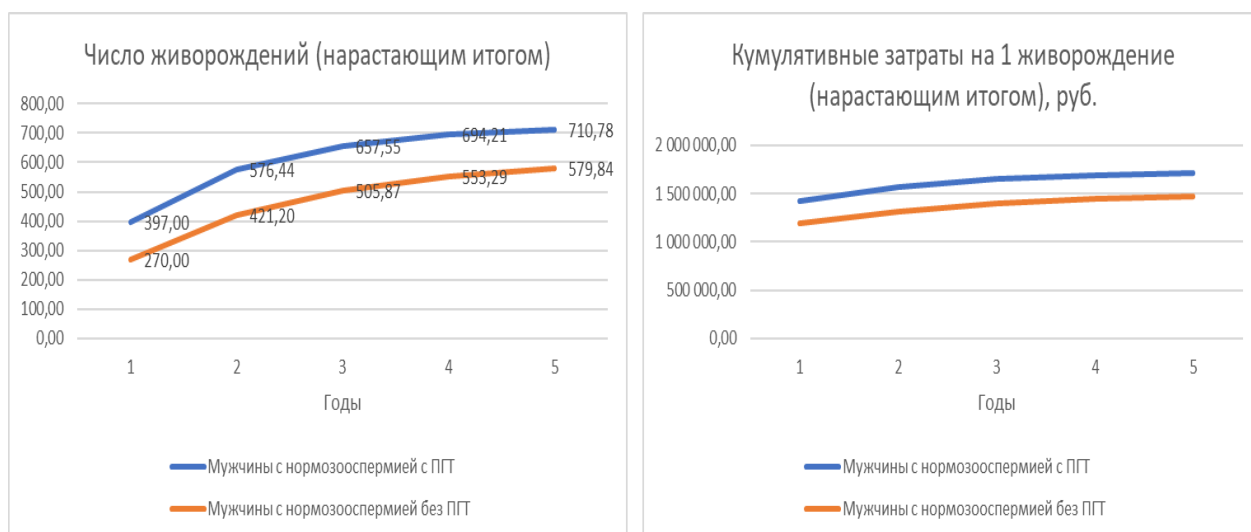


Рис. 39. Число живорождений и затраты при применении ПГТ на 1 живорождение (нарастающим итогом) для сценария 10

Таким образом, данный сценарий характеризуется высокой клинической эффективностью, но не является затратно-эффективным. При этом с точки зрения порога готовности платить данный сценарий является ресурсосберегающим.

Подводя итог, можно считать выгодной клинико-экономической стратегией применение преимплантационного генетического тестирования в расчете на пятилетний период для пациенток позднего репродуктивного возраста и мужчин с тяжелыми нарушениями сперматогенеза. Именно для данных категорий больных генетическое тестирование будет максимально снижать суммарные затраты на рождение 1 здорового ребенка, а также может сократить сроки лечения бесплодия.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ), выполняемое в рамках лечения бесплодия методами ВРТ, на сегодняшний день активно и горячо обсуждаемая тема в профессиональных кругах. Среди специалистов по репродуктивной медицине есть как его сторонники, которые предлагают проводить ПГТ всем пациентам с бесплодием, так и активные противники, считающие, что применение технологии целесообразно только при абсолютных показаниях. Более 20-лет опыта генетического тестирования преимплантационных эмбрионов человека в программах ВРТ показывает, что ни одна из сторон этого спора не может быть до конца права. При сравнении частоты наступления беременности и частоты живорождения в большинстве исследований сообщают о значительных преимуществах использования ПГТ в любой группе пациентов. Конечно, данные исследования можно критиковать, поскольку исследуемые группы и группы сравнения часто не сопоставимы, присутствует предвзятость (часто непреднамеренная) при отборе участников исследований. Научные работы проводятся на когортах пациентов с бесплодием из одного региона, что тоже ставит под сомнение возможность экстраполяции результатов на другие популяции и этнические группы.

Доказанной для всех исследователей остается эффективность применения ПГТ у женщин позднего репродуктивного возраста, при носительстве моногенных заболеваний и при нарушениях кариотипа. При этом остаются другие нозологии, для которых эффективность использования ПГТ неочевидна (НГЭ, СПКЯ, НБ, нарушения сперматогенеза), однако многие клиники рекомендуют проводить генетическое тестирование эмбрионов и таким пациентам.

В данной диссертационной работе на первом этапе рассматривалась популяция пациентов, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ с применением преимплантационного генетического тестирования. Из 13 595 циклов ВРТ в 8% случаев пары прибегали к генетическому тестированию

эмбрионов. Результаты 6-летнего ретроспективного анализа показывают рост числа программ с ПГТ в 2 раза. Это связано с бурным развитием данной технологии в России и повышением эффективности программ лечения бесплодия при использовании ПГТ. Генетическое тестирование эмбрионов позволяет значительно приблизить рождение здорового ребенка и существенно сократить число неудачных протоколов ВРТ, когда переносят эмбрионы, оцениваемые только по морфологическим критериям. Улучшение репродуктивных исходов позволяет специалистам в области репродуктивной медицины рекомендовать данную технологию любой категории пациентов в программах ВРТ, что не всегда является экономически выгодным, поскольку значительно увеличивает затраты пациента. Программы ВРТ с ПГТ не финансируются ФОМС никакой категории больных (даже при абсолютных показаниях), что заставляет говорить о неправомерности подхода с точки зрения задач государства (речь о снижении числа детей-инвалидов и новорожденных с генетическими патологиями). Как показали результаты проведенного ретроспективного анализа, из общей когорты пациентов наиболее часто к ПГТ обращаются женщины позднего репродуктивного возраста и пары с фактором мужского бесплодия – более половины всех случаев ВРТ. Более того, нарушения сперматогенеза вызывают потребность чаще прибегать к ПГТ по сравнению даже с возрастом женщины. Именно поэтому в работе была очень тщательно проанализирована группа с фактором мужского бесплодия.

При анализе циклов лечения бесплодия методами ВРТ за 6-летний период обратила на себя внимание устойчивая тенденция к увеличению среднего возраста женщины, вступающей в программу ВРТ: с 38% до 46% — пациентки старше 40 лет. Как показано, именно с возрастом женщины критически снижается эффективность программ лечения бесплодия. Это связано и со снижением качества получаемых женских половых клеток, и с накоплением разнообразных болезней, присущих возрасту. Генетическое тестирование позволяет найти эмбрион без хромосомных патологий, что

приводит к рождению здоровых детей. Однако, как показали данные настоящего исследования, в половине случаев такие пациентки остаются без переноса из-за множественной хромосомной патологии, развивающихся *in vitro* эмбрионов. При наличии эуплоидного эмбриона и его переносе в полость матки женщине позднего репродуктивного возрасте частота наступления беременности не отличается от других возрастных групп.

Большинство опубликованных научных работ также показывает высокую эффективность программ ВРТ с применением ПГТ-А у пациенток разных возрастных групп [204]. По данным нескольких исследований, максимальная эффективность программ ВРТ с применением ПГТ-А достигается у пациенток в возрасте до 40 лет и составляет 36–45% [205]. В позднем репродуктивном возрасте, часто возникает маточный фактор бесплодия. Также снижение эффективности программ ВРТ с применением ПГТ-А у пациенток позднего репродуктивного возраста может быть связано с малым числом получаемых в ходе стимуляции функции яичников ооцитов и, соответственно, эмбрионов и частой отменой переноса после проведения ПГТ-А в связи с высокой частотой анеуплоидий. В недавнем обзоре была показана практически сопоставимая частота наступления беременности, а также одинаковая частота живорождения у пациенток разного возраста, однако про возраст мужчин данных не представлено [206]. Вероятно, это связано с тем, что в окончательный анализ были включены пары, у которых в стимулированном цикле ВРТ был получен как минимум один эуплоидный эмбрион. Пациентки, у которых перенос эмбриона был отменен в связи с отсутствием получения ооцитов или эуплоидной бластоцисты, что наиболее часто встречается у женщин позднего репродуктивного возраста, были исключены из данного обзора. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что в наибольшей степени эффективность программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста зависит именно наличия эуплоидного эмбриона для переноса в полость матки и в меньшей степени ототягощенного акушерско-гинекологического анамнеза, например изменения

эндометрия вследствие многочисленных выскабливаний стенок полости матки после неудачных/нежелательных беременностей или других внутриматочных патологий (полипы, гиперплазия эндометрия, субмукозная миома матки и т.д.). Стоит отметить, что количество внутриматочных вмешательств выше именно у женщин позднего репродуктивного возраста [207]. Учитывая, что эффективность программ ВРТ при переносе зуплоидного эмбриона, по данным разных исследований остается в среднем 40–45%, отсутствие наступления беременности у пациенток в программах ВРТ с ПГТ-А может быть связано с ограничением диагностических возможностей самой методики [205]. Кроме того, на результат программы ВРТ оказывают влияние и патологические изменения эндометрия, которые, судя по полученным результатам, наблюдаются как у пациенток позднего репродуктивного возраста, так и у молодых женщин [208].

В настоящей работе были прицельно изучены программы ВРТ с ПГТ у молодых женщин с привычным невынашиванием в анамнезе. В литературе опубликованы противоречивые данные о возможности проведения генетического тестирования эмбрионов данной группе пациенток. Многие авторы указывают на необходимость назначений дополнительных диагностических исследований с учетом клинической и экономической целесообразности [209]. Многие исследователи заявляют о нецелесообразности проведения ПГТ ввиду повторения самопроизвольного выкидыша даже при переносе зуплоидного эмбриона в полость матки. В нашем исследовании на когорте молодых пациенток до 35 лет с привычным невынашиванием частота появления генетически аномальных бластоцист не превышала таковой показатель у женщин в группе сравнения. Сравнение частоты наступления беременности между группами также не выявило статистически значимых различий. Проведенный клинико-экономический анализ показал лишь увеличение стоимости 1 живорождения при невынашивании беременности, но не повышение эффективности. Можно с уверенностью говорить о том, что при данном факторе бесплодия

использование преимплантационного генетического тестирования нецелесообразно. Наши данные подтверждаются зарубежными исследователями. Так, Fazilet at al. (2021 г.) выясняли, какие параметры влияют на вероятность выкидыша после однократного переноса эуплоидной размороженной бластоцисты в полость матки. В этом ретроспективном исследовании оценивали клинические и лабораторные данные 1051 женщины с переносом одной эуплоидной бластоцисты. Критериями исключения были эндокринные или системные патологии, аномалии или патологии матки, односторонний или двусторонний гидросальпинкс, аномалии кариотипа (как у матери, так и у отца) и тромбофилия. По исходу беременности пациентки были разделены на две группы: живорождение и невынашивание. Индекс массы тела, продолжительность бесплодия и количество предыдущих выкидышей были значительно выше в группе невынашивания беременности, чем в группе живорождения. Бинарный логистический регрессионный анализ позволил авторам исследования сделать вывод, что при переносе эуплоидной бластоцисты ИМТ и количество предыдущих выкидышей являются независимыми факторами и предикторами невынашивания беременности. Исследователи рекомендуют изменение образа жизни для снижения числа выкидышей [279], но не ПГТ для решения проблемы бесплодного брака. Эти результаты относятся к молодым женщинам до 35 лет. Поздний репродуктивный возраст требует другого подхода. Однозначно можно утверждать, что парам с привычным невынашиванием необходимо консультирование по всем возможным вариантам лечения бесплодия методами ВРТ у врача акушера-гинеколога с учетом всестороннего анализа анамнеза пациентки, чтобы уменьшить риск последующего выкидыша.

Согласно полученным в работе данным, у молодых пациенток до 35 лет с СПКЯ применение ПГТ при лечении бесплодия также нецелесообразно. Сам синдром, являясь причиной бесплодия, не увеличивает частоту анеуплоидных эмбрионов при отсутствии других факторов бесплодия.

Исследователи часто пишут о нарушении процессов фолликулогенеза и связанного с ним раннего эмбриогенеза при СПКЯ. Научные работы демонстрируют нарушение экспрессии генов в ооцитах пациенток с СПКЯ из-за неправильной передачи сигналов андрогенов и/или инсулина, у многих пациенток с СПКЯ снижается частота оплодотворения, бластуляции и имплантации, а также повышается частота выкидышей в программах ВРТ [280]. Способность к развитию эмбрионов, возникающих из ооцитов низкого качества при СПКЯ, значительно нарушена.

Функциональные изменения эндометрия и яичников в результате эндокринных нарушений у женщин с СПКЯ, по-видимому, являются главными неблагоприятными факторами для успешного исхода беременности. Аномальная экспрессия белков, участвующих в регуляции клеточного цикла, клеточном транспорте и передаче сигналов, репарации ДНК, апоптотических процессах и митохондриальном метаболизме, была обнаружена в клетках эндометрия женщин с СПКЯ [282]. Авторы сообщают об измененной экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона и андрогенов и их ко-регуляторов в эндометрии пациенток с СПКЯ. Эндометрий часто проявляет устойчивость к прогестерону. Снижение связывания и активации рецептора прогестерона, вызванное снижением синтеза и/или изменением экспрессии его менее активных изоформ, приводит к нарушению метаболизма глюкозы и изменению децидуализации эндометрия. Повышенная экспрессия рецепторов андрогенов в эпителиальных клетках эндометрия у женщин с СПКЯ, гипоталамо-гипофизарной дисфункцией, связанной с СПКЯ, а также повышенные системные уровни эстрогенов и андрогенов ухудшают чувствительность клеток эндометрия к прогестерону у женщин с СПКЯ, чем и может быть обусловлено бесплодие при данном синдроме. Полученные нами результаты подтверждаются зарубежными авторами, которые считают, что женщины с СПКЯ не подвержены повышенному риску хромосомных аномалий преимплантационных

эмбрионов в программах ВРТ [281]. Именно поэтому молодым женщинам до 35 лет ПГТ не рекомендовано.

В силу отсутствия единого мнения среди специалистов по репродуктивному здоровью по вопросу влияния наружного генитального эндометриоза на генетический статус эмбриона в программах ВРТ, в работе была изучена данная когорта пациенток.

Как отмечают многие российских и зарубежных авторы, эффективность программ ВРТ у женщин с НГЭ ниже по сравнению с пациентками без НГЭ. Наличие НГЭ в анамнезе отрицательно влияет на качество и/или количество ооцитов и ведет к нарушению децидуализации эндометрия [229]. Существует большое количество противоречивых данных о механизмах патогенетического влияния очагов эндометриоза на эндометрий и качество/количество ооцитов. Активно обсуждается вопрос хромосомной нестабильности ооцитов под воздействием активных форм кислорода при НГЭ, что связано с нарушениями сборки веретена деления, неравномерным расхождением хромосом и образованием анеуплоидных женских гамет. Результаты экспериментальных работ на моделях животных показали, что при эндометриозе воздействие перитонеальной и фолликулярной жидкости на ооциты ведет к нестабильности микротрубочек и веретена деления и высокой частоте мейотических аномалий в ооцитах [230]. При этом в работе I. D. Barcelos et al. не было обнаружено различий в аномалиях веретена деления в процессе *in vitro* дозревания незрелых ооцитов, полученных у пациенток с НГЭ и здоровых женщин [231]. В настоящей работе получены сопоставимые результаты по частоте анеуплоидий в соответствующих возрастных группах пациенток с НГЭ (до 35 лет, 35–37 лет, старше 38 лет) и в группе сравнения, но частота анеуплоидий у пациенток с НГЭ в группах до 35 и 35–37 лет была выше, чем в соответствующих группах сравнения, однако данные были статистически незначимы. Не было выявлено значимых отличий в отношении характеристик эмбриологического этапа при попарном сравнении

одновозрастных групп пациенток. Полученные результаты позволяют говорить о том, что процессы оплодотворения, дробления и бластуляции у женщин с НГЭ протекают аналогично таковым у женщин в группе сравнения.

Анализ результатов ПГТ-А 1880 эмбрионов, полученных от женщин с НГЭ, и 2354 эмбрионов контрольной группы в соответствующих возрастных подгруппах (до 35 лет, 35–37 лет, 38–40 лет, 41–42 года, старше 42 лет) показал сопоставимую частоту анеуплоидий [232]. Аналогичные результаты были описаны коллективом авторов A. Vaiarelli et al., которые также не нашли значимых различий по частоте анеуплоидий и не обнаружили разницы в количестве полученных МП ооцитов, частоте оплодотворения и проценте криоконсервированных бластоцист [233]. При этом в исследовании не отрицается потенциальное влияние НГЭ на количество получаемых МП ооцитов в программах ВРТ, что подтверждают другие ученые, описавшие негативное влияние НГЭ на количество зрелых ооцитов [234]. Таким образом, можно говорить об отсутствии влияния НГЭ на частоту появления генетически аномальных эмбрионов при лечении бесплодия методами ВРТ. Решение проблемы бесплодия у данной когорты женщин следует искать в другой плоскости, например в патологии клеток эндометрия.

Влияние НГЭ на рецептивность эндометрия является важным вопросом. В ходе анализа при сравнении исходов беременности и частоты живорождений после переноса эуплоидного эмбриона у женщин с НГЭ (250 эмбрионов) с двумя контрольными группами: пациенты с ПГТ эмбрионов на хромосомные патологии (225 эмбрионов) и пары с фактором мужского бесплодия (1332 эмбриона), не было обнаружено существенных различий [235]. В нашем исследовании также не было выявлено значимых различий по частоте наступления клинической беременности и живорождения [236]. В исследованиях, где для оплодотворения и переноса в полость матки женщинам с НГЭ использовали донорские ооциты, не было обнаружено

снижения рецептивности эндометрия при сравнении исходов программ ВРТ с группой контроля. Транскриптомный анализ 238 генов эндометрия у женщин с НГЭ в период имплантации не выявил каких-либо различий между женщинами с НГЭ и контрольной группой [237]. Неоднозначность полученных данных в приведённых исследованиях может быть обусловлена разными критериями включения/исключения и недообследованностью когорты пациентов.

Неудачи программ ВРТ в группе женщин с НГЭ часто обусловлены морфофункциональными характеристиками получаемых ооцитов, на что может влиять степень тяжести эндометриоза (III–IV стадия) [238, 239]. Например, появляющиеся цитоплазматические дисморфизмы женских половых клеток при тяжелых формах НГЭ могут нарушать процесс дробления эмбриона [240]. Было показано, что аномалии морфологии ооцитов чаще встречались среди пациенток с НГЭ по сравнению с контрольной группой [241]. На качество ооцитов влияют самые разнообразные факторы, например в клетках кумулюса и клетках гранулезы пациенток с НГЭ повышен уровень апоптоза, что приводит к потере основной поддержки, которую кумулюсные клетки оказывают ооциту (гормоны, ряд ростовых факторов). Сравнение спектральных характеристик клеток гранулезы женщин с НГЭ и контроля методами инфракрасной и рамановской микроскопии показало изменения структуры белков, активацию механизмов окислительного стресса, нарушение регуляции метаболизма углеводов и модификацию метилирования ДНК [242]. В фолликулярной жидкости женщин с НГЭ было отмечено снижение молекул-антиоксидантов и повышение маркеров окислительного стресса, что ведет к преждевременному «старению» клеток гранулезы и сопровождается дисфункцией митохондрий и повышенным стрессом эндоплазматического ретикулума. Транскриптомный анализ профиля генов ооцитов пациенток с НГЭ по сравнению с донорскими ооцитами показал изменение экспрессии групп генов, участвующих в регуляции процессов метилирования, функции

митохондрий, клеточной активности и роста, метаболизма стероидов, реакции на окислительный стресс [243]. Результаты представленных исследований позволяют сделать вывод о том, что качество ооцитов у женщин, страдающих НГЭ, снижается. Однако, судя по результатам других исследований, данные нарушения не оказывают явного клинического влияния на исходы программ ВРТ. Анализ больших регистров по исходам программ ВРТ, включающих около 350000 циклов, показал, что НГЭ у женщин ассоциирован с более слабым ответом яичников на стимуляцию, однако частота имплантации сопоставима с группами пациенток без НГЭ [244]. Результаты данного исследования и ряда других работ продемонстрировали, что у женщин с НГЭ частота анеуплоидий в программах ВРТ не отличается от пациенток без НГЭ во всех возрастных группах. Полученные в настоящей работе данные позволяют говорить об одинаковой эффективности лечения бесплодия у женщин с легкими формами НГЭ и в группе сравнения. Однако при тяжелых, часто агрессивных и рецидивирующих формах эндометриоза использование ПГТ позволит такой пациентке получить большее число компетентных ооцитов в более раннем возрасте. При НГЭ средней и тяжелой степени и агрессивном течении для повышения эффективности программы ВРТ может быть рекомендовано проведение ПГТ-А [245]. Программа ВРТ с ПГТ-А является корректной тактикой ведения пациенток с агрессивными формами эндометриоза, поскольку позволяет не только оптимизировать выбор наиболее перспективного эмбриона для переноса, но и минимизировать временные затраты пары. Особенно это важно для женщин с повторными хирургическими вмешательствами по поводу тяжелого течения эндометриоза и при отсутствии эффекта от проводимой медикаментозной терапии болевого синдрома.

К сожалению, при лечении бесплодия методами ВРТ гораздо меньшее внимание уделяется фактору мужского бесплодия. Часто специалистам в области репродуктивной медицины кажется, что нескольких сперматозоидов

достаточно для получения эмбрионов, пригодных для переноса в полость матки. На сегодняшний день научные данные о влиянии тяжелой формы мужского бесплодия на результаты программ ВРТ, такие, как жизнеспособность эмбриона и раннее эмбриональное развитие, частота анеуплоидий, а также частота наступления беременности и частота родов, являются достаточно неоднозначными и дискуссионными.

В настоящем исследовании подробно рассматривалось влияние позднего репродуктивного возраста отцов (старше 40 лет) и выраженного фактора мужского бесплодия на частоту анеуплоидий в эмбрионах, а также оценивалось влияние данных факторов на эмбриологический этап лечения бесплодия методами ВРТ. Принимая во внимание, что большинство анеуплоидий – результат наследования материнских аберраций, распространенность которых увеличивается с 30% у женщин 30 лет до почти 90% у женщин в возрасте 44 лет [210], мы исключили все циклы ВРТ, в которых возраст супруги превышал 35 лет, чтобы нивелировать влияние материнского фактора на частоту анеуплоидий и исходы программ ВРТ.

Считается, что возраст мужчины отрицательно влияет на результаты ВРТ, возможно, вследствие повреждения ДНК в сперматозоидах в результате окислительного стресса [211]. Проведенный нами анализ не выявил значимых различий в характеристиках эмбриологического этапа в группах мужчин старше и младше 40 лет: частота оплодотворения и частота бластуляции были сопоставимы в обеих группах, что согласуется с данными А.М. Kasman et al. [212], которые показали, что возраст отца старше 40 лет не связан ни с эмбриологическим этапом, ни с исходами программ ВРТ. Следует учесть, что в настоящем исследовании мы не рассматривали возраст отцов старше 48 лет, поэтому сделанные выводы относятся к мужчинам до 48 лет. В исследовании М. Dviri et al. [213] было отмечено статистически значимое снижение частоты оплодотворения – с 80% до 76% в группе мужчин старше 50 по сравнению с более молодыми мужчинами, что конечно не является столь клинически значимым фактом, в то время как В.М. Hanson

et al. в своей работе при анализе 4058 циклов показали снижение процента бластуляции в группе мужчин старше 40 лет [214], а G. Morris et al. в исследовании 2021 г. отметили, что независимо от причины бесплодия, увеличение мужского возраста (старше 50 лет) связано с уменьшением количества живорождений и частоты клинической беременности, но не влияет на частоту ранних пренатальных потерь [215]. Можно говорить о том, что вопрос влияния позднего репродуктивного возраста отца (мужчины старше 50 лет) на исходы ВРТ до сих пор не изучен и требует детальных научных исследований специалистов в области репродуктивной медицины. Необходимы дальнейшие работы по изучению возможных механизмов этого влияния, а также по совершенствованию методов отбора сперматозоидов без ДНК-фрагментации и потенциальных негативных факторов.

В работе была предпринята попытка оценить зависимость эффективности программ ВРТ с ПГТ и без от различных видов нарушений сперматогенеза. При анализе показателей эмбриологического этапа в группах мужчин с разными параметрами эякулята нами было отмечено снижение процента получения бластоцист высокого качества в анализируемых группах по сравнению с группой с нормозооспермией. Статистически значимая разница была определена для группы мужчин с ОАТ и группы с морфологией сперматозоидов 0–2%, что может свидетельствовать о влиянии мужского фактора на раннее эмбриональное развитие. В работе R.Mazzilli et al. в результате анализа 1219 циклов было отмечено снижение частоты оплодотворения для групп с выраженным фактором мужского бесплодия по сравнению с группой мужчин с нормозооспермией, в то время как частота получения бластоцист хорошего качества была значимо ниже только в группе с необструктивной азооспермией [216]. В другой работе анализ 1266 циклов ИКСИ показал, что снижение концентрации (меньше 5 млн./мл) влияет на частоту оплодотворения, но не на частоту получения бластоцист отличного качества и частоту прогрессирующей беременности [217].

Сперматозоиды играют важную роль на этапах эмбриогенеза, таких, как оплодотворение, эпигенетический контроль и деление клеток, что может сказаться на результатах ИКСИ. Существует мнение, что негативное влияние тяжелой формы ОАТ на частоту бластуляции может быть связано с повышенной фрагментацией ДНК сперматозоидов [218]. Недавнее исследование, в котором за эмбрионами наблюдали с помощью метода покадровой съемки, показало, что выраженный фактор мужского бесплодия связан с более низким процентом бластоцист, доступных для переноса, по сравнению с другими причинами бесплодия. Однако морфокинетические параметры эмбрионов оставались схожими, независимо от степени выраженности нарушений сперматогенеза у мужчин в программах ВРТ [219], но этот факт не дает полной уверенности в высоком репродуктивном потенциале переносимых бластоцист. Таким образом выраженное нарушение процесса сперматогенеза в большей степени влияет на способность оплодотворенных ооцитов достигать стадии бластоцисты, что уменьшает количество эмбрионов высокого качества на 5-е сутки культивирования. При этом вопрос репродуктивного потенциала таких бластоцист не решен.

Как показали ранние исследования с использованием FISH, количество анеуплоидных эмбрионов на стадии дробления зависит от выраженности нарушений сперматогенеза. При этом опубликованы данные об одинаковой частоте эуплоидных эмбрионов на стадии бластоцисты при различных формах патоспермии [216,220]. Это можно объяснить развитием преимущественно эуплоидных эмбрионов до стадии бластоцисты. Другое возможное объяснение заключается в том, что сама процедура биопсии эмбриона влияет на частоту анеуплоидий [221].

Известно, что с возрастом у мужчин в сперматозоидах накапливаются точечные мутации, отвечающие за наследование определенных заболеваний (шизофрения, аутизм): удвоение отцовских наследуемых мутаций происходит каждые 16,5 лет [223], в то время как доказательства генеза именно отцовских анеуплоидий остаются противоречивыми. В результате

нашего исследования было показано, что ни аномальные параметры спермограммы (OAT, microTESE, морфология сперматозоидов), ни возраст отца (от 40 до 48 лет) не связаны с повышением частоты анеуплоидий эмбрионов, что соответствует исследованиям зарубежных авторов [216,220]. В исследовании R.J.Carrasquillo et al. при анализе 1202 циклов с донорскими ооцитами и ПГТ-А было доказано отсутствие влияния позднего репродуктивного возраста отца на генетический статус эмбриона [224]. Аналогичные результаты были получены при анализе 3118 эмбрионов на анеуплоидии у мужчин разного возраста (до 39 лет, 40–49 лет, старше 50 лет) в программах с донорскими ооцитами. Не было найдено связи между возрастом отца и уровнем анеуплоидий [213]. А. Coates et al. сообщили о повышенной частоте аномалий половых хромосом у эмбрионов в группе мужчин с олигозооспермией по сравнению с мужчинами с нормальной концентрацией сперматозоидов [225]. Более высокая частота анеуплоидий, мозаицизма и аномального морфокинетического развития была описана при ИКСИ тестикулярными сперматозоидами по сравнению с контрольной группой [226].

В нашем исследовании анализ исходов программ ВРТ без ПГТ показал, что при переносе как нативного эмбриона в цикле стимуляции, так и размороженного эмбриона значения контрольных временных точек измерения (частота наступления беременности, ранние репродуктивные потери, частота родов) статистически значимо не различались в группах с разными показателями эякулята. Наилучшие показатели по суммарной частоте наступления беременности (42,0%), случаям ранних потерь (10%) и частоте родов (33,3%) отмечены в программах ВРТ с ПГТ-А, что обусловлено переносом эуплоидного эмбриона в отличие от программ без генетического тестирования на анеуплоидии. Сравнение исходов программ ВРТ для пар с нормозооспермией при переносе как нативного, так и размороженного эмбриона в циклах с ПГТ-А и без генетического скрининга показало отсутствие значимых различий по каждой из контрольных

временных точек: частота родов составила 29,3%, 22,2% и 23,1% соответственно. Таким образом, для пар с нормозооспермией и возрастом женщин до 35 лет проведение ПГТ-А не улучшает исходы программ ВРТ. В группе пациентов с выраженным нарушением сперматогенеза (объединенная группа ОАТ и microTESE) было отмечено повышение частоты наступления беременности, снижение ранних репродуктивных потерь и увеличение частоты родов по сравнению с переносом размороженного эмбриона без ПГТ-А: 45,7% против 31,7%; 6,3% против 16,7% и 41,2% против 22,8% соответственно. Данные различия не достигли уровня статистической значимости, но была отмечена тенденция к повышению частоты родов ($p=0,064$). Похожие выводы были сделаны Rui Xu et al. [227], которые показали, что ПГТ-А на основе NGS может улучшить исходы беременности для пар с выраженным фактором мужского бесплодия за счет значительного снижения частоты выкидышей на ранних сроках (6,7% против 21,6%, $p=0,02$), но не влияет на кумулятивную частоту продолжающейся беременности (54,9% против 55,8%, $p=0,90$) по сравнению с ВРТ без ПГТ-А.

При анализе исходов программ ВРТ в группах мужчин с морфологией 0–2% и 3% было отмечено статистически значимое снижение частоты клинической беременности и частоты родов при переносе замороженного и размороженного эмбриона с неизвестным генетическим статусом по сравнению с переносом как нативного эмбриона в цикле стимуляции в аналогичной группе, так и эмбриона в криопротоколе с ПГТ-А. Данные согласуются с научной работой, в которой было показано, что тератозооспермия у мужчин способствует повышенному риску неудачных исходов программ ВРТ [227]. Надо сказать, что тератозооспермия является самой распространенной формой патозооспермии в общей популяции пациентов, а морфологическая оценка сперматозоидов сама по себе является крайне субъективной и во многом зависит от эмбриолога. Известно, что неудачи имплантации на 1/3 связаны с эмбрионом, а на 2/3 — с эндометрием [228], то есть основная причина бесплодия в таких парах отводится женскому

фактору. Снижение частоты наступления беременности и родов в криопротоколе, вероятно, скорее связано с недообследованностью женщины, чем с тератозооспермией у мужчины. Следует уделять больше внимания подготовке эндометрия и определению окна имплантации при переносе замороженного и размороженного эмбриона в парах с тератозооспермией и женским фактором бесплодия. Надо отметить, что в парах с выраженным нарушением сперматогенеза (OAT, microTESE), как правило, женщины не имеют отягощенного анамнеза, что подтверждается отсутствием статистически значимых различий в частоте наступления беременности и родов при переносе как эмбриона в цикле стимуляции, так и размороженного эмбриона в криопротоколе.

Таким образом, можно говорить о том, что на эффективность программ ВРТ влияет степень тяжести нарушений сперматогенеза. Для снижения числа репродуктивных потерь парам, где у мужчин диагностируется OAT и проводилась биопсия яичка целесообразно ПГТ эмбриона. Это позволяет не только сокращать сроки лечения бесплодия, но и снижать риски хромосомных патологий у потомства. Проведенный клинико-экономический анализ также указывает на целесообразность ПГТ в программах лечения бесплодия методами ВРТ в таких случаях.

Пары, в которых у одного из партнеров имеются хромосомные aberrации, представляют собой одну из самых сложных групп, включенных в программы лечения бесплодия методами ВРТ. Пациентки из этих пар обычно имеют отягощенный анамнез: проблемы с эндометрием, самопроизвольные выкидыши, неразвивающиеся беременности и т.д. При лечении бесплодия у таких пациенток акушеры-гинекологи сталкиваются с проблемами не только гинекологическими, но и генетическими. Мнения специалистов разных стран разделяются по поводу включения пациентов с нарушениями в кариотипе и не имеющих бесплодия в программы ВРТ. По мнению одних, у таких пациентов, в конце концов, может наступить самостоятельная беременность плодом без генетических патологий в

кариотипе, другие полагают, что недопустимо рисковать здоровьем женщины, нужно сократить время наступления беременности здоровым плодом.

Изучение в настоящей работе данных тестирования молекулярного кариотипа у эмбрионов пациентов со структурными перестройками хромосомного набора способствует лучшему пониманию процесса мейоза у таких пациентов. Полученные в результате знания могут быть использованы в разработке более современных методов преимплантационного тестирования и четких расчетов риска возникновения у ребенка хромосомной патологии. Наше исследование показало, что NGS на платформе компании Illumina может служить хорошим профилактическим звеном в программах ВРТ с ПГТ-СП. Принципиальное отличие данной платформы от платформ других компаний — около 1 млн. прочтений (ридов) на один образец (для сравнения: у других компаний — всего 150–200 тыс. прочтений). Большое количество видов существенно влияет на точность выявления генетических нарушений, поэтому, направляя пациентов на ПГТ-СП, необходимо обращать внимание не только на метод секвенирования, но и на платформу, на которой будет проводиться тестирование. Другие авторы также показали, что метод NGS у пациентов с изменениями в кариотипе является самым точным по выявлению хромосомных изменений у эмбрионов. Исследователи ретроспективно тестировали продукт WGA после a-CGH методом NGS, и в ряде случаев метод NGS выявил *de novo* изменения участков хромосом и низкий уровень мозаицизма там, где a-CGH показал норму [246, 247]. И наши результаты, и данные других специалистов доказывают, что метод NGS дает возможность четко выявлять в эмбрионах не только анеуплоидии, делеции и дупликации, но и мозаицизм. В.С.Ф.К. Brunet et al. поддерживают это мнение [248].

Представленные в настоящей работе результаты показали, что у пациентов с хромосомными изменениями кариотипа в преимплантационных эмбрионах помимо патологий вовлеченных в перестройку хромосом

возможны генетические изменения и других хромосом. Данный факт указывает на необходимость исследовать эмбрионы у этой группы пациентов на все хромосомы. ПГТ-СП методом NGS может стать альтернативой пренатальной диагностике для фертильных пар, имеющих высокий риск рождения ребенка с наследственной или врожденной патологией, которые в случае выявления у плода хромосомных изменений, выступают против медицинского аборта по религиозным, моральным или другим мотивам.

Таким образом, ПГТ-СП методом NGS является в настоящее время, самым точным способом определения хромосомных aberrаций у преимплантационных эмбрионов и может быть рекомендован как профилактическое мероприятие по невынашиванию беременности и по рождению больного ребенка в рамках программы ВРТ у пациентов с изменениями в кариотипе. Целесообразность выполнения ПГТ-А и ПГТ-СП данной категории больных не вызывает сомнений.

Одна из основных причин неправильной интерпретации результатов ПГТ-А заключается в наличии хромосомного мозаицизма. Хромосомный мозаицизм может встречаться у эмбрионов во время преимплантационного периода, однако в течение первых трех дней культивирования частота появления таких ошибок наиболее высокая, а по мере дальнейшего развития, эмбрион способен самостоятельно компенсировать нарушения [249].

Согласно результатам ряда исследований, в программах ВРТ у пациентов до 37 лет, бластоцисты с эуплоидным, мозаичным и анеуплоидным кариотипом встречаются в 25,0%, 60,0% и 15,0% случаев соответственно [250]. Учитывая, что мозаичные эмбрионы преобладают у таких пациентов оптимизация диагностики хромосомного мозаицизма с помощью различных методик остается крайне важной. Наличие мозаицизма в клетках эмбриона может быть обнаружено с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), полимеразной цепной реакции (ПЦР), сравнительной геномной гибридизации с использованием микроматриц (a-CGH) и методом NGS. Технология NGS является наиболее специфичной и

чувствительной методикой в отношении диагностики мозаицизма в эмбрионе. Частота выявления нарушений при проведении NGS значительно выше, чем, например при а-CGH (10% и 3% соответственно) [251]. Учитывая, что в литературе описаны случаи рождения детей со сбалансированным кариотипом после переноса мозаичных эмбрионов, наличие менее 50% анеуплоидных клеток при биопсии трофэктодермы у эмбриона на ранних стадиях преимплантационного развития может интерпретироваться как вариант нормы [252, 253]. Однако существуют обратные ситуации, когда при более детальном анализе в эмбрионе можно обнаружить дополнительные хромосомные нарушения, влияющие на потенциал имплантации и развитие беременности. Для снижения риска ложноотрицательных результатов биопсию рекомендовано выполнять на 5-е сутки после оплодотворения, когда частота выявления мозаицизма минимальна вследствие естественной элиминации эмбрионов с хромосомными aberrациями. Повышение точности диагностики хромосомных аномалий у эмбриона при помощи ПГТ-А может быть достигнуто благодаря использованию нового источника биологического материала, например внутривольстной жидкости бластоцисты. Согласно результатам исследований, кариотипы по внеклеточной ДНК образцов полости бластоцисты и по клеткам трофэктодермы совпадают. Фракция внеклеточной ДНК, идентифицированная в полости бластоцисты, позволяет проводить тестирование моногенных мутаций и решить ряд вопросов диагностики хромосомного мозаицизма [254]. В исследовании S. Palini et al. (2013 г.) было продемонстрировано, что в полость бластоцисты внеклеточная ДНК секретируется из клеток, подвергающихся апоптозу. Тем не менее неизвестно, попадает ли в полость бластоцисты ДНК всех клеток (и с эуплоидным, и с анеуплоидным набором хромосом) и зависит ли секреция внеклеточной ДНК от локализации клеток (эмбриобласт или трофобласт) [255]. Таким образом, вопрос анализа жидкости полости бластоцисты в качестве нового источника материала для определения хромосомного статуса эмбриона остаётся перспективным, но требует дальнейших исследований.

В 2021 г. А. Shitara et al. опубликовали результаты исследования по изучению внеклеточной ДНК в культуральной среде в качестве биомаркера хромосомного набора эмбриона. В исследование было включено 20 бластоцист, полученных от 12 пар. На 6-е сутки после оплодотворения была выполнена биопсия клеток трофэктодермы. У эмбрионов на 6-е сутки была собрана культуральная среда для анализа внеклеточной ДНК методом NGS. После биопсии эмбрионы культивировались до 10-х суток с последующим проведением NGS на пяти образцах 8-дневных, пяти образцах 9-дневных и десяти образцах 10-дневных эмбрионов. В зависимости от результатов биопсии трофэктодермы, анализа внеклеточной ДНК и полногеномной амплификации все образцы были разделены на эуплоидные (группа I), анеуплоидные (группа II) и мозаичные эмбрионы (группа III). Чувствительность диагностики анеуплоидий неинвазивным методом по внеклеточной ДНК в культуральной среде составляла 100%, специфичность — 87,5%, что превышает аналогичные показатели при диагностике анеуплоидий методом ПГТ-А (чувствительность — 87,5%, специфичность — 77,8%) [256]. Таким образом, определение внеклеточной ДНК в культуральной среде для диагностики хромосомного статуса эмбриона является высокоточной, неинвазивной и перспективной технологией, требующей дальнейшего изучения. Особенно это касается изучения мозаицизма и его влияния на результаты лечения бесплодия методами ВРТ у различных категорий пациентов.

Учитывая, что ПГТ-А в настоящий момент широко применяется и является отработанным, автоматизированным методом, сочетающим в себе все основные качества наиболее объективных способов диагностики, правильная интерпретация полученных данных крайне важна. В программах ВРТ при переносе эуплоидной бластоцисты и наступлении развивающейся беременности рекомендовано обязательное проведение скрининга I-го триместра на сроке 11–13 недель гестации. Скрининг I-го триместра включает в себя измерение толщины воротникового пространства с помощью

аппарата УЗИ и исследование биохимических маркеров крови с последующим индивидуальным анализом риска рождения ребенка с хромосомными нарушениями [257]. Пациенткам с высоким риском анеуплоидии плода по данным скрининга I-го триместра рекомендована консультация врача-генетика и проведение пренатальной диагностики, включающую биопсию ворсин хориона или амниоцентез в зависимости от срока гестации. Для исключения анеуплоидии плода паре может быть дополнительно предложено проведение неинвазивного пренатального скрининга. Это касается и беременностей в программах ВРТ с ПГТ.

Результаты нашего исследования по оценке истинного мозаицизма показали, что хромосомный набор клеток, полученных из разных структур эмбриона, может отличаться. Эмбрионы с хромосомным мозаицизмом, с одной стороны, способны приводить к рождению здоровых детей со сбалансированным кариотипом, с другой — в зависимости от степени и типа мозаицизма могут стать причиной потери беременности или рождения детей с пороками развития, задержкой роста или умственной отсталостью [258]. Проведение ПГТ-А не всегда гарантирует перенос полностью эуплоидной бластоцисты, даже несмотря на неоспоримые преимущества данного метода в повышении эффективности программ ВРТ. В настоящий момент активно изучаются дополнительные маркеры и методы диагностики мозаичных эмбрионов для повышения точности ПГТ и увеличения эффективности лечения бесплодия. В связи с вышесказанным о мозаицизме ранних эмбрионов человека, важно еще раз подчеркнуть необходимость пренатального скрининга I-ого триместра у пациенток с беременностью, наступившей после переноса эуплоидного эмбриона по результатам ПГТ-А. Такая тактика позволяет не только получить как можно раньше информацию об аномальной беременности, но и подготовиться к своевременной хирургической коррекции выявленных пороков.

В 2022 г. опубликованы дебаты международного общества по преимплантационной генетической диагностике (PGDIS) относительно

возможности переноса в полость матки в рутинной практике клиник ВРТ мозаичных эмбрионов. К настоящему моменту сохраняется неопределенность по поводу последствий переноса мозаичных эмбрионов, следовательно, многие клиники избегают выполнять такие программы. Этот документ является окончательным отчетом экспертной консультации PGDIS по переносу мозаичных эмбрионов в 2021 г., в котором используется самая последняя доступная информация. Экспертами отмечается, что почти все пренатальные диагнозы беременностей после переноса мозаичных эмбрионов выявили нормальные эуплоидные кариотипы, при этом все живорождения, зарегистрированные на сегодняшний день, не показали признаков хромосомных синдромов. Однако, несмотря на многообещающие отчеты о здоровых детях, рожденных после переноса мозаичных эмбрионов, опубликован ряд сообщений о рождении и больных детей. В отчете PGDIS указано, что один из 320 синдромов у младенцев, подвергающихся полноэкзомному секвенированию в крупном испытательном центре в США, является результатом однородительской дисомии, что не может быть определено доступными сегодня методами ПГТ.

У пары в программе лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ может не оказаться ни одного эуплоидного эмбриона, а будут лишь эмбрионы с мозаицизмом. В нашем исследовании была отмечена именно такая ситуация. Мы выполнили девять переносов мозаичных эмбрионов, предварительно получив разрешение клинического генетика и тщательно взвесив все имеющиеся риски по рождению детей с генетическими нарушениями.

Понятно, что каждый отдельный пациент в программах лечения бесплодия сталкивается с различными возможностями и ограничениями. Именно поэтому прерод принятием решения необходима консультация специалистов в области репродуктивной медицины, чтобы оно было максимально взвешенным. Мозаичные эмбрионы всегда были при культивировании *in vitro*, их использовали для переноса в полость матки в программе ВРТ без предварительной генетической идентификации. Следует

признать, что даже некоторые из эуплоидных эмбрионов, отобранных для переноса в полость матки, могут оказаться мозаичными при биопсии в другой области трофэктодермы. Учитывая природу мозаицизма и то, как он возникает во время раннего эмбрионального развития, очевидно, что один образец биопсии, предварительно охарактеризованный как мозаичный, не означает, что окружающая трофэктодерма или остальная часть эмбриона также являются мозаичными. Повышение уровня мозаицизма может привести к негативным последствиям при переносе, однако, как рекомендуют клинические генетики, не следует точно придерживаться пороговых значений при принятии решения о переносе конкретного эмбриона как по техническим причинам (платформа для анализа, вариации амплификации, алгоритмы анализа), так и по биологическим (локальный мозаицизм).

Рекомендации для клинициста включают следующее: 1) пациентов следует информировать о том, что любой генетический тест, основанный на отборе одной или небольшого количества клеток, взятых при биопсии преимплантационных эмбрионов, не может быть точным на 100% из-за сочетания технических и биологических факторов, включая клеточный мозаицизм; 2) информация для пациентов и формы информированных добровольных согласий должны быть адаптированы, чтобы решение о переносе мозаичных эмбрионов было осознанным; 3) перенос нормального эуплоидного эмбриона имеет приоритет по сравнению с переносом эмбриона с мозаицизмом. При этом может возникнуть этическая проблема, связанная с предпочтениями пациентов по выбору эмбриона (например, выбор пола переносимого эмбриона). Вопрос является очень спорным, до сих пор на него не получен однозначный ответ среди специалистов.

Дальнейшие циклы стимуляции могут повлечь за собой финансовые, медицинские и эмоциональные проблемы, особенно учитывая неопределенность в отношении эмбрионов с возможным потенциалом имплантации, остающихся в криохранилище. Однако использование

мозаичного эмбриона не лишено повышенного риска отрицательного исхода по сравнению с эуплоидным эмбрионом. Поэтому любое предложение о переносе мозаичной бластоцисты следует делать только после всестороннего анализа и консультации относительно всех потенциальных рисков рождения детей с генетическими нарушениями. Акушерам-гинекологам следует рассмотреть и обсудить с пациентом альтернативный вариант еще одной программы ВРТ с ПГТ, чтобы повысить вероятность выявления эуплоидной бластоцисты для переноса.

На основе знаний, полученных в ходе недавних исследований по анализу и переносу мозаичных эмбрионов, были выработаны некоторые правила: 1) перенос мозаичных эмбрионов с высокой степенью мозаицизма не рекомендован, так как может привести к неблагоприятным исходам; относительный процент мозаицизма является лучшим предиктором исхода, чем конкретные вовлеченные хромосомы, и поэтому его следует включать в отчеты и обсуждения с пациентами; 2) решение о переносе мозаичного эмбриона принимается с учетом типа вовлеченных хромосом (целая хромосома или сегментарные изменения).

При отсутствии генетически нормальных эмбрионов и наличии только мозаичных эмбрионов пациенты должны быть должным образом проконсультированы, чтобы убедиться, что они понимают последствия переноса таких эмбрионов и принимают осознанное решение.

Несмотря на то, что в настоящий момент предложено большое количество различных маркеров имплантационного потенциала и качества эмбриона, объяснить причину отсутствия имплантации перспективного эмбриона по данным морфологической и генетической оценки не всегда представляется возможным.

В диссертационной работе было изучено влияние культуральных сред с гиалуроновой кислотой при переносе генетически нормальных эмбрионов в полость матки. Известно, что имплантация эмбриона в эндометрий представляет собой многоэтапный процесс, опосредованный

многоуровневой регуляцией внутри- и межклеточных взаимодействий и необходимый для дальнейшего развития бластоцисты и адаптации организма матери к беременности. Эффективность программ ВРТ, безусловно, зависит от совокупности многих факторов, тем не менее в конечном итоге успешная имплантация и дальнейшее развитие физиологической беременности возможно при правильном и координированном взаимодействии генетически здорового эмбриона с рецептивным эндометрием. Уникальность нашего исследования заключается в том, что при проведении анализа данных был минимизирован «эмбриональный» фактор, в значительной степени влияющий на результат программы ВРТ. У всех пациенток, включенных в исследование, были получены эуплоидные эмбрионы, которые были перенесены в последующем криопротоколе на фоне подготовки эндометрия с помощью циклической гормональной терапии.

В отношении влияния гиалуроновой кислоты на частоту наступления беременности и пролонгирование беременности опубликовано большое количество работ, имеющих противоречивые результаты. В физиологических условиях гиалуроновая кислота содержится в матке и маточных трубах, а во время имплантации концентрация гиалуроновой кислоты возрастает. Гиалуроновая кислота связывается с CD44 рецепторами на поверхности эпителия эндометрия и за счет этого регулирует экспрессию ряда генов при имплантации эмбриона, а также участвует в процессах адгезии клеток, пролиферации, миграции и клеточной дифференцировке [273, 274]. Участие гиалуроновой кислоты в процессах имплантации эмбриона в физиологических условиях вызывает возрастающий интерес ученых к применению культуральной среды, обогащенной данным компонентом, в программах ВРТ.

У пациентов, включенных в настоящее исследование, был проведен анализ клинико-анамнестических характеристик, фактора бесплодия, частоты имплантации, частоты наступления беременности, а также живорождений. Полученные результаты не показали статистически значимого преимущества

среды, содержащей гиалуроновую кислоту, на исходы программы ВРТ. Тем не менее не стоит игнорировать тенденцию к снижению частоты ранних репродуктивных потерь у пациенток разных возрастных групп, особенно у пациенток поздней репродуктивного возраста. Так, у пациенток 24–30 лет при переносе эмбриона с использованием гиалурооовой кислоты доля невынашивания составляла 0%, а в группе сравнения – 20%; у женщин 30–36 лет – соответственно 0% и 5%; у женщин позднего репродуктивного возраста – соответственно 12% и 50%.

В 2021 г. *Tope Adeniyi et al.* опубликовали обзор исследований, посвященных использованию гиалуроновой кислоты для культивирования эмбриона в программах ВРТ. Кроме того, авторы проанализировали частоту наступления беременности и родов у пациенток в зависимости от способа культивирования эмбриона [275]. В исследование было включено 1018 пациенток, которым был выполнен перенос эмбриона в среде с низким содержанием гиалуроновой кислоты, и 1175 пациенток, которым эмбрион был перенесен в условиях высокого содержания гиалуроновой кислоты, при этом эмбрион находился в данной среде в течение 2–4 часов или в течение 10–30 минут. Результаты исследования показали, что использование культуральной среды, обогащенной гиалуроновой кислотой, статистически значительно повышает частоту наступления беременности и живорождений вне зависимости от времени культивирования эмбриона (продолжительное культивирование, ОШ: 1,21, 95%, ДИ: 0,99–1,48, быстрое культивирование, ОШ: 1,32, 95 %, ДИ: 1,02–1,72, общее ОШ: 1,26, 95 % ДИ: 1,03–1,54) по сравнению с культуральной средой с пониженным содержанием гиалуроновой кислоты. Полученные результаты показывают, что продолжительность культивирования эмбриона в среде с гиалуроновой кислотой не влияет на наступление беременности, однако обогащение культуральной среды гиалуроновой кислотой повышает эффективность программы ВРТ.

Гиалуроновая кислота положительно влияет на развитие эмбриона, на процессы децидуализации эндометрия, а также может выступать как источник эмбрионального фактора роста, так как небольшие концентрации гиалуроновой кислоты проникают через блестящую оболочку [276]. Тем самым использование гиалуроновой кислоты потенциально может способствовать прогрессированию беременности.

Противоречивые результаты других исследований могут быть связаны с тем, что в разных работах использовался небольшой объем культуральной среды (25–75 мкл). В работе К. Nakagawa et al. приводятся данные о том, что использование 1–2 мл среды с гиалуроновой кислотой оказало положительное влияние на частоту наступления беременности [277]. Кроме этого, концентрация гиалуроновой кислоты также отличается в средах разных производителей, что может влиять на интерпретацию результатов исследований. В кокрейновском обзоре, опубликованном в 2014 г. было описано положительное влияние культуральных сред, содержащих 0,5 мг/мл гиалуроновой кислоты, на частоту наступления клинической беременности [278].

Результаты нашей работы подтверждают необходимость дальнейших исследований для оптимизации использования культуральной среды, обогащенной гиалуроновой кислотой, а также определения показаний к ее применению у разных групп пациентов. Согласно обзорам, наиболее часто среда, обогащенная гиалуроновой кислотой, используется у пациенток позднего репродуктивного возраста [277]. Стоит отметить, что в данном исследовании наиболее выраженная тенденция к повышению частоты наступления беременности и живорождений была отмечена именно в данной возрастной группе ($p=0,8$ и $p=0,07$).

Полученные результаты позволяют рекомендовать применение культуральных сред с гиалуроновой кислотой у пациенток позднего репродуктивного возраста с множественными неудачными попытками ВРТ в

анамнезе, однако необходимы дальнейшие исследования с большей выборкой пациентов для оптимизации условий культивирования эмбриона.

В данном исследовании был проведён анализ уровня мтДНК у эмбрионов отличного/хорошего качества в зависимости от результата имплантации, качественных характеристик эмбриона, возраста матери, пола эмбриона и суток культивирования. Как известно, раннее развитие эмбриона зависит от серии координированных клеточных делений, регулируемых с помощью АТФ. Молекула АТФ образуется в митохондриях клеток. Во время стадии бластоцисты выработка АТФ повышается, чтобы обеспечить потребность клеток в энергии, необходимой для дальнейшей дифференциации клеток и развития эмбриона, а также для поддержания процессов, необходимых для имплантации. Повышение уровня мтДНК у нежизнеспособных эмбрионов наиболее вероятно связано с тем, что таким эмбрионам необходим дополнительный источник энергии в условиях клеточного стресса. Таким образом, для сохранения клеточных органелл повышается скорость образования новых митохондрий. В пользу гипотезы о повышении уровня мтДНК у эмбрионов, находящихся в условиях стресса, свидетельствует то, что у анеуплоидных эмбрионов содержание мтДНК гораздо выше по сравнению с эуплоидными [265]. Существует теория «тихого эмбриона», согласно которой жизнеспособный эмбрион имеет более низкий и «спокойный» метаболизм, в отличие от эмбрионов, находящихся в условиях клеточного стресса и обладающих сниженным потенциалом развития. В качестве альтернативной гипотезы выдвигается предположение, что некоторые эмбрионы увеличивают уровень мтДНК для компенсации митохондриального дефицита, связанного с мутациями в митохондриальном геноме [264]. В работе В. Liedo et al. описана взаимосвязь мутаций митохондриального генома и повышенного уровня мтДНК, что приводило к снижению частоты имплантации эмбрионов, имеющих гетероплазмичные варианты мтДНК [266].

Анализ результатов 218 программ ВРТ показал, что репродуктивные исходы не зависят от содержания мтДНК у эуплоидных бластоцист человека. Аналогичные данные были получены в результате предыдущих исследований, посвященных использованию мтДНК в качестве маркера имплантации [259, 260, 260, 262].

В двух работах, опубликованных в 2015 г. [259, 260], было продемонстрировано, что меньшее количество мтДНК в клетках трофобласта у эуплоидных эмбрионов служит маркером потенциально успешной имплантации бластоцисты в программах ВРТ. Diez-Juan et al. определили пороговое значение уровня мтДНК у эмбрионов, превышение которого никогда не приводило к наступлению беременности при переносе такого эмбриона. Другой исследователи разработали шкалу оценки потенциала эмбриона к имплантации в зависимости от количественного уровня мтДНК. В 2017 г. коллектив авторов во главе с E. Fragouli опубликовали еще две работы [263, 264], в которых определили пороговый уровень отсечки мтДНК, превышение которого не приведет к беременности при переносе эуплоидного эмбриона в программе ВРТ.

Результаты нашего исследования не полностью согласуются с вышеописанными выводами зарубежных коллег. Так, количественный уровень мтДНК не был связан с частотой имплантации в программах ВРТ. Кроме этого, в нашем исследовании не было обнаружено порогового значения уровня мтДНК, выше или ниже которого не наступает беременность. Таким образом, наши результаты согласуются с данными A. Victor et al. о том, что перенос эуплоидных эмбрионов с высоким количественным уровнем копий мтДНК может приводить к рождению здоровых детей [267, 268]. По данным исследования N.R. Treff et al. [261], при переносе двух эуплоидных эмбрионов разного пола 69 пациенткам и успешной имплантации одного из эмбрионов не было обнаружено разницы в относительном количестве мтДНК у эмбрионов, которые привели к наступлению беременности, и эмбрионов с отрицательным результатом

имплантации. Чтобы определить, является ли уровень содержания мтДНК предиктором имплантационного потенциала эмбриона, был проанализирован этот показатель у эмбрионов, полученных от одной пары. В исследование были включены пациентки, у которых в одном цикле при переносе эмбриона беременность не наступила, а в последующем цикле перенос размороженного эмбриона привел к наступлению беременности (39 женщин, 78 перенесенных эмбрионов). Изменений относительного уровня мтДНК у эмбрионов, полученных от одних родителей и обладающих разным имплантационным потенциалом, выявлено не было [269].

Результаты исследований не показали различий по количеству мтДНК у эмбрионов, полученных в группах женщин позднего репродуктивного возраста и более молодых пациенток [268]. Статистически значимые изменения были обнаружены только при сравнении групп пациенток 21–22 лет и 42–48 лет, что можно объяснить выраженными дисфункциональными изменениями у эмбрионов, полученных от пациенток позднего репродуктивного возраста.

Результаты нашего исследования показали, что количество копий мтДНК было значительно ниже у эмбрионов, подвергнутых биопсии на 6-е сутки, по сравнению с эмбрионами, биопсированными на 5-е сутки, что согласуется с результатами других исследователей [269]. Таким образом, содержание митохондрий в клетке преимплантационного эмбриона зависит от числа клеточных делений, предшествовавших биопсии, и может отражать снижение относительного содержания копий мтДНК на клетку в результате деления клеток в растущей бластоцисте. Важно отметить, что по достижении стадии бластоцисты факторы репликации мтДНК (POLGA, POLGB и TFAM) активируются, что ведет к увеличению общего числа копий мтДНК [270]. Frank Shao-Ying Wu et al. [271] считают, что основна причина культивирования эмбрионов до 6-го дня заключается в том, чтобы дать отстающим в развитии эмбрионам дополнительное время для развития. Следовательно, общая клеточная масса между бластоцистами 5-го и 6-го дня

должна быть примерно аналогичной. Авторы предположили, что ооциты, из которых получены бластоцисты 6-го дня, изначально содержали субоптимальное количество мтДНК, что вызвало энергетический дефицит и потребовало дополнительного времени для завершения процесса бластуляции. Для формирования полости бластоцисты необходимы высокие уровни АТФ, а морула, имеющая сниженную функцию митохондрий, не способна образовать бластоцель, что приводит к задержке ее развития. Таким образом, бластоцисты 6-х суток культивирования имеют замедленные метаболическую активность и развитие в результате внутреннего или внешнего стресса, заставляющего клетки увеличивать содержание мтДНК для компенсации энергетического дефицита.

В нашем исследовании было обнаружено, что эмбрионы с отличным морфологическим качеством клеток трофобласта (А) и экспансирующиеся бластоцисты содержали большее количество копий мтДНК на клетку по сравнению с эмбрионами, обладающими ТЭ хорошего качества (В). В ряде исследований было показано, что эмбрионы с отличными морфологическими характеристиками содержат меньшее количество мтДНК [272]. Таким образом, экспансирующаяся многоклеточная бластоциста с большим числом клеточных делений содержит меньший уровень мтДНК на клетку из-за дополнительных разделений доступных митохондрий при каждом делении клетки. Полученные данные подтверждают, что степень экспансии и митогенная активность бластоцисты влияют на содержание мтДНК.

Согласно результатам нашего исследования, уровень мтДНК в клетках трофобласта не позволяет прогнозировать имплантационный потенциал эмбриона и эффективность программы ВРТ. Стоит подчеркнуть, что бластоцисты со значительно повышенным уровнем мтДНК в клетках трофобласта приводили к рождению здоровых детей в программах ВРТ. Более того, не рекомендовано использовать произвольное пороговое значение уровня мтДНК, так как в разных клиниках были получены разные точки отсечки количественного содержания мтДНК в клетках, превышение

которого не приводило к наступлению беременности при переносе зуплоидного эмбриона в программах ВРТ. Описанные в нашей работе результаты подтверждают, что в клетках бластоцисты на 5-е сутки после оплодотворения содержится значительно большее количество мтДНК, чем у бластоцист на 6-е сутки культивирования, а количественный уровень мтДНК является одним из ключевых в отношении скорости развития бластоцисты.

Стоит отметить, что на сегодняшний день разработаны и предложены несколько лекарственных средств, активирующих биогенез (рапамицин, ресвератрол) и функциональную способность (коэнзим Q10) митохондрий. Для лучшего понимания роли мтДНК в процессах раннего эмбриогенеза и клинической ценности данного маркера необходимы дополнительные исследования, включающие оценку взаимосвязи морфологических характеристик зуплоидных эмбрионов и количественного уровня мтДНК, полученных как в общей группе пациентов, так и от одной пары. Определение уровня митохондриальной ДНК можно использовать его в качестве критерия дополнительного критерия селекции для повышения программ ВРТ с ПГТ-А.

Таким образом, цель программ лечения бесплодия методами ВРТ всегда заключалась в здоровой беременности и рождении здорового ребенка, а генетическое тестирование эмбрионов все чаще становится эффективным инструментом для достижения этой цели. Что наиболее важно, использование ПГТ существенно не отличается от многих других акушерских вмешательств и методов ВРТ, которые призваны максимизировать шанс рождения здорового ребенка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показанная на обширном клиническом материале структура бесплодного брака в Российской Федерации требует использования преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах лечения бесплодия методами ВРТ у 8% пар как меры профилактики рождения детей с генетическими нарушениями. Проведенное исследование позволило тщательным образом клинически охарактеризовать пары, вступающие в программу лечения бесплодия методами ВРТ, и выявило дополнительные группы пациентов с высоким риском рождения детей с генетическими аномалиями.

Проведение ПГТ служит эффективным способом первичной профилактики многих наследственных заболеваний. По мере совершенствования и развития различных методик ПГТ, а также определения показаний к данному исследованию, растет и потребность в программах ВРТ с определением хромосомного статуса эмбриона среди пар с различными факторами бесплодия. Согласно полученным данным, эффективность программ ЭКО/ИКСИ с ПГТ сопоставима у мужчин и женщин в различных возрастных группах, с различными формами бесплодия.

Несмотря на повышение стоимости программы ВРТ с применением ПГТ, у пар с фактором мужского бесплодия определение хромосомного статуса эмбриона является экономически выгодной стратегией. Для снижения числа рождения больных детей целесообразно включение в программу обязательного медицинского страхования проведение преимплантационного генетического тестирования.

В диссертационном исследовании успешно индивидуализировано и оптимизировано ведение больных в программе ЭКО с помощью новейших методик в сфере генетики, что позволяет повысить эффективность и безопасность программ ВРТ, а также увеличить процент рождения живых здоровых детей.

ВЫВОДЫ

1. При лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий потребность в проведении преимплантационного генетического тестирования составляет 8%.
2. Выявленная устойчивая тенденция к увеличению среднего возраста пациенток при проведении вспомогательных репродуктивных технологий (с $33,7 \pm 2,1$ до $36,1 \pm 1,5$ года) диктует необходимость проведения преконцепционной профилактики рождения детей с генетическими нарушениями у женщин позднего репродуктивного возраста. Согласно проведенному клинико-экономическому анализу применение ПГТ-А снижает кумулятивные затраты на 1 живорождение у женщин 37–42 лет на 29,0% по сравнению с ВРТ без генетического тестирования эмбрионов. В расчете на 5-летний использование ПГТ-А увеличивает число живорождений (нарастающим итогом) в 1,95 раза.
3. У женщин до 35 лет с невынашиванием беременности, синдромом поликистозных яичников и наружным генитальным эндометриозом I и II стадий распространения проведение преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии не является клинически целесообразной и экономически выгодной стратегией, так как частота наступления беременности и живорождения статистически значимо не отличается от таковой при вспомогательных репродуктивных технологиях без преимплантационного генетического тестирования. Так, кумулятивные затраты на 1 живорождение при синдроме поликистозных яичников увеличиваются на 26,5%, при наружном генитальном эндометриозе — на 16,8%, а в случае невынашивания беременности не изменяются.
4. Частота получения эуплоидных эмбрионов у мужчин моложе 40 лет составляет 50,9%, 40–48 лет — 47,2%. На результативность лечения

бесплодия влияет не возраст мужчин (32–48 лет), а тяжесть нарушений сперматогенеза. Клинико-экономический анализ указывает на целесообразность выполнения преимплантационного генетического тестирования эмбрионов у пар при оплодотворении сперматозоидами, полученными из биоптата яичка (встречаемость генетически аномальных эмбрионов при данной патологии сперматогенеза увеличивается в 1,75 раза по сравнению с нормозооспермией).

5. Частота наступления беременности и живорождений у пар с нарушениями кариотипа при использовании аутологичных половых клеток в программах вспомогательных репродуктивных технологий с преимплантационным генетическим тестированием эмбрионов на структурные перестройки и анеуплоидии составила 40,9% и 36,3% соответственно в расчете на перенос.
6. Уровень истинного мозаицизма при использовании высокопроизводительного секвенирования следующего поколения у пациентов в программах ВРТ с ПГТ составляет 5,3%. В случае отсутствия генетически нормальных бластоцист по результатам преимплантационного генетического тестирования перенос эмбрионов с мозаицизмом возможен с учетом оценки индивидуальных рисков рождения детей с генетическими нарушениями, типа хромосом, вовлеченных в мозаицизм, и при обязательном проведении пренатальной диагностики на этапе вынашивания беременности.
7. Преимплантационное генетическое тестирование на моногенные заболевания и анеуплоидии у фертильных пар с носительством моногенных заболеваний является эффективным по числу рожденных здоровых детей (родилось 8 здоровых детей у пациентов–носителей 16 различных моногенных заболеваний).

8. У женщин позднего репродуктивного возраста (37–43 года) использование культуральных сред с гиалуроновой кислотой статистически значимо снижает частоту ранних репродуктивных потерь в сроке до 12 недель гестации — в 1,73 раза. В общей когорте пациенток использование на эмбриологическом этапе культуральных сред, содержащих гиалуроновую кислоту, при переносе зуплоидного эмбриона не повышает частоту имплантации.
9. Оценка уровня копийности мтДНК в программах вспомогательных репродуктивных технологий с преимплантационным генетическим тестированием является маркером выбора зуплоидного эмбриона с максимальным имплантационным потенциалом для переноса в полость матки. Частота невынашивания беременности до 12 недель гестации в 3,4 раза выше при уровне копийности мтДНК эмбриона $\geq 21,17$ у.е.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

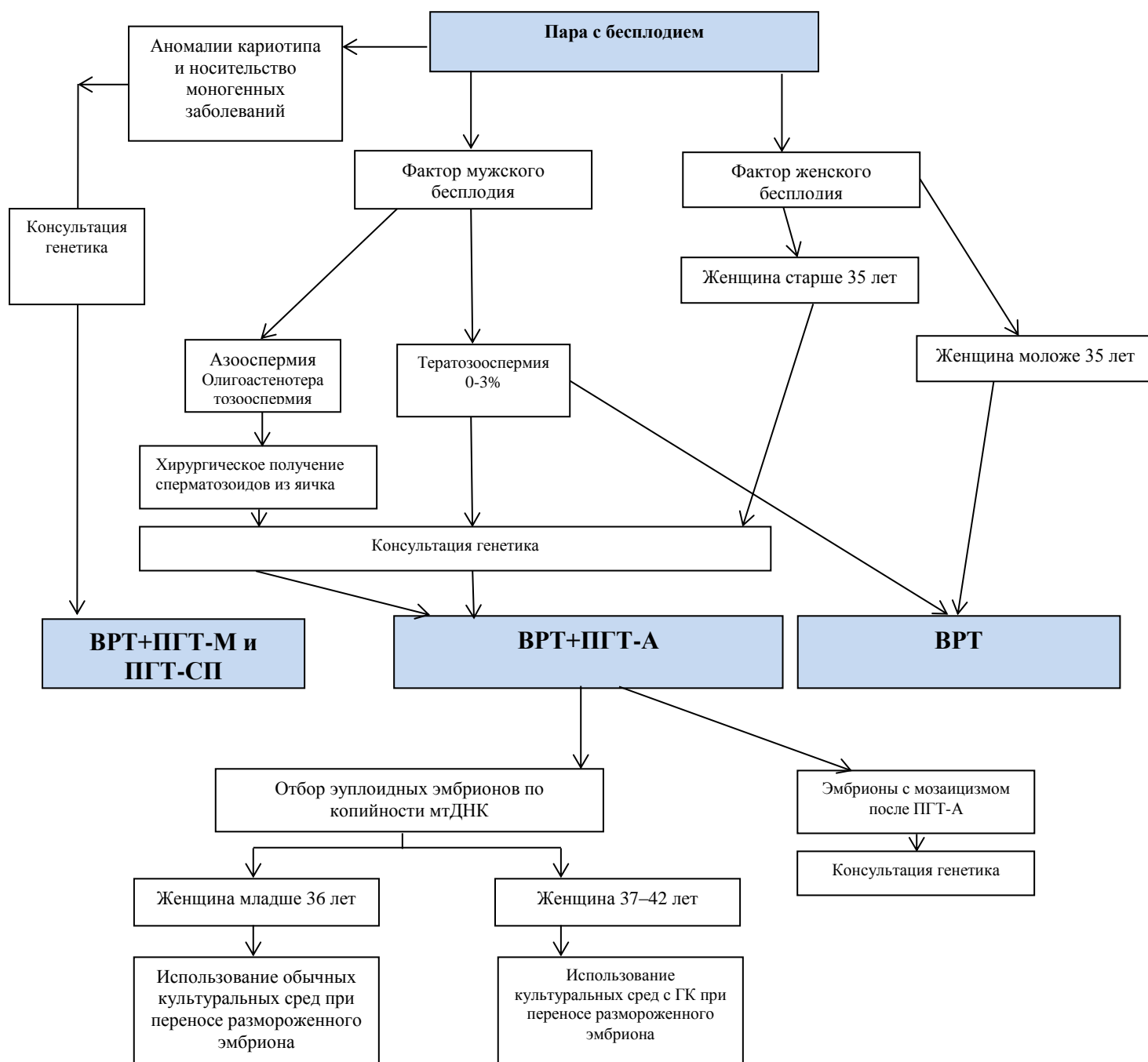
1. Преконцепционная подготовка пары к вспомогательным репродуктивным технологиям должна включать сбор клинико-анамнестических данных, при необходимости консультацию медицинского генетика и выявление групп пациентов для проведения преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в целях максимального снижения риска рождения детей с генетическими нарушениями.
2. При тяжелых формах нарушений сперматогенеза (олигозооспермия) и при использовании для оплодотворения сперматозоидов, выделенных из ткани яичка, в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий применение преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии клинически целесообразно и экономически выгодно. Данной группе пациентов следует проводить медико-генетическое консультирование для оценки риска рождения детей с хромосомными нарушениями и информированности по поводу высокой частоты получения анеуплоидных эмбрионов.
3. Перенос эмбрионов с мозаицизмом в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий с преимплантационным генетическим тестированием эмбрионов возможен при консультировании пары акушером-гинекологом, клиническим генетиком, с тщательной оценкой индивидуальных рисков рождения больного ребенка, типа и уровня хромосомного мозаицизма, подписании информированного добровольного согласия и при обязательном последующем проведении пренатальной диагностики.
4. Фертильным парам с носительством моногенных заболеваний и аномалиями кариотипа рекомендовано проведение вспомогательных репродуктивных технологий с преимплантационным генетическим

тестированием эмбрионов. Данную информацию следует широко освещать в медико-генетических центрах и женских консультациях с проведением прекоцепционного консультирования пациентов до лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий.

5. Женщинам старше 37 лет для снижения рисков невынашивания беременности на ранних сроках рекомендовано применение на эмбриологическом этапе культуральных сред с гиалуроновой кислотой.
6. Определение уровня копийности мтДНК служит дополнительным информативным маркером выбора эуплоидного эмбриона для переноса, что позволяет снизить частоту неразвивающихся беременностей и самопроизвольных выкидышей при уровне копийности $<21,17$ у.е. Целесообразно включить параметр копийности мтДНК в результаты преимплантационного генетического тестирования для оптимизации выбора эмбриона в случае наличия нескольких эуплоидных бластоцист для повышения эффективности лечения бесплодия методами ВРТ.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Алгоритм персонафицированного ведения пар в программах вспомогательных репродуктивных технологий с преимплантационным генетическим тестированием эмбрионов



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Драпкина О.М. и др. Укрепление здоровья и профилактика хронических неинфекционных заболеваний в условиях пандемии и самоизоляции. Консенсус экспертов Национального медицинского исследовательского центра терапии и профилактической медицины и Российского общества профилактики неинфекционных заболеваний. Кардиоваскулярная терапия и профилактика / Драпкина О.М., Гамбарян М.Г., Горный Б.Э., Карамнова Н.С., Концевая А.В., Новикова Н.К., Попович М.В., Рыбаков И.А., Калинина А.М. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2020. – №19 (3). – P.2605.
2. Донников А.Е. Этические вопросы, связанные с преконцепционным генетическим скринингом: исторический опыт и современные тенденции / Донников А.Е. // Акушерство и гинекология. – 2019. – №11. – С. 46-54.
3. Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация. Клинические рекомендации (протокол лечения) / МЗ РФ. – М., 2019. – С. 129. – URL: https://rahr.ru/d_pech_mat_metod/%d0%92%d0%a0%d0%a21.pdf
4. Holmqvist V. et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy / Holmqvist V, Roos L.K.S, Kjartansdottir K.R. // Ugeskr Laeger. – 2019. – №181 (20). – P. V12180849.
5. Савостина Г.В. и др. Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии: возможности, проблемы и перспективы / Савостина Г.В., Перминова С.Г., Екимов А.Н. // Акушерство и гинекология. – 2021. – №11. – С. 42-49.
6. Sciorio R. et al. PGT-A preimplantation genetic testing for aneuploidies and embryo selection in routine ART cycles: Time to step back? / Sciorio R., Dattilo M. // Clinical Genetics. – 2020. – №98 (2). – P. 107-115.
7. Siermann M. et al. A systematic review of the views of healthcare professionals on the scope of preimplantation genetic testing / Siermann M., Claesen Z., Pasquier L. // Journal of Community Genetics. – 2022. – №13 (1). – P.1-11.
8. Долгушина Н.В. и др. Клинико-экономический анализ эффективности преимплантационного генетического скрининга у пациенток позднего репродуктивного возраста / Долгушина Н.В., Коротченко О.Е., Бейк Е.П. // Акушерство и гинекология. – 2017. – №11. – С. 56-61.
9. Коротченко О.Е. и др. Эффективность преимплантационного

- генетического скрининга у пациенток с привычным невынашиванием беременности и бесплодием / Коротченко О.Е., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. // Акушерство и гинекология. – 2018. – №3. – С. 64-9.
10. Долгушина Н.В. и др. Преимплантационный генетический скрининг у супружеских пар с патозооспермией у мужчин: анализ затраты – эффективность / Долгушина Н.В., Сокур С.А., Горшкова А.Г. // Акушерство и гинекология. – 2014. – №4. – С. 51-61.
 11. Doody K.J. Infertility Treatment Now and in the Future / Doody K.J. // *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. – 2021. – №48 (4). – P. 801-812.
 12. Idelson A. et. al. New predictors of early impaired placentation preceding miscarriage before 10 weeks of gestation in IVF pregnancies: A prospective study / Idelson A., Meiri H., Wertheimer A. // *Placenta*. – 2020. – №100. – P.30-34.
 13. Митюрин Е.В. и др. Причины повторных неудач имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения / Митюрин Е.В., Перминова С.Г., Амян Т.С. // Акушерство и гинекология. – 2016. – №11. – С.34-40.
 14. Zegers-Hochschild F. et. al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017 / Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., Dyer S. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №108 (3). – P.393-406.
 15. Rubio C. et. al. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study / Rubio C., Bellver J., Rodrigo L. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №107 (5). – P.1122-1129.
 16. Ubaldi F.M. et. al. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy testing in women older than 44 years: a multicenter experience / Ubaldi F.M., Cimadomo D., Capalbo A. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №107 (5). – P. 1173-1180.
 17. Sarkar P. et. al. The role of preimplantation genetic testing for aneuploidy in a good prognosis IVF population across different age groups / Sarkar P., Jindal S., New E.P. // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2021. – №67 (5). – P.366-373.
 18. Lledó B. Implantation potential of mosaic embryos / Lledó B., Morales R., Ortiz J.A. // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2017. – №63 (3). – P.206-208.
 19. Sato T. et. al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: a comparison of live birth rates in patients with recurrent pregnancy loss due to embryonic

- aneuploidy or recurrent implantation failure / Sato T., Sugiura-Ogasawara M., Ozawa F. // *Human Reproduction*. – 2020. – №35 (1). – P.255.
- 20.Sato T. et. al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: a comparison of live birth rates in patients with recurrent pregnancy loss due to embryonic aneuploidy or recurrent implantation failure / Sato T., Sugiura-Ogasawara M., Ozawa F. // *Human Reproduction*. – 2019. – №34 (12). – P.2340-2348.
- 21.Liu T. et. al. Association of β -arrestin1 and p53-Mdm2 signaling in the development of missed abortion / Liu T., Ma Y., Yin Q. // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 2021. – №47 (5). – P.1675-1685.
- 22.Wang C. et. al. Impact of metabolic disorders on endometrial receptivity in patients with polycystic ovary syndrome / Wang C., Wen Y.X., Mai Q.Y. // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2022. – №23 (3). – P.221.
- 23.Wang Q. et. al. Low aneuploidy rate in early pregnancy loss abortuses from patients with polycystic ovary syndrome / Wang Q., Luo L., Lei Q. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2016. – №33 (1). – P.85-92.
- 24.Luo L. et. al. Early miscarriage rate in lean polycystic ovary syndrome women after euploid embryo transfer - a matched-pair study / Luo L., Gu F., Jie H. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2017. – №35 (5). – P.576-582.
- 25.Handyside A.H. «Designer babies» almost thirty years on / Handyside A.H. // *Reproduction*. – 2018. – №156 (1). – P.F75-F79.
- 26.Cohen J. et. al. Past performance of assisted reproduction technologies as a model to predict future progress: a proposed addendum to Moore's law / Cohen J., Alikani M., Bisignano A. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2012. – №25 (6). – P.585-90.
- 27.Thackray A. et. al. Moore's Law: The Life of Gordon Moore, Silicon Valey's Quiet Revolutionary / Thackray A, Brock DC, Jones R. // 2015. – New York: Basic Books. – P. 560.
- 28.Bülow N.S. et. al. Impact of letrozole co-treatment during ovarian stimulation with gonadotrophins for IVF: a multicentre, randomized, double-blinded placebo-controlled trial / Bülow N.S., Skouby S.O., Warzecha A.K. // *Human Reproduction*. – 2022. – №37 (2). – P.309-321.
- 29.Sciorio R. et. al. Review: Preimplantation genetic diagnosis (PGD) as a reproductive option in patients with neurodegenerative disorders / Sciorio R., Aiello R., Irollo A.M. // *Reproductive Biology*. – 2021. – №21 (1). – P.100468.
- 30.Thorne J. et. al. Euploidy rates between cycles triggered with gonadotropin-releasing hormone agonist and human chorionic gonadotropin / Thorne J., Loza A., Kaye L. // *Fertility and Sterility*. – 2019. – №112 (2). – P.258-265.

31. Verberg M.F. et al. The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis / Verberg M.F., Eijkemans M.J., Macklon N.S. // *Human Reproduction Update*. – 2009. – №15 (1). – P.5-12.
32. Sekhon L. et al. The cumulative dose of gonadotropins used for controlled ovarian stimulation does not influence the odds of embryonic aneuploidy in patients with normal ovarian response / Sekhon L., Shaia K., Santistevan A. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2017. – №34 (6). – P.749-758.
33. Kline J. et al. Embryonic lethal genetic variants and chromosomally normal pregnancy loss / Kline J., Vardarajan B., Abhyankar A. // *Fertility and Sterility*. – 2021. – №116 (5). – P.1351-1358.
34. Soltani N. et al. Cytogenetic Studies of 608 Couples with Recurrent Spontaneous Abortions in Northeastern Iran / Soltani N., Mirzaei F., Ayatollahi H. // *Iranian Journal of Pathology*. – 2021. – №16 (4). – P.418-425.
35. Benchikh S. et al. Chromosome Abnormalities Related to Reproductive and Sexual Development Disorders: A 5-Year Retrospective Study / Benchikh S., Bousfiha A., Razoki L. // *BioMed Research International*. – 2021. – №2021. – P.8893467.
36. Webster A. et al. Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs / Webster A., Schuh M. // *Trends in Cell Biology*. – 2017. – №27 (1). – P.55-68.
37. Capalbo A. et al. Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging / Capalbo A., Hoffmann E.R., Cimadomo D. // *Human Reproduction Update*. – 2017. – №23 (6). – P.706-722.
38. Tunç E. et al. Chromosomal analyses of 1510 couples who have experienced recurrent spontaneous abortions / Tunç E., Tanrıverdi N., Demirhan O. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2016. – №32 (4). – P.414-9.
39. Fragouli E. et al. The cytogenetic constitution of human blastocysts: insights from comprehensive chromosome screening strategies / Fragouli E., Munne S., Wells D. // *Human Reproduction Update*. – 2019. – №25 (1). – P.15-33.
40. McCoy R.C. Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities Are the Norm / McCoy R.C. // *Trends in Genetics*. – 2017. – №33 (7). – P. 448–463.
41. Taylor T.H. et al. The origin, mechanisms, incidence and clinical

- consequences of chromosomal mosaicism in humans / Taylor T.H., Gitlin S.A., Patrick J.L. // *Human Reproduction Update*. – 2014. – №20 (4). – P.571-81.
- 42.Capalbo A. et. al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development / Capalbo A., Bono S., Spizzichino L. // *Human Reproduction*. – 2013. – №28 (2). – P.509-18.
- 43.Munné S. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing / Munné S., Blazek J., Large M. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №108 (1). – P.62-71.
- 44.Popovic M. et. al. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate diagnostic dilemma / Popovic M., Dhaenens L., Boel A. // *Human Reproduction Update*. – 2020. – №26 (3). – P.313-334.
- 45.Vera-Rodriguez M. et. al. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos / Vera-Rodriguez M., Rubio C. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №107 (5). – P.1107-1112.
- 46.Chuang Tzu-Hsuan. et. al. The Incidence of Mosaicism for Individual Chromosome in Human Blastocysts Is Correlated With Chromosome Length / Chuang Tzu-Hsuan, Chang Ya-Ping, Lee Meng-Ju // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – №11. – P.1677 -1787.
- 47.Preimplantation Genetic Diagnosis International Society PGDIS position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocyst stage // URL: <https://www.pgdis-position-statement-chromosome-mosaicism-testing>. 2016 (08.07.2022).
- 48.Besser A. G. et. al. Counselling considerations for chromosomal mosaicism detected by preimplantation genetic screening / Besser A.G., Mounts E.L. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2017. – №34. – P.369–374.
- 49.Greco E. et. al. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts / Greco E., Minasi M.G., Fiorentino F. // *The New England Journal of Medicine*. – 2015. – №373. – P.2089–2090.
- 50.Spinella F. et. al. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments / Spinella F., Fiorentino F., Biricik A. // *Fertility and Sterility*. – 2018. – №109 (1). – P.77-83.
- 51.D'Gama A.M. et. al. Somatic mosaicism and neurodevelopmental disease / D'Gama A.M., Walsh C.A. // *Nature Neuroscience*. – 2018. – №21 (11). – P.1504-1514.

52. Fragouli E. et. al. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid-aneuploid blastocysts / Fragouli E., Alfarawati S., Spath K. // *Human Genetics*. – 2017. – №136 (7). – P.805-819.
53. Sekhon L. et. al. The incidence of mosaicism is not associated with advanced maternal age or diminished ovarian reserve / Sekhon L., Feuerstein J., Nazem T.G. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №108 (3). – P.e217.
54. Zeng Y. et. al. Bi-allelic mutations in MOS cause female infertility characterized by preimplantation embryonic arrest / Zeng Y., Shi J., Xu S. // *Human Reproduction*. – 2022. – №37 (3). – P.612-620.
55. Capalbo A. et. al. Mosaic human preimplantation embryos and their developmental potential in a prospective, non-selection clinical trial / Capalbo A., Poli M., Rienzi L. // *The American Journal of Human Genetics*. – 2021. – №108 (12). – P.2238-2247.
56. Hu Y. et. al. Clinical utility of expanded NIPT for chromosomal abnormalities and etiology analysis of cytogenetic discrepancies cases / Hu Y., Liu W., He G. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2022. – №39 (1). – P.267-279.
57. Patrizio P. et. al. Worldwide live births following the transfer of chromosomally "Abnormal" embryos after PGT/A: results of a worldwide web-based survey / Patrizio P., Shoham G., Shoham Z. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2019. – №36 (8). – P.1599-1607.
58. Patrizio P. et. al. Worldwide live births following the transfer of chromosomally "Abnormal" embryos after PGT/A: results of a worldwide web-based survey / Patrizio P., Shoham G., Shoham Z. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2019. – №36 (8). – P.1599-1607.
59. Gleicher N. et. al. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review / Gleicher N., Orvieto R. // *Journal of Ovarian Research*. – 2017. – №10 (1). – P.21.
60. Wu W.J. et. al. Normal prenatal ultrasound findings reflect outcome in case of trisomy 14 confined placental mosaicism developing after preimplantation genetic diagnosis / Wu W.J., Ma G.C., Lee M.H. // *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. – 2017. – №50 (1). – P.128-130.
61. Orvieto R. Preimplantation genetic screening - the required RCT that has not yet been carried out / Orvieto R. // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2016. – №14 (1). – P.35.
62. Gulersen M. et. al. The impact of preimplantation genetic testing for

- aneuploidy on prenatal screening / Gulersen M., Peyser A., Kim J. // Journal of Perinatal Medicine. – 2021. – №50 (3). – P.300-304.
63. Grati F.R. et. al. An evidence-based scoring system for prioritizing mosaic aneuploid embryos following preimplantation genetic screening / Grati F.R., Galazzi G., Branca L. // Reproductive BioMedicine Online. – 2018. – №36 (4). – P.442-449.
64. Shahine L.K. et. al. Higher rates of aneuploidy in blastocysts and higher risk of no embryo transfer in recurrent pregnancy loss patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization / Shahine L.K., Marshal L., Lamb J.D. // Fertility and Sterility. – 2016. – №106 (5). – P.1124-1128.
65. Papas R.S. et. al. Genetic Testing for Aneuploidy in Patients Who Have Had Multiple Miscarriages: A Review of Current Literature / Papas R.S., Kutteh W.H. // The Application of Clinical Genetics. – 2021. – №14. – P.321-329.
66. Chamayou S. et. al. The accumulation of vitrified oocytes is a strategy to increase the number of euploid available blastocysts for transfer after preimplantation genetic testing / Chamayou S., Sicali M., Alecci C. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2017. – №34 (4). – P.479-486.
67. Hu X. et. al. Embryo pooling: a promising strategy for managing insufficient number of embryos in preimplantation genetic diagnosis / Hu X., Ding C., Zhang D. // Gynecological Endocrinology. – 2017. – №33 (11). – P.867-871.
68. Coates A. et. al. Differences in pregnancy outcomes in donor egg frozen embryo transfer (FET) cycles following preimplantation genetic screening (PGS): a single center retrospective study / Coates A., Bankowski B.J., Kung A. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2017. – №34 (1). – P.71-78.
69. Беляева Н.А. и др. Возможности применения преимплантационной генетической диагностики с целью повышения эффективности программ ЭКО/ИКСИ у супружеских пар с мужским фактором бесплодия и генетическими особенностями у мужчин / Беляева Н.А., Калинина Е.А., Горшинова В.К. // Акушерство и гинекология. – 2016. – №8. – С.107-111.
70. Долгушина Н.В. и др. Риск анеуплоидии эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий у мужчин с патозооспермией (мета-анализ) / Долгушина Н.В., Ратушняк С.С., Сокур С.А. // Акушерство и гинекология. – 2012. – №7. – С.4-13.
71. Глинкина Ж.И. и др. Использование высокопроизводительного секвенирования (NGS) в целях профилактики хромосомной патологии

- в программе ВРТ / Глинкина Ж.И., Курцер М.А., Младова Е.С. // Вестник Росздравнадзора. – 2016. – №5. – С.40-43.
72. Mazzilli R. et. al. Effect of the male factor on the clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection combined with preimplantation aneuploidy testing: observational longitudinal cohort study of 1,219 consecutive cycles / Mazzilli R., Cimadomo D., Vaiarelli A. // Fertility and Sterility. – 2017. – №108 (6). – P.961-972.
73. García-Ferreya J. et. al. High Aneuploidy Rates Observed in Embryos Derived from Donated Oocytes are Related to Male Aging and High Percentages of Sperm DNA Fragmentation / García-Ferreya J., Luna D., Villegas L. // Clinical Medicine Insights: Reproductive Health. – 2015. – №9. – P.21-7.
74. Jiang Z. et. al. Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction / Jiang Z., Wang Y., Lin J. // Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. – 2017. – №44. – P.90-104.
75. Sampino S. et. al. Effects of blastomere biopsy on post-natal growth and behavior in mice / Sampino S., Zacchini F., Swiergiel A.H. // Human Reproduction. – 2014. – №29 (9). – P.1875-83.
76. Yao Q. et. al. Blastomere removal from cleavage-stage mouse embryos alters placental function, which is associated with placental oxidative stress and inflammation / Yao Q., Chen L., Liang Y. // Scientific Reports. – 2016. – №6. – P.25023
77. Hasson J. et. al. Obstetric and neonatal outcomes of pregnancies conceived after preimplantation genetic diagnosis: cohort study and meta-analysis / Hasson J., Limoni D., Malcov M. // Reproductive BioMedicine Online. – 2017. – №35 (2). – P.208-218.
78. Cimadomo D. et. al. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis / Cimadomo D., Capalbo A., Ubaldi F.M. // BioMed Research International. – 2016. – №2016. – P.7193075.
79. Bay B. et. al. Preimplantation genetic diagnosis: a national multicenter obstetric and neonatal follow-up study / Bay B., Ingerslev H.J., Lemmen J.G. // Fertility and Sterility. – 2016. – №106 (6). – P.1363-1369.
80. Sunkara S.K. Et. al. Pre-term birth and low birth weight following preimplantation genetic diagnosis: analysis of 88 010 singleton live births following PGD and IVF cycles / Sunkara S.K., Antonisamy B., Selliah H.Y. // Human Reproduction. – 2017. – №32 (2). – P.432-438.
81. Zacchini F. et. al. Embryo biopsy and development: the known and the

- unknown / Zacchini F., Arena R., Abramik A. // *Reproduction*. – 2017. – №154 (5). – P.R143-R148.
- 82.Ravichandran K. et. al. Mitochondrial DNA quantification as a tool for embryo viability assessment: retrospective analysis of data from single euploid blastocyst transfers / Ravichandran K., McCaffrey C., Grifo J. // *Human Reproduction*. – 2017. – №32 (6). – P.1282-1292.
- 83.Fragouli E. et. al. Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: a blinded prospective non-selection study / Fragouli E., McCaffrey C., Ravichandran K. // *Human Reproduction*. – 2017. – №32 (11). – P.2340-2347.
- 84.Treff N.R. et. al. Levels of trophectoderm mitochondrial DNA do not predict the reproductive potential of sibling embryos / Treff N.R., Zhan Y., Tao X. // *Human Reproduction*. – 2017. – №32 (4). – P.954-962.
- 85.Punab M. et. al. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts / Punab M., Poolamets O., Paju P. // *Human Reproduction*. – 2017. – №32 (1). – P.18-31.
- 86.Bergh C. et. al. Parental age and child outcomes / Bergh C., Pinborg A., Wennerholm U.B. // *Fertility and Sterility*. – 2019. – №111 (6). – P.1036-1046.
- 87.Khandwala Y.S. et. al. The age of fathers in the USA is rising: an analysis of 168 867 480 births from 1972 to 2015 / Khandwala Y.S., Zhang C.A., Lu Y. // *Human Reproduction*. – 2017. – №32 (10). – P.2110-2116.
- 88.Sagi-Dain L. et. al. Effect of paternal age on reproductive outcomes in oocyte donation model: a systematic review / Sagi-Dain L., Sagi S., Dirnfeld M. // *Fertility and Sterility*. – 2015. – №104 (4). – P.857-865.
- 89.ESHRE PGT Consortium Steering Committee et. al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT / ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho F., Coonen E. // *Human Reproduction Open*. – 2020.
- 90.Kahraman S. et. al. High rates of aneuploidy, mosaicism and abnormal morphokinetic development in cases with low sperm concentration / Kahraman S., Sahin Y., Yelke H. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2020. – №37 (3). – P.629-640.
- 91.Magli M.C. et. al. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos / Magli M.C., Gianaroli L., Ferraretti A.P. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2009. – №18 (4). – P.536-42.
- 92.Cheung S. et. al. Genetic and epigenetic profiling of the infertile male /

- Cheung S., Parrella A., Rosenwaks Z. // PLoS One. – 2019. – №14 (3).
93. Tarozzi N. et. al. Male factor infertility impacts the rate of mosaic blastocysts in cycles of preimplantation genetic testing for aneuploidy / Tarozzi N., Nadalini M., Lagala C. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2019. – №36 (10). – P.2047-2055.
94. Scott R.T. 3rd. et. al. Mitochondrial DNA content is not predictive of reproductive competence in euploid blastocysts / Scott R.T. 3rd, Sun L., Zhan Y. // Reproductive BioMedicine Online. – 2020. – №41 (2). – P.183-190.
95. Klimczak A.M. et. al. Role of the sperm, oocyte, and embryo in recurrent pregnancy loss / Klimczak A.M., Patel D.P., Hotaling J.M. // Fertility and Sterility. – 2021. – №115 (3). – P.533-537.
96. Rodrigo L. et. al. Sperm chromosomal abnormalities and their contribution to human embryo aneuploidy / Rodrigo L., Meseguer M., Mateu E. // Biology of Reproduction. – 2019. – №101 (6). – P.1091-1101.
97. Сокур С. А. и др. Взаимосвязь патозооспермии и анеуплоидии хромосом в сперматозоидах и эмбрионах в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Сокур С.А., Долгушина Н.В., Глинкина Ж.И. // Акушерство и гинекология. – 2013. – №3. – С.10-13.
98. Беляева Н.А. и др. Возможности применения преимплантационной генетической диагностики с целью повышения эффективности программ ЭКО/ИКСИ у супружеских пар с мужским фактором бесплодия и генетическими особенностями у мужчин / Беляева Н.А., Калинина Е.А., Горшинова В.К. // Акушерство и гинекология. – 2016. – №8. – С.107-111.
99. Jiang S. et. al. The role of total chromosomal disomy in human spermatozoa as a predictor of the outcome of pre-implantation genetic screening / Jiang S, Peng X, Gong F // Fertility and Sterility. – 2020. – №113 (6). – P.1196-1204.
100. Rubio C. et. al. PREIMPLANTATION GENETIC TESTING: Chromosome abnormalities in human embryos / Rubio C., Rodrigo L., Simón, C. // Reproduction. – 2020. – №160 (5). – P.A33-A44.
101. Rodrigo L. et. al. Characteristics of the IVF Cycle that Contribute to the Incidence of Mosaicism / Rodrigo L., Clemente-Císcar M., Campos-Galindo I. // Genes (Basel). – 2020. – №11 (10). – P.1151.
102. Xu R. et. al. Comparison of preimplantation genetic testing for aneuploidy versus intracytoplasmic sperm injection in severe male infertility

- / Xu R., Ding Y., Wang Y. // *Andrologia*. – 2021. – №53 (6). – P. e14065.
103. Dviri M. et. al. Is there a correlation between paternal age and aneuploidy rate? An analysis of 3,118 embryos derived from young egg donors / Dviri M., Madjunkova S., Koziarz A. // *Fertility and Sterility*. – 2020. – №114 (2). – P.293-300.
104. Lee E. et. al. A cost-effectiveness analysis of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) for up to three complete assisted reproductive technology cycles in women of advanced maternal age / Lee E., Costello M.F., Botha W.C. // *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. – 2019. – №59 (4). – P.573-579.
105. Kolanska K. et. al. Endometriosis with infertility: A comprehensive review on the role of immune deregulation and immunomodulation therapy / Kolanska K., Alijotas-Reig J., Cohen J. // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2021. – №85 (3). – P.e13384.
106. Wu M.H. et. al. Quality of life among infertile women with endometriosis undergoing IVF treatment and their pregnancy outcomes / Wu M.H., Su P.F., Chu W.Y. // *Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology*. – 2021. – №42 (1). – P.57-66.
107. Zhong C. et. al. Analysis of IVF/ICSI Outcomes in Endometriosis Patients With Recurrent Implantation Failure: Influence on Cumulative Live Birth Rate / Zhong C., Gao L., Shu L. // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2021. – №12. – P.640288.
108. Yin Y. et. al. Insufficient Cumulus Expansion and Poor Oocyte Retrieval in Endometriosis-Related Infertile Women / Yin Y., Mao Y., Liu A. // *Reproductive Sciences*. – 2021. – №28 (5). – P.1412-1420.
109. Козаченко И.Ф. и др. Роль малоинвазивных внутриматочных вмешательств в повышении результативности программ ЭКО / Козаченко И.Ф., Аракелян А.С., Смольникова В.Ю. // *Акушерство и гинекология*. – 2020. – №9. – С.97-104.
110. de Ziegler D. et. al. Assisted reproduction in endometriosis / de Ziegler D., Pirtea P., Carbonnel M. // *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2019. – №33 (1). – P.47-59.
111. Broi D.A. et. al. Oocyte oxidative DNA damage may be involved in minimal/mild endometriosis-related infertility / Broi D.A., Jordão-Jr M.G., Ferriani A.A. // *Molecular Reproduction and Development*. – 2018. – №85. – P.128-136.
112. Pirtea P. et. al. Effects of endometriosis on assisted reproductive technology: gone with the wind / Pirtea P., de Ziegler D., Ayoubi J.M. //

- Fertility and Sterility. – 2021. – №115 (2). – P.321-322.
113. Yin Y. et. al. Insufficient Cumulus Expansion and Poor Oocyte Retrieval in Endometriosis-Related Infertile Women / Yin Y., Mao Y., Liu A. // Reproductive Sciences. – 2021. – №28 (5). – P.1412-1420.
114. Жигалина Д.И. и др. Распространение реципрокных анеуплоидий на преимплантационном этапе развития на основе данных молекулярного кариотипирования внеклеточной ДНК бластоцисты / Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Артюхова В.Г. // Медицинская генетика. – 2016. - №15 (4). – С.39-42.
115. Bay B. et. al. Preimplantation genetic diagnosis: a national multicenter obstetric and neonatal follow-up study / Bay B., Ingerslev H.J., Lemmen J.G. // Fertility and Sterility. – 2016. – №106 (6). – P.1363-1369.
116. van Montfoort A. et. al. ESHRE PGT Consortium data collection XIX-XX: PGT analyses from 2016 to 2017 / van Montfoort A., Carvalho F., Coonen E. // Human Reproduction Open. – 2021. – №2021 (3). – P.hoab024.
117. Siermann M. et. al. A systematic review of the views of healthcare professionals on the scope of preimplantation genetic testing / Siermann M., Claesen Z., Pasquier L. // Journal of Community Genetics. – 2022. – №13 (1). – P.1-11.
118. Hu X. et. al. Next-generation sequence-based preimplantation genetic testing for monogenic disease resulting from maternal mosaicism / Hu X., He W.B., Zhang S.P. // Molecular Genetics & Genomic Medicine. – 2021. – №9 (5). – P.e1662.
119. Simpson J.L. et. al. Preimplantation diagnosis and other modern methods for prenatal diagnosis / Simpson J.L., Rechitsky S. // The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. – 2017. – №165 (Pt A). – P.124-130.
120. Goetz D. et. al. Review of Cystic Fibrosis / Goetz D., Ren C.L. // Pediatric Annals. – 2019. – №48 (4). – P.e154-e161.
121. Hwang T.C. et. al. Structural mechanisms of CFTR function and dysfunction / Hwang T.C., Yeh J.T., Zhang J. // Journal of General Physiology. – 2018. – №150 (4). – P.539-570.
122. Harper J.C. et. al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection / Harper J.C., Wilton L., Traeger-Synodinos J. // Human Reproduction Update. – 2012. – №18 (3). – P.234-47.
123. Gramegna A. et. al. From Ivacaftor to Triple Combination: A Systematic Review of Efficacy and Safety of CFTR Modulators in People

- with Cystic Fibrosis / Gramegna A., Contarini M., Aliberti S. // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – №21 (16). – P.5882.
124. Stone W.L. et. al. Fragile X Syndrome / Stone W.L., Basit H., Los E. // StatPearls Publishing. – 2022.
125. Kumari D. et. al. Molecular analysis of FMR1 aleles for fragile X syndrome diagnosis and patient stratification / Kumari D., Usdin K. // Expert Review of Molecular Diagnostics. – 2020. – №20 (4). – P.363-365.
126. Pastore L.M. et. al. Does the FMR1 gene affect IVF success / Pastore L.M., Christianson M.S., McGuinness B. // Reproductive BioMedicine Online. – 2019. – №38 (4). – P.560-569.
127. Friedman-Gohas M. et. al. Does the presence of AGG interruptions within the CGG repeat tract have a protective effect on the fertility phenotype of female FMR1 premutation carriers / Friedman-Gohas M., Kirshenbaum M., Michaeli A. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2020. – №37 (4). – P.849-854.
128. Fan L. et. al. Genetic diagnosis of β -thalassemia preimplantation using short tandem repeats in human cryopreserved blastocysts / Fan L., Qin A., Li W. // International Journal of Clinical and Experimental Pathology. – 2017. – №10 (7). – P.7586-7595.
129. Satirapod C. et. al. Clinical utility of combined preimplantation genetic testing methods in couples at risk of passing on beta thalassemia/hemoglobin E disease: A retrospective review from a single center / Satirapod C., Sukprasert M., Panthan B. // PLoS One. – 2019. – №14 (11). – P.e0225457.
130. Traeger-Synodinos J. Pre-implantation genetic diagnosis / Traeger-Synodinos J. // Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. – 2017. – №39. – P.74-88.
131. Verlinsky Y. et. al. Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching / Verlinsky Y., Rechitsky S., Schoolcraft W. // Journal of the American Medical Association. – 2001. – №285 (24). – P.3130-3.
132. ESHRE PGT-M Working Group, Carvalho F., Moutou C. et. al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders / ESHRE PGT-M Working Group, Carvalho F., Moutou C. // Human Reproduction Open. – 2020. – №2020 (3). – P.hoaa018.
133. De Rycke M. et. al. Preimplantation genetic testing with HLA matching: from counseling to birth and beyond / De Rycke M., De Vos A.,

- Belva F. // *Journal of Human Genetics*. – 2020. – №65 (5). – P.445-454.
134. Roh J. et. al. Gaucher disease - more than just a rare lipid storage disease / Roh J., Subramanian S., Weinreb N.J. // *Journal of Molecular Medicine*. – 2022. – №100 (4). – P.499-518.
135. Mondal B. et. al. Lysosome-Targeting Strategy Using Polypeptides and Chimeric Molecules / Mondal B., Dutta T., Padhy A. // *ACS Omega*. – 2021. – №7 (1). – P.5-16.
136. Kor D. et. al. Evaluation of bone health in patients with mucopolysaccharidosis / Kor D., Bulut F.D., Kılavuz S. // *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. – 2022. – №40 (3). – P.498-507.
137. Tomi D. et. al. First pregnancy and life after preimplantation genetic diagnosis by polar body analysis for mucopolysaccharidosis type I / Tomi D., Schultze-Mosgau A., Eckhold J. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2006. – №12 (2). – P.215-20.
138. Altarescu G. et. al. Prevention of lysosomal storage diseases and derivation of mutant stem cell lines by preimplantation genetic diagnosis / Altarescu G., Beerl R., Eiges R. // *Molecular Biology International*. – 2012. – №2012. – P.797342.
139. Осипова Л.А. и др. Синдром Санфилиппо / Осипова Л.А., Кузенкова Л.М., Намазова-Баранова Л.С. // *Вестник Российской академии медицинских наук*. – 2015. – №70 (4). – С.419-427.
140. Page K.M. et. al. Benefits of Newborn Screening and Hematopoietic Cell Transplant in Infantile Krabbe Disease / Page K.M., Ream M.A., Rangarajan H.G. // *Blood Advances*. – 2022. – №6 (9). – P.2947-2956.
141. Liang C. et. al. Infertility, Miscarriage, Stillbirth, and the Risk of Stroke Among Women: A Systematic Review and Meta-Analysis / Liang C., Chung H.F., Dobson A.J. // *Stroke*. – 2022. – №53 (2). – P.328-337.
142. Mitchell L.E. Maternal effect genes: Update and review of evidence for a link with birth defects / Mitchell L.E. // *Human Genetics and Genomics Advances*. – 2021. – №3 (1). – P.100067.
143. Глинкина Ж.И. и др. Профилактика рождения больного ребенка у пациентов с бесплодием и наличием робертсоновской транслокации в кариотипе / Глинкина Ж.И., Алиева К.У., Бугай Т.В. // *Акушерство и гинекология*. – 2012. – №4 (1). – С.59-60.
144. Yan J. et. al. Live Birth with or without Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy / Yan J., Qin Y., Zhao H. // *The New England Journal of Medicine*. – 2021. – №385 (22). – P.2047-2058.

145. Iews M. et. al. Does preimplantation genetic diagnosis improve reproductive outcome in couples with recurrent pregnancy loss owing to structural chromosomal rearrangement? A systematic review / Iews M., Tan J., Taskin O. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2018. – №36 (6). – P.677-685.
146. Keymolen K. et. al. Preimplantation genetic diagnosis in female and male carriers of reciprocal translocations: clinical outcome until delivery of 312 cycles / Keymolen K., Staessen C., Verpoest W. // *European Journal of Human Genetics*. – 2012. – №20 (4). – P.376-80.
147. Fischer J. et. al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses / Fischer J., Colls P., Escudero T. // *Fertility and Sterility*. – 2010. – №94 (1). – P.283-9.
148. Scriven P.N. et. al. Benefits and drawbacks of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for reciprocal translocations: lessons from a prospective cohort study / Scriven P.N., Flinter F.A., Khalaf Y. // *European Journal of Human Genetics*. – 2013. – №21 (10). – P.1035-41.
149. Idowu D. et. al. Pregnancy outcomes following 24-chromosome preimplantation genetic diagnosis in couples with balanced reciprocal or Robertsonian translocations / Idowu D., Merrion K., Wemmer N. // *Fertility and Sterility*. – 2015. – №103 (4). – P.1037-42.
150. Hirshfeld-Cytron J. et. al. Management of recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a reciprocal translocation: a systematic review / Hirshfeld-Cytron J., Sugiura-Ogasawara M., Stephenson M.D. // *Seminars in Reproductive Medicine*. – 2011. – №29 (6). – P.470-81.
151. Franssen M.T. et. al. Reproductive outcome after PGD in couples with recurrent miscarriage carrying a structural chromosome abnormality: a systematic review / Franssen M.T., Musters A.M., van der Veen F. // *Human Reproduction Update*. – 2011. – №17 (4). – P.467-75.
152. Ikuma S. et. al. Preimplantation Genetic Diagnosis and Natural Conception: A Comparison of Live Birth Rates in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Associated with Translocation / Ikuma S., Sato T., Sugiura-Ogasawara M. // *PLoS One*. – 2015. – №10 (6). – P.e0129958.
153. Pundir J. et. al. Outcome of preimplantation genetic diagnosis using FISH analysis for recurrent miscarriage in low-risk reciprocal translocation carriers / Pundir J., Magdalani L., El-Toukhy T. // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2016. – №203. – P.214-9.
154. Christodoulou C. et. al. Preimplantation genetic diagnosis for

- chromosomal rearrangements with the use of array comparative genomic hybridization at the blastocyst stage / Christodoulou C., Dheedene A., Heindryckx B. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №107 (1). – P.212-219.
155. Zhang W. et. al. Clinical application of next-generation sequencing in preimplantation genetic diagnosis cycles for Robertsonian and reciprocal translocations / Zhang W., Liu Y., Wang L. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2016. – №33 (7). – P.899-906.
156. Gianaroli L. et. al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study / Gianaroli L., Magli M.C., Pomante A. // *Fertility and Sterility*. – 2014. – №102 (6). – P.1692-9.
157. Жигалина Д.И. и др. Распространение реципрокных анеуплоидий на преимплантационном этапе развития на основе данных молекулярного кариотипирования внеклеточной ДНК бластоцисты / Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Артюхова В.Г. // *Медицинская генетика*. – 2016. – №15 (4). – P.39-42.
158. Kuliev A. et. al. Practical preimplantation genetic diagnosis. 2nd ed / Kuliev A, Verlinsky Y. // London: Springer. – 2012. – P.529.
159. Simpson J.L. et. al. Preimplantation diagnosis and other modern methods for prenatal diagnosis / Simpson J.L., Rechitsky S. // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2017. – №165 (Pt A). – P.124-130.
160. Scott K.L. et. al. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing / Scott K.L., Hong K.H., Scott R.T. Jr. // *Fertility and Sterility*. – 2013. – №100 (3). – P.608-14.
161. Capalbo A. et. al. Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging / Capalbo A., Hoffmann E.R., Cimadomo D. // *Human Reproduction Update*. – 2017. – №23 (6). – P.706-722.
162. Coco R. Reprogenetics: Preimplantational genetics diagnosis / Coco R. // *Genetics and Molecular Biology*. – 2014. – №37(1 Suppl). – P.271-84.
163. Harton G.L. et. al. Current experience concerning mosaic embryos diagnosed during preimplantation genetic screening / Harton G.L., Cinnioglu C., Fiorentino F. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №107 (5). – P.1113-1119.
164. Goossens V. et. al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for

- preimplantation genetic diagnosis / Goossens V., De Rycke M., De Vos A. // *Human Reproduction*. – 2008. – №23 (3). – P.481-92.
165. McArthur S.J. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts / McArthur S.J., Leigh D., Marshal J.T. // *Fertility and Sterility*. – 2005. – №84 (6). – P.1628-36.
166. Grifo J.A. et. al. Preembryo biopsy and analysis of blastomeres by in situ hybridization / Grifo J.A., Boyle A., Fischer E. // *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. – 1990. – №163 (6 Pt 1). – P.2013-9.
167. Grifo J.A. et. al. Pregnancy after embryo biopsy and coamplification of DNA from X and Y chromosomes / Grifo J.A., Tang Y.X., Cohen J. // *Journal of the American Medical Association*. – 1992. - №268 (6). – P.727-9.
168. Munné S. et. al. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos / Munné S., Lee A., Rosenwaks Z. // *Human Reproduction*. – 1993. – №8 (12). – P.2185-91.
169. Gleicher N. et. al. Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review / Gleicher N., Kushnir V.A., Barad D.H. // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2014. – №12. – P.22.
170. Debrock S. et. al. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial / Debrock S., Melotte C., Spiessens C. // *Fertility and Sterility*. – 2010. – №93 (2). – P.364-73.
171. Munné S. et. al. Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success / Munné S., Gianaroli L., Tur-Kaspa I. // *Fertility and Sterility*. – 2007. – №88 (4). – P.781-4.
172. Zamora S. et. al. PGS-FISH in reproductive medicine and perspective directions for improvement: a systematic review / Zamora S., Clavero A., Gonzalvo M.C. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2011. – №28 (8). – P.747-57.
173. Lu L. et. al. Recent advances in preimplantation genetic diagnosis and screening / Lu L., Lv B., Huang K. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2016. – №33 (9). – P.1129-34.
174. Turner K. et. al. Multicolor detection of every chromosome as a means of detecting mosaicism and nuclear organization in human embryonic nuclei / Turner K., Fowler K., Fonseka G. // *Panminerva Medica*. – 2016. – №58 (2). – P.175-90.

175. Handyside A.H. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies / Handyside A.H. // *Fertility and Sterility*. – 2013. – №100 (3). – P.595-602.
176. Keltz M.D. et. al. Preimplantation genetic screening (PGS) with Comparative genomic hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriages / Keltz M.D., Vega M., Sirota I. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2013. – №30 (10). – P.1333-9.
177. Fiorentino F. et. al. Introducing array comparative genomic hybridization into routine prenatal diagnosis practice: a prospective study on over 1000 consecutive clinical cases / Fiorentino F., Caiazzo F., Napolitano S. // *Prenatal Diagnosis*. – 2011. – №31 (13). – P.1270-82.
178. Yang Z. et. al. 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 / Yang Z., Liu J., Collins G.S. // *Molecular Cytogenetics*. – 2012. – №5 (1). – P.24.
179. Munné S. et. al. Mosaicism: “survival of the fittest” versus “no embryo left behind” / Munné S., Grifo J., Wells D. // *Fertility and Sterility*. – 2016. – №105 (5). – P.1146-1149.
180. Tiegs A.W. Discrepant diagnosis rate of array comparative genomic hybridization in thawed euploid blastocysts / Tiegs A.W., Hodes-Wertz B., McCulloh D.H. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2016. – №33 (7). – P.893-7.
181. Rabinowitz M. et. al. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres / Rabinowitz M., Ryan A., Gemelos G. // *Fertility and Sterility*. – 2012. – №97 (2). – P.395-401.
182. Treff N.R. et. al. Advances in Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disease and Aneuploidy / Treff N.R., Zimmerman R.S. // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. – 2017. – №18. – P.189-200.
183. Treff NR, Franasiak JM. Detection of segmental aneuploidy and mosaicism in the human preimplantation embryo: technical considerations and limitations. *Fertil Steril*. 2017 Jan;107(1):27-31.
184. Handyside A.H. et. al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes / Handyside A.H., Harton G.L., Mariani B. // *Journal of Medical Genetics*. – 2010. – №47 (10). – P.651-8.

185. Giménez C. et. al. Karyomapping allows preimplantation genetic diagnosis of a de-novo deletion undetectable using conventional PGD technology / Giménez C., Sarasa J., Arjona C. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2015. – №31 (6). – P.770-5.
186. Natesan S.A. et. al. Live birth after PGD with confirmation by a comprehensive approach (karyomapping) for simultaneous detection of monogenic and chromosomal disorders / Natesan S.A., Handyside A.H., Thornhill A.R. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2014. – №29 (5). – P.600-5.
187. Ben-Nagi J. Karyomapping: a single centre's experience from application of methodology to ongoing pregnancy and live-birth rates / Ben-Nagi J., Wells D., Doye K. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2017. – №35 (3). – P.264-271.
188. Dimitriadou E. et. al. Principles guiding embryo selection following genome-wide haplotyping of preimplantation embryos / Dimitriadou E., Melotte C., Debrock S. // *Human Reproduction*. – 2017. – №32 (3). – P.687-697.
189. Воскобоева Е.Ю. и др. Преимплантационная диагностика наследственных заболеваний / Воскобоева Е.Ю., Калашникова Е.А., Юткин Е.В. // *Медицинская генетика*. – 2013. – №9 (135). – С.15-19.
190. Treff N.R. et. al. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening / Treff N.R., Tao X., Ferry K.M. // *Fertility and Sterility*. – 2012. – №97 (4). – P.819-24.
191. Forman E.J. et. al. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial / Forman E.J., Hong K.H., Ferry K.M. // *Fertility and Sterility*. – 2013. – №100 (1). – P.100-7.
192. Scott R.T. Jr. et. al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial / Scott R.T. Jr., Upham K.M., Forman E.J. // *Fertility and Sterility*. – 2013. – №100 (3). – P.697-703.
193. Bianchi D.W. et. al. Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: what has happened since the rubber met the road / Bianchi D.W., Wilkins-Haug L. // *Clinical Chemistry*. – 2014. – №60 (1). – P.78-87.
194. Yin X. et. al. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts / Yin X., Tan K., Vajta G. // *Biology of Reproduction*. – 2013. – №88 (3). – P.69.

195. Fiorentino F. et. al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles / Fiorentino F., Bono S., Biricik A. // *Human Reproduction*. – 2014. – №29 (12). – P.2802-13.
196. Fiorentino F. et. al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos/ Fiorentino F., Biricik A., Bono S. // *Fertility and Sterility*. – 2014. – №101 (5). – P.1375-82.
197. Aleksandrova N. et. al. Comparison of the results of preimplantation genetic screening obtained by a-CGH and NGS methods from the same embryos / Aleksandrova N., Shubina E., Ekimov A. // *Gynecological Endocrinology*. – 2016. – №32 (sup2). – P.1-4.
198. Yang Z. et. al. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study / Yang Z., Lin J., Zhang J. // *BMC Medical Genomics*. – 2015. – №8. – P.30.
199. Lai H.H. et. al. Identification of mosaic and segmental aneuploidies by next-generation sequencing in preimplantation genetic screening can improve clinical outcomes compared to array-comparative genomic hybridization / Lai H.H., Chuang T.H., Wong L.K. // *Molecular Cytogenetics*. – 2017. – №10. – P.14.
200. Глинкина Ж.И. и др. Использование высокопроизводительного секвенирования (NGS) в целях профилактики хромосомной патологии в программе ВРТ / Глинкина Ж.И., Курцер М.А., Младова Е.С. // *Вестник Росздравнадзора*. – 2016. – №5. – С.40-43.
201. Friedenthal J. et. al. Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles / Friedenthal J., Maxwell S.M., Munné S. // *Fertility and Sterility*. – 2019. – №109 (4). – P.627-632.
202. Fodina V. et al. The application of PGT-A for carriers of balanced structural chromosomal rearrangements / Fodina V., Dudorova A., Alksere B. // *Gynecological Endocrinology*. – 2019. – №35 (suppl.1). – P.18–23.
203. Chow J.F.C. et. al. Evaluation of preimplantation genetic testing for chromosomal structural rearrangement by a commonly used next generation sequencing workflow / Chow J.F.C., Yeung W.S.B., Lee V.C.Y. // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2018. – №224. – P.66–73.
204. Abdala A. et. al. Day 5 vs day 6 single euploid blastocyst frozen

- embryo transfers: which variables do have an impact on the clinical pregnancy rates / Abdala A., Elkhatib I., Bayram A. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2022. – №39 (2). – P.379-388.
205. Gleicher N. et. al. How Not to Introduce Laboratory Tests to Clinical Practice: Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy / Gleicher N., Patrizio P., Orvieto R. // *Clinical Chemistry*. – 2022. – №68 (4). – P.501-503.
206. Lee E. et. al. A cost-effectiveness analysis of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) for up to three complete assisted reproductive technology cycles in women of advanced maternal age / Lee E., Costello M.F., Botha W.C. // *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. – 2019. – №59 (4). – P.573-579.
207. Козаченко И.Ф. и др. Роль малоинвазивных внутриматочных вмешательств в повышении результативности программ ЭКО / Козаченко И.Ф., Аракелян А.С., Смольникова В.Ю. // *Акушерство и гинекология*. – 2020. – №9. – С.97-104.
208. Park H.J. et. al. Chronic endometritis and infertility / Park H.J., Kim Y.S., Yoon T.K. // *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. – 2016. – №43 (4). – P.185-192.
209. Sciorio R. et. al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges / Sciorio R., Tramontano L., Catt J. // *Gynecological Endocrinology*. – 2020. – №36 (1). – P.6-11.
210. Franasiak J.M. et. al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoblast biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening / Franasiak J.M., Forman E.J., Hong K.H. // *Fertility and Sterility*. – 2014. – №101 (3). – P.656-663.
211. Смольникова В.Ю. и др. Активные формы кислорода и компоненты системы антиоксидантной защиты как маркеры прогнозирования качества эмбрионов у супружеских пар с различными типами бесплодия / Смольникова В.Ю., Агаджанян Д.С., Красный А.М. // *Акушерство и Гинекология*. – 2020. – №11. – С.55-60.
212. Kasman AM. et. al. Relationship between male age, semen parameters and assisted reproductive technology outcomes / Kasman A.M., Li S., Zhao Q. // *Andrology*. – 2021. – №9 (1). – P.245-252.
213. Dviri M. et. al. Is there a correlation between paternal age and aneuploidy rate? An analysis of 3,118 embryos derived from young egg donors / Dviri M., Madjunkova S., Koziarz A. // *Fertility and Sterility*. –

2020. – №114 (2). – P.293-300.
214. Hanson B.M. et. al. Impact of paternal age on embryology and pregnancy outcomes in the setting of a euploid single-embryo transfer with ejaculated sperm: retrospective cohort study / Hanson B.M., Kim J.G., Osman E.K. // *F&S Reports*. – 2020. – №1 (2). – P.99-105.
215. Morris G. et. al. Paternal age over 50 years decreases assisted reproductive technology (ART) success: A single UK center retrospective analysis / Morris G., Mavrelou D., Oda R. // *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. – 2021. – №100 (10). – P.1858-1867.
216. Mazzilli R. et. al. Effect of the male factor on the clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection combined with preimplantation aneuploidy testing: observational longitudinal cohort study of 1,219 consecutive cycles / Mazzilli R., Cimadomo D., Vaiarelli A. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №108 (6). – P.961-972.
217. Bartolacci A. et. al. Abnormal sperm concentration and motility as well as advanced paternal age compromise early embryonic development but not pregnancy outcomes: a retrospective study of 1266 ICSI cycles / Bartolacci A., Pagliardini L., Makieva S. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2018. – №35 (10). – P.1897-1903.
218. Alvarez Sedó C. et. al. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects / Alvarez Sedó C., Bilinski M., Lorenzi D. // *JBRA Assisted Reproduction*. – 2017. – №21 (4). – P.343-350.
219. Sacha C.R. et. al. The impact of male factor infertility on early and late morphokinetic parameters: a retrospective analysis of 4126 time-lapse monitored embryos / Sacha C.R., Dimitriadis I., Christou G. // *Human Reproduction*. – 2020. – №35 (1). – P.24-31.
220. Tarozzi N. et. al. Male factor infertility impacts the rate of mosaic blastocysts in cycles of preimplantation genetic testing for aneuploidy / Tarozzi N., Nadalini M., Lagala C. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2019. – №36 (10). – P.2047-2055.
221. Liñán A. et. al. Clinical reassessment of human embryo ploidy status between cleavage and blastocyst stage by Next Generation Sequencing / Liñán A., Lawrenz B., El Khatib I. // *PLoS One*. – 2018. – №13 (8). – P.e0201652.
222. Franasiak J.M. et. al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening / Franasiak J.M., Forman E.J., Hong K.H. // *Fertility and Sterility*. – 2014. – №101 (3). – P.656-663.

223. Kong A. et. al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk / Kong A., Frigge M.L., Masson G. // *Nature*. – 2012. – №488 (7412). – P.471-5.
224. Carrasquillo R.J. et. al. Advanced paternal age does not affect embryo aneuploidy following blastocyst biopsy in egg donor cycles / Carrasquillo R.J., Kohn T.P., Cinnioglu C. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2019. – №36 (10). – P.2039-2045.
225. Coates A. et. al. Use of suboptimal sperm increases the risk of aneuploidy of the sex chromosomes in preimplantation blastocyst embryos / Coates A., Hesla J.S., Hurliman A. // *Fertility and Sterility*. – 2015. – №104 (4). – P.866-872.
226. Kahraman S. et. al. High rates of aneuploidy, mosaicism and abnormal morphokinetic development in cases with low sperm concentration / Kahraman S., Sahin Y., Yelke H. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2020. – №37 (3). – P.629-640.
227. Xu R. et. al. Comparison of preimplantation genetic testing for aneuploidy versus intracytoplasmic sperm injection in severe male infertility / Xu R., Ding Y., Wang Y. // *Andrologia*. – 2021. – №53 (6). – P.e14065.
228. Franasiak J.M. et. al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15 169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening / Franasiak J.M., Forman E.J., Hong K.H. // *Fertility and Sterility*. – 2014. - №101. – P.656–663.
229. Giudice L.C. et. al. Endometriosis / Giudice L.C., Kao L.C. // *Lancet*. – 2004. – №364. – P.1789–99.
230. Mansour G. et. al. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility / Mansour G., Sharma R.K., Agarwal A., // *Fertility and Sterility*. – 2010. – №94 (5). – P.1894-9.
231. Barcelos I.D. et. al. Comparative analysis of the spindle and chromosome configurations of in vitro-matured oocytes from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study / Barcelos I.D., Vieira R.C., Ferreira E.M. // *Fertility and Sterility*. – 2009. – №92 (5). – P.1749-1752
232. Juneau C. et. al. Patients with endometriosis have aneuploidy rates equivalent to their age-matched peers in the in vitro fertilization population / Juneau C., Kraus E., Werner M. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №108 (2). – P.284-288.

233. Vaiarelli A. et. al. Endometriosis shows no impact on the euploid blastocyst rate per cohort of inseminated metaphase-II oocytes: A case-control study / Vaiarelli A., Venturella R., Cimadomo D. // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2021. – №256. – P.205-210.
234. Rossi A.C. et. al. The effects of surgery for endometriosis on pregnancy outcomes following in vitro fertilization and embryo transfer: a systematic review and meta-analysis / Rossi A.C., Prefumo F. // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. – 2016. – №294. – P.647–55.
235. Bishop L.A. et. al. Endometriosis does not impact live-birth rates in frozen embryo transfers of euploid blastocysts / Bishop L.A., Gunn J., Jahandideh S. // *Fertility and Sterility*. – 2021. – №115 (2). – P.416-422.
236. Maggiore U. R. L. et. al. Treatment of endometrioma for improving fertility / Maggiore L.R.U., Gupta J.K., Ferrero S. // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2017. – №209. – P.81-85.
237. Garcia-Velasco J.A. et. al. Is endometrial receptivity transcriptomics affected in women with endometriosis? A pilot study / Garcia-Velasco J.A., Fassbender A., Ruiz-Alonso M. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2015. – №31 (5). – P.647-54.
238. Díaz I. et. al. Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study / Díaz I., Navarro J., Blasco L. // *Fertility and Sterility*. – 2000. – №74 (1). – P.31-4.
239. Shebl O. Oocyte competence in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection patients suffering from endometriosis and its possible association with subsequent treatment outcome: a matched case-control study / Shebl O., Sifferlinger I., Habelsberger A. // *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. – 2017. – №96 (6). – P.736-744.
240. Stilley J.A. et. al. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility / Stilley J.A., Birt J.A., Sharpe-Timms K.L. // *Cell and Tissue Research*. – 2012. – №349 (3). – P.849-62.
241. Kasapoglu I. et. al. Detrimental effects of endometriosis on oocyte morphology in intracytoplasmic sperm injection cycles: a retrospective cohort study / Kasapoglu I., Kuspinar G., Saribal S. // *Gynecological Endocrinology*. – 2018. – №34 (3). – P.206-211.
242. Notarstefano V. et. al. Vibrational characterization of granulosa cells from patients affected by unilateral ovarian endometriosis: New insights from infrared and Raman microspectroscopy / Notarstefano V., Gioacchini G., Byrne H.J. // *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular*

- Spectroscopy. – 2019. – №212. – P.206-214.
243. Senapati S. et. al. Impact of endometriosis on in vitro fertilization outcomes: an evaluation of the Society for Assisted Reproductive Technologies Database / Senapati S., Sammel M.D., Morse C. // *Fertility and Sterility*. – 2016. – №106 (1). – P.164-171.
244. Dviri M. et. al. Is there a correlation between paternal age and aneuploidy rate? An analysis of 3,118 embryos derived from young egg donors / Dviri M., Madjunkova S., Koziarz A. // *Fertility and Sterility*. – 2020. – №114 (2). – P.293-300.
245. Shafrir A.L. et. al. Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review / Shafrir A.L., Farland L.V., Shah D.K. // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. – 2018. – №51. – P.1–15.
246. Fodina V. et al. The application of PGT-A for carriers of balanced structural chromosomal rearrangements / Fodina V., Dudorova A., Alksere B. // *Gynecological Endocrinology*. – 2019. – №35 (suppl.1). – P.18–23.
247. Chow J.F.C. et. al. Evaluation of preimplantation genetic testing for chromosomal structural rearrangement by a commonly used next generation sequencing workflow / Chow J.F.C., Yeung W.S.B., Lee V.C.Y. // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2018. – №224. – P.66–73.
248. Brunet B.C.F.K. et al. Preimplantation genetic testing for complex chromosomal rearrangement carriers by next-generation sequencing / Brunet B.C.F.K., Shen J., Cai L. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2018. – №37 (3). – P.375–82.
249. Taylor T.H. et. al. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans / Taylor T.H., Gitlin S.A., Patrick J.L. // *Human Reproduction Update*. – 2014. – №20 (4). – P.571-81.
250. Li X. et. al. The mechanisms and clinical application of mosaicism in preimplantation embryos / Li X., Hao Y., Elshewy N. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2020. – №37 (3). – P.497-508.
251. Sachdev N.M. et. al. The reproducibility of trophectoderm biopsies in euploid, aneuploid, and mosaic embryos using independently verified next-generation sequencing (NGS): a pilot study / Sachdev N.M., McCulloh D.H., Kramer Y. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2020. – №37 (3). – P.559-571.
252. McCoy R.C. Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When

- Chromosomal Abnormalities Are the Norm / McCoy R.C. // Trends in Genetics. – 2017. – №33 (7). – P.448–463.
253. Vera-Rodriguez M. et. al. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos / Vera-Rodriguez M., Rubio C. // Fertility and Sterility. – 2017. – №107 (5). – P.1107-1112.
254. Qasemi M. et. al. Cell-free DNA discoveries in human reproductive medicine: providing a new tool for biomarker and genetic assays in ART / Qasemi M., Mahdian R., Amidi F. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2021. – №38 (2). – P.277-288.
255. Palini S. Genomic DNA in human blastocoele fluid / Palini S., Galuzzi L., De Stefani S. // Reproductive BioMedicine Online. – 2013. – №26 (6). – P.603-10.
256. Shitara A. et. al. Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophoctoderm biopsy / Shitara A., Takahashi K., Goto M. // PLoS ONE. – 2021. – №16 (2). – P.e0246438.
257. Шмаков Р.Г. и др. Ведение физиологической беременности: клинические рекомендации / Шмаков Р.Г., Баев О.Р., Кан Н.Е. // Акушерство и гинекология. – 2016. – №12 (Протоколы). – С.20–39.
258. Maxwell S.M. et. al. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing / Maxwell S.M., Colls P., Hodes-Wertz B. // Fertility and Sterility. – 2016. – №106. – P.1414–1419.
259. Fragouli E. et. al. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential / Fragouli E., Spath K., Alfarawati S. // PLOS Genetics. – 2015. – №11. – P.e1005241.
260. Diez-Juan A. et. al. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better / Diez-Juan A., Rubio C., Marin C. // Fertility and Sterility. – 2015. – №104 (3). – P.534-41.
261. Treff N.R. et. al. Levels of trophoctoderm mitochondrial DNA do not predict the reproductive potential of sibling embryos / Treff N.R., Zhan Y., Tao X. // Human Reproduction. – 2017. – №32. – P.954–962.
262. Victor A. et. al. Births from embryos with highly elevated levels of mitochondrial DNA / Victor A., Griffin D., Dardner K.G. // Reproductive BioMedicine Online. – 2019. – №39. – P.403–412.
263. Ravichandran K. et. al. Mitochondrial DNA quantification as a tool

- for embryo viability assessment: Retrospective analysis of data from single euploid blastocyst transfers / Ravichandran K., McCaffrey C., Grifo J. // *Human Reproduction*. – 2017. – №32. – P.1282–1292.
264. Fragouli E. et. al. Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: A blinded prospective non-selection study / Fragouli E., McCaffrey C., Ravichandran K. // *Human Reproduction*. – 2017. – №32. – P.2340–2347.
265. Yi-Xuan Lee et. al. Adjusted mitochondrial DNA quantification in human embryos may not be applicable as a biomarker of implantation potential / Yi-Xuan Lee, Chi-Huang Chen, Shyr-Yeu Lin // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2019. – №36 (9). – P.1855-1865.
266. Liedo B. et. al. Comprehensive mitochondrial DNA analysis and IVF outcome / Liedo B., Ortiz J.A., Morales R. // *Human Reproduction Open*. – 2018. – №2018 (4). – P.hoy023.
267. Victor A. et. al. Births from embryos with highly elevated levels of mitochondrial DNA / Victor A., Griffin D., Dardner K.G. // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2019. – №39. – P.403–412.
268. Victor A. et. al. Accurate quantitation of mitochondrial DNA reveals uniform levels in human blastocysts irrespective of ploidy, age, or implantation potential / Victor A., Brake A.J., Tyndal J.C. // *Fertility and Sterility*. – 2017. – №107. – P.34–42.
269. Richard T.Scott III et. al. Mitochondrial DNA content is not predictive of reproductive competence in euploid blastocysts / Richard T.Scott III, Li Sun, Yiping Zhan // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2020. – №41 (2). – P.183-190.
270. Ciesielski G.L. et. al. Animal Mitochondrial DNA Replication / Ciesielski GL, Oliveira MT, Kaguni LS. // *Enzymes*. – 2016. – №39. – P.255-292.
271. Frank Shao-Ying Wu et. al. Suboptimal trophectoderm mitochondrial DNA level is associated with delayed blastocyst development / Frank Shao-Ying Wu, Shao-Ping Weng, Meng-Shun Shen // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2021. – №38. – P.587–594.
272. Klimczak A.M. et. al. Embryonal mitochondrial DNA: Relationship to embryo quality and transfer outcomes / Klimczak A.M., Pacheco L.E., Lewis K.E. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2018. – №35. – P.871–877.

273. Behzad F. et. al. Expression of 2 isoforms of CD44 in human endometrium / Behzad F., Seif M.W., Campbell S. // *Biology of Reproduction*. – 1994. – №51. – P.739–747.
274. Berneau S.C. et. al. Investigating the role of CD44 and hyaluronate in embryo-epithelial interaction using an in vitro model / Berneau S.C., Ruane P.T., Brison D.R. // *Molecular Human Reproduction*. – 2019. – №25. – P.265–273.
275. Adeniyi T. et. al. Clinical efficacy of hyaluronate-containing embryo transfer medium in IVF/ICSI treatment cycles: a cohort study / Adeniyi T., Horne G., Ruane P. T. // *Human Reproduction Open*. – 2021. – №2021 (1). – P.hoab004
276. Fouladi-Nashta A.A. et. al. Regulation and roles of the hyaluronan system in mammalian reproduction / Fouladi-Nashta A.A., Raheem K.A., Marei W.F. // *Reproduction*. – 2017. – №153. – P.R43–R58.
277. Nakagawa K. et al. Hyaluronan-enriched transfer medium improves outcome in patients with multiple embryo transfer failures / Nakagawa K., Takahashi C., Nishi Y. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2012. – №29 (7). – P.679-85.
278. Bontekoe S. et. al. Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies / Bontekoe S., Heineman M., Johnson N. // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2014. – №2.
279. Boynukalin F.K. et. al. Which factors affect the likelihood of miscarriage after single euploid blastocyst transfer / Boynukalin F.K., Abalı R., Gultomruk M, // *Reprod Biomed Online*. – 2021. – №42 (6). – P.1187-1195.
280. Chappell N.R. et. al. Embryos from polycystic ovary syndrome patients with hyperandrogenemia reach morula stage faster than controls / Chappell N.R., Barsky M., Shah J. // *F&S Reports*. – 2020. – №1 (2). – P.125-132.
281. Pearson H. et. al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy confers greater benefit to young patients with polycystic ovarian syndrome / Pearson H., M.D. Abittan B., M.D. Goldman R.H. // *Fertility and Sterility*. – 2020. – №114 (3). – P.E422-E423.
282. Palomba S. et. al. Endometrial function in women with polycystic ovary syndrome: a comprehensive review / Palomba S., Piltonen T.T., Giudice L.C. // *Human Reproduction Update*. – 2021. – №27 (3). – P.584-618.