

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

На правах рукописи

**Лапина
Вера Сергеевна**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОГРАММ
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ООЦИТОВ ДОНОРА**

3.1.4. Акушерство и гинекология

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

**Научный руководитель:
доктор медицинских наук
А.А. Гависова**

Москва - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	4
ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ	7
ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ	7
НАУЧНАЯ НОВИЗНА.....	8
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.....	9
ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ	9
ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА	10
СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПАСПОРТУ НАУЧНОЙ СПЕЦИАЛЬНОСТИ	10
АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ	11
ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИКУ	11
СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.....	11
ГЛАВА 1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕПРОДУКТИВНОГО МАТЕРИАЛА ДОНОРОВ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ – МЕДИЦИНСКИЕ И СОЦИАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	12
1.1. Потребность в использовании ооцитов донора и нормативные документы, регламентирующие проведение программ донор-реципиент	12
1.2. Методики проведения программ ЭКО с использованием ооцитов донора.....	17
1.3. Процедура витрификация как новый этап развития криоконсервации ооцитов и эмбрионов.....	18
1.4. Овариальная стимуляция яичников в лютеиновую фазу менструального цикла и использование модифицированной методики у доноров ооцитов	22
1.5. Совершенствование УЗ-визуализации яичников при проведении мониторинга индуцированного цикла в программах ЭКО	27
1.6. Генетическое тестирование доноров ооцитов и полученных эмбрионов в клинической практике	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1 МАТЕРИАЛ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.2.1. УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА	46
2.2.2. ПРОЦЕСС ВИТРИФИКАЦИИ ООЦИТОВ	47
2.2.3. ПРОГРАММА ЭКО	47

2.2.4. ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЙ ЭТАП.....	49
2.2.5. ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НА АНЕУПЛОИДИИ	51
2.2.6 АНАЛИЗ СТАТИСТИЧЕСКИХ ДАННЫХ	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	53
3.1. АНАЛИЗ ПОТРЕБНОСТИ В ИСПОЛЬЗОВАНИИ ООЦИТОВ ДОНОРА ЗА ПЕРИОД 2019-2022ГГ.....	53
3.2. КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ ДОНОРОВ ООЦИТОВ	56
3.3 КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ РЕЦИПИЕНТОВ ООЦИТОВ	57
3.4. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОГРАММ ЭКО ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ДОНОРОВ ООЦИТОВ В ФОЛЛИКУЛЯРНУЮ И ЛЮТЕИНОВУЮ ФАЗЫ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА	61
3.5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РАСТУЩИХ ФОЛЛИКУЛОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ 2D И 3D - ЭХОГРАФИИ.....	66
3.6. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОГО ЭТАПА ПРОГРАММ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЯИЧНИКОВ ДОНОРОВ В РАЗНЫЕ ФАЗЫ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА	69
3.7. ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛОИДНОСТИ ЭМБРИОНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ В ПРОГРАММАХ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) У ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП.....	70
3.8 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИСХОДОВ ПРОГРАММ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЯИЧНИКОВ ДОНОРОВ В РАЗНЫЕ ФАЗЫ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА	71
3.9. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) В ЦИКЛАХ ДОНОР-РЕЦИПИЕНТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАТИВНЫХ И ВИТРИФИЦИРОВАННЫХ ООЦИТОВ.....	72
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	75
ВЫВОДЫ.....	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	91

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Использование гамет донора является не только медицинской проблемой, решаемой в рамках вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), но и имеет значимые морально – этические и юридические аспекты. Не случайно в ряде стран мира донорские программы не разрешены или значительно ограничены.

В Бельгии, Франции, Великобритании и Греции возможно проведение только некоммерческих программ: в этих странах для доноров либо вообще не предусматривается вознаграждение, либо его размер можно рассматривать только в качестве компенсации текущих расходов во время прохождения процедуры донации. Полный запрет на использование ооцитов донора Австрии, Швейцарии и Норвегии. Согласно законодательным нормам в Норвегии и Швейцарии данная репродуктивная технология считается уголовным преступлением. В Италии запрет донации ооцитов отменили недавно, лишь в 2014 году [1][2].

В Российской Федерации существующие законодательные акты следует признать наиболее гуманными, позволяющими использовать ооциты донора по медицинским показаниям, представленным в клинических рекомендациях «Женское бесплодие» от 2021 года и приказе Минздрава РФ № 803н от 31.07.2020г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» (с 01.01.2021).

Наряду с Россией минимум ограничений правового регулирования донорских программ либо их отсутствие также существует в США, Австралии, Нидерландах, Швеции, Беларуси, Украине, Казахстане, Грузии, Испании, Дании и ряде других стран.

Вместе с тем, откладывание деторождения на поздний репродуктивный возраст, особенно в повторных браках, делает проблему донорства ооцитов чрезвычайно актуальной, притом актуальность проблемы возрастает.

Использование ооцитов донора имеет ряд нерешенных медицинских проблем. Достаточно сказать, что первые программы проводились с так называемой синхронизацией менструальных циклов донора и реципиента, что требовало длительной подготовки, назначения для синхронизации гормональной терапии. Полученные у донора нативные ооциты оплодотворяли спермой мужа реципиентки и переносили в полость матки реципиентки [3]. Дальнейшее развитие репродуктивных технологий привело к успешной криоконсервации и размораживанию эмбрионов. Частота беременности при переносе размороженного эмбриона соответствует таковой при переносе нативного эмбриона в лечебном цикле, а по мнению многих авторов даже превышает таковую [4]. Исходя из этого, стали использовать методики оплодотворения ооцитов донора спермой мужа реципиентки, криоконсервации полученных эмбрионов и перенос реципиентке размороженного эмбриона при соответствующей подготовке матки [4].

Разработка технологии витрификации ооцитов с последующим их размораживанием и оплодотворением явилось значимой вехой в развитии ВРТ и программах использования ооцитов донора [5]. Появилась возможность создать банк донорских ооцитов и использовать криоконсервированные яйцеклетки, подбирая фенотипические данные в соответствии с запросами реципиентов. Вместе с тем частота наступления беременности при размораживании криоконсервированных ооцитов долгое время оставалась низкой. Последние работы демонстрируют повышение процента выживаемости криоконсервированных ооцитов после их размораживания и достаточно высокую частоту беременностей [6]. Однако этот вопрос является не до конца решенным, в литературе достаточно противоречивых данных, сравнивающих частоту наступления беременности, особенности ее течения, состояния здоровья рожденных детей при использовании

криоконсервированных эмбрионов по сравнению с нативными [4]. Особенное значение это имеет для реципиентов, использующих ооциты донора.

Донор ооцитов подвергается процедуре экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), включающей овариальную стимуляцию для получения большого количества ооцитов, желательного не менее 10 в день трансвагинальной пункции (ТВП). Известно, что эти манипуляции могут иметь осложнения, в этой связи вопросы модификации протоколов стимуляции донора ооцитов представляются важной и не до конца решенной задачей.

Более того, не решен вопрос о количестве допустимых попыток овариальной стимуляции донора ооцитов, что обуславливает необходимость разработки новых протоколов, когда у донора ооцитов можно получить достаточное количество яйцеклеток, не подвергая в последующем женщину многочисленным повторным циклам стимуляции яичников. Модифицированные протоколы в настоящее время широко применяются в клинической практике, в основном, при криоконсервации репродуктивного материала у онкологических больных [7][8][9]. Наблюдаются лишь единичные сообщения о возможности использования таких протоколов для доноров ооцитов [10]. Есть необходимость в усовершенствовании методов мониторинга с целью лучшей визуализации растущих фолликулов и получения достаточного количества ооцитов. Вопрос о необходимости проведения преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А) эмбрионов, полученных при оплодотворении ооцитов донора спермой партнера реципиента, также не является до конца решенным. С одной стороны, медицинских показаний для проведения ПГТ-А нет, ведь используются ооциты молодых здоровых женщин, с другой, оплодотворение зачастую проводится спермой уже немолодого партнера пациентки. Кроме того, есть социальный запрос со стороны реципиентов, желающих родить здорового ребенка.

Таким образом, продолжается поиск наиболее информативных маркеров (гормональных и ультразвуковых) овариального резерва для последующего выбора протокола стимуляции при проведении программ ЭКО в разные фазы менструального цикла, нет данных о плоидности эмбрионов, развившихся из ооцитов, полученных при проведении овариальной стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла, а также влияния стимуляции яичников во вторую фазу менструального цикла на эмбриологический этап в циклах донор-реципиент. Также важным и нерешенным вопросом в протоколах ЭКО с применением донорского генетического материала является рациональность выбора между нативными и витрифицированными ооцитами [11]. При использовании нативного биологического материала нет риска потери ооцитов при размораживании. Также применение данного материала позволяет получить большее количество эмбрионов с возможностью проведения в последующем ПГТ-А и криоконсервации [12]. Значительным преимуществом при использовании витрифицированных яйцеклеток, находящихся в криохранилище является оптимизация времени на подбор донора.

Все вышеизложенное определило актуальность настоящего исследования.

Цель исследования

Повышение эффективности программ ЭКО с применением донорского генетического материала путем проведения овариальной стимуляции в разные фазы менструального цикла и оценки эффективности лечения при применении витрифицированных и нативных ооцитов.

Задачи исследования

1. Определить частоту использования донорского биологического материала в программах вспомогательных репродуктивных технологий по данным 1-го гинекологического отделения НМИЦ АГП им В.И. Кулакова.

2. Исследовать параметры фолликулогенеза, оогенеза у доноров и раннего эмбриогенеза у реципиентов в зависимости от фазы проведения овариальной стимуляции.

3. Проанализировать динамику концентраций половых гормонов в сыворотке крови при проведении овариальной стимуляции в фолликулярной и лютеиновой фазах менструального цикла у доноров ооцитов.

4. Провести сравнительный анализ использования 2D-эхографии и 3D-объемного сканирования в программах экстракорпорального оплодотворения у доноров ооцитов.

5. Произвести анализ ploидности полученных эмбрионов в зависимости от фазы получения ооцитов при проведении стимуляции яичников в фолликулярной или лютеиновой фазе менструального цикла у донора ооцитов.

6. Осуществить сравнительную оценку частоты наступления беременности у реципиентов в зависимости от фазы получения ооцитов при проведении овариальной стимуляции в фолликулярной или лютеиновой фазе менструального цикла у донора ооцитов с последующим переносом эмбрионов реципиентам в «криоциклах».

7. Провести сравнительную оценку программ донор – реципиент при использовании нативных и витрифицированных ооцитов.

Научная новизна

В данной работе представлена клиничко-лабораторная характеристика доноров ооцитов, прошедших овариальную стимуляцию в разные фазы менструального цикла. Изучен гормональный профиль и ультразвуковые аспекты овариальной стимуляции, проведено сравнение информативности 2D и 3D-эхографии на разных этапах стимуляции. Впервые проведена оценка ploидности эмбрионов, культивированных из ооцитов, полученных в разные фазы менструального цикла у доноров ооцитов. Проанализирована

эффективность использования витрифицированных и нативных ооцитов при проведении овариальной стимуляции дважды у одного и того же донора.

Практическая значимость

Доказана возможность старта овариальной стимуляции вне зависимости от фазы менструального цикла при необходимости отложенного старта программы с целью синхронизации с реципиентами. Определены условия и период для начала овариальной стимуляции в программе ЭКО в разные фазы менструального цикла. Определены оптимальные протоколы стимуляции, схемы профилактики преждевременного пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) для стимуляции в различные фазы менструального цикла. Определены роль и место 3D-эхографии в протоколе ЭКО в различные фазы менструального цикла. Доказано увеличение эффективности программы донор-реципиент при использовании нативных ооцитов.

Положения, выносимые на защиту

1. Увеличение доли циклов ЭКО с использованием ооцитов донора в структуре программ ВРТ ассоциировано с ростом количества пациенток старшего репродуктивного возраста, вследствие отложенного материнства, а также молодых женщин с оперативными вмешательствами на яичниках в анамнезе и синдромом преждевременной недостаточности яичников.

2. Высокие концентрации прогестерона в сыворотке крови, сопровождающие овариальную стимуляцию в лютеиновой фазе менструального цикла, не оказывают негативного влияния на параметры оогенеза у доноров, а также раннего эмбриогенеза и плоидности бластоцист у реципиентов, что подтверждено одинаковой частотой наступления клинической беременности, прогрессирующей беременности и частотой живорождения.

3. В условиях мультифолликулярного роста, использование 3D-объемной эхографии обладает более высокой диагностической точностью и объективностью при проведении фолликулометрии, что позволяет получить большее количество зрелых ооцитов.

4. Наибольшая эффективность программ донор-реципиент имеет место при оплодотворении нативных ооцитов донора спермой партнера реципиента и витрификацией полученных эмбрионов, с последующим переносом эмбриона в криоцикле.

Личный вклад автора

Автором данной работы была проведена систематизация литературы согласно теме диссертации, произведен сбор и анализ клиничко-анамнестических и лабораторных данных 152 пациентов, которые включены в исследование. Автором лично осуществлялось приглашение женщин для проведения программы ВРТ в качестве доноров ооцитов, с последующим их обследованием, оценкой потенциала фертильности и проведением овариальной стимуляции. Также важным этапом работы стало консультирование и сбор анамнеза у супружеских пар, нуждающихся в донорском генетическом материале с последующим подбором фенотипических данных и проведением подготовки эндометрия для переноса эмбриона в полость матки. Лично автором произведен анализ полученных данных с обработкой и интерпретацией для подготовки публикаций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4 – акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3, 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

Апробация работы

Работа обсуждена на межклинической конференции сотрудников 1-го гинекологического отделения ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 26 августа 2022 г. и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 19 декабря 2022 г.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практическую работу 1-го гинекологического отделения ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 3 научных труда, из которых 3 статьи – в рецензируемых научных журналах.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа изложена на 99 страницах, содержит 13 рисунков, 14 таблиц. Список литературы содержит 78 работ, в том числе 3 работы отечественных и 75 работ зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕПРОДУКТИВНОГО МАТЕРИАЛА ДОНОРОВ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ – МЕДИЦИНСКИЕ И СОЦИАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Потребность в использовании ооцитов донора и нормативные документы, регламентирующие проведение программ донор-реципиент

Социальные тенденции современного общества, заключающиеся в откладывании деторождения на поздний репродуктивный период, привели к тому, что для проведения программ ЭКО обращаются пациентки в старшем возрасте, после 35 лет, часто значительно старше 40 лет. К сожалению, эта тенденция нарастает, а современная демографическая ситуация, когда в активный репродуктивный период вступила малочисленная группа людей, рожденных в 90-е годы, способствует снижению репродуктивного потенциала граждан Российской Федерации. В этой связи по поводу бесплодия, вероятнее всего, всё чаще будут обращаться пациенты старшей возрастной группы. Уже сейчас потребность в проведении программ ВРТ с использованием донорских ооцитов неуклонно растёт. Данная тенденция обусловлена не только увеличением числа женщин старшего репродуктивного возраста, но и пациенток после тотального удаления яичника (яичников) или субтотальной их резекции, женщин, получавших лучевую или химиотерапию в связи с онкологическими заболеваниями, а также пациенток с преждевременной недостаточностью яичников (ПНЯ) или синдромом резистентных яичников. Следовательно, в использовании ооцитов донора прежде всего нуждаются пациентки старшего возраста из-за физиологического снижения или утраты функции яичников; доля молодых женщин с ятрогенным поражением яичников или генетическими проблемами тоже увеличивается.

ЭКО с использованием ооцитов донора относится к методам вспомогательной репродукции и применяется для лечения бесплодия в тех случаях, когда у женщины невозможно получить собственные ооциты или

полученные ооциты являются некачественными, неспособными к оплодотворению и развитию беременности.

Нормативными документами, регламентирующими возможность использования репродуктивного материала доноров, являются:

1. Конституция Российской Федерации «Об охране здоровья граждан РФ», ред. от 20.12.1999, ст.35;

2. Федеральный закон от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ (ред. от 27.12.2018) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (с изм. и доп., вступ. в силу с 31.01.2019), ст.55;

3. Приказ Минздрава РФ № 803н от 31.07. 2020г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» (с 01.01.2021);

4. Клинические рекомендации «Женское бесплодие» от 2021 года.

Согласно законодательным актам, в России донорами ооцитов имеют право быть женщины в возрасте от 18 до 35 лет, физически и психически здоровые, прошедшие медико-генетическое обследование. В нашей стране юридически возможно как анонимное, так и не анонимное донорство ооцитов, при этом донорство является возмездным или безвозмездным.

Донация ооцитов может быть проведена лишь при условии полной информированности супружеской пары – пациентки-реципиента и ее супруга – о методе лечения бесплодия, а также информированности пациентки-донора об использовании ее ооцитов. Обязательным является обоюдное добровольное согласие всех участвующих в программе и оформление соответствующих нормативных документов. Финансовые вопросы обсуждаются и регламентируются либо лично пациентами, либо при участии специально аккредитованных юридических агентств.

Показания для проведения ЭКО с ооцитами донора можно разделить на абсолютные и относительные[13]:

Абсолютные показания:

1. Дисгенезия гонад: чистая форма (кариотип 46, XX); смешанная форма (кариотип 46, XY); синдром Шерешевского–Тернера (кариотип 45, X0) Больные характеризуются аменореей, характерными фенотипическими особенностями, высокими уровнями гонадотропинов (лютеинизирующий гормон (ЛГ) и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) больше 30–40 МЕ/л), низкими уровнями эстрадиола (E2) (меньше 100 нмоль/л). При наличии в кариотипе Y хромосомы необходимо предварительное удаление гонад[13];

2. Синдром преждевременного истощения или синдром резистентных яичников. Кариотип 46, XX, телосложение женское, аменорея вторичная, гормональные параметры такие же, как и при дисгенезии гонад;

3. Оперативные вмешательства, проведение лучевой или химиотерапии;

4. Естественная менопауза.

Относительные показания [13]:

1. Резкое снижение овариального резерва, когда в предыдущих циклах стимуляции функции яичников оциты не получены или получены некачественные, неспособные к оплодотворению яйцеклетки. Ситуации характерны для женщин периода пременопаузы или же после резекции яичников;

2. Возможность передачи потомству по женской линии генетических заболеваний; есть указания на рождение детей с генетическими заболеваниями; риск передачи потомству подтвержден при генетическом обследовании [13].

В нашей стране ограничений по возрасту для достижения беременности с использованием донорского генетического материала у женщин-реципиентов нет, тогда как в других странах они существуют [1][2]. Предлагаются лишь условия для женщины-реципиента.

Условия для проведения программы донации ооцитов [13]:

1. Отсутствие у женщины-реципиента психических, соматических заболеваний в стадии декомпенсации, онкологических заболеваний, когда

беременность может ухудшить здоровье женщины, осложнять течение заболеваний или угрожать ее жизни;

2. Отсутствие у пациентки-реципиента патологии матки, являющиеся противопоказаниями для вынашивания беременности;

3. Наличие фертильной спермы мужа или же полноценных сперматозоидов в эякуляте, способных оплодотворить яйцеклетку методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ);

4. Наличие донора ооцитов.

Обследование донора ооцитов [13]

Донором ооцитов может быть женщина активного репродуктивного возраста (19–35 лет), соматически и гинекологически здоровая, не имеющая наследственных заболеваний, вредных привычек и давшая письменное добровольное информированное согласие на использование своих ооцитов.

При подборе донора ооцитов [13] учитываются пожелания пациентки-реципиента в отношении фенотипических и этнических характеристик женщины-донора ооцитов (национальность, рост, цвет волос и глаз) [13].

Для предотвращения резус-конфликта плода женщина-донор ооцитов должна быть сопоставлена по резус-фактору с реципиентом.

Естественно, что при обследовании женщины-донора врач учитывает состояние овариального резерва, так как планируется получение не менее 10-12 ооцитов. Исключением могут являться ситуации, когда реципиенты имеют индивидуального донора, например, родственницу.

Обследование проводится по № 803н Приказу Минздрава РФ от 31.07.2020г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» (с 01.01.2021).

Дополнительными обязательными обследованиями и необходимыми документами для доноров ооцитов являются:

- кариотипирование;
- медико-генетическое консультирование;

- исследование уровня антител классов М, G к вирусу иммунодефицита человека 1/2 (ВИЧ-1/2) совместно с определением антигена р24 (HIV 1/2+Agp24) в крови;
- определение антител к поверхностному антигену (HBsAg) вируса гепатита В (HBV) в крови или определение антигена (HBsAg) вируса гепатита В (HBV) в крови;
- определение суммарных антител классов М и G (anti-HCV IgG и anti-HCV IgM) к вирусу гепатита С (HCV) в крови;
- справка из психоневрологического диспансера;
- справка из наркологического диспансера.

Дополнительные противопоказания к донорству ооцитов:

- пересадка костного мозга в анамнезе;
- ВИЧ-инфекция;
- наличие детей с врожденной патологией;
- привычное невынашивание беременности;
- онкологические заболевания;
- выраженные эндокринные нарушения.

Спорным является вопрос о том, сколько циклов забора ооцитов можно проводить у донора. Согласно рекомендациям ASRM 2021 донорство ооцитов должно быть ограничено до 6 циклов на донора. В основе этой рекомендации лежит озабоченность по поводу кумулятивного риска для здоровья донора после прохождения 6 процедур стимуляции яичников и получения ооцитов, а также предотвращение риска кровнородственных браков в будущем. Этот вопрос является крайне важным, особенно для малочисленных популяций в связи с возрастанием потребности в материале доноров [2].

1.2. Методики проведения программ ЭКО с использованием ооцитов донора

Первый ребенок после программы ЭКО появился на свет в 1978 г., всего через 6 лет Lutjen и коллеги сообщили о рождении первого ребенка с использованием ооцитов донора [14]. Это событие иллюстрирует еще одно успешное применение ВРТ. С момента начала использования донорских ооцитов данные технологии стали неотъемлемым методом лечения в программах ЭКО, что дало возможность реализации репродуктивной функции пациенткам, которые ранее оставались бесплодны. Такие проблемы как снижение овариального резерва, плохое качество ооцитов, наследственные заболевания, которые не могли найти своего клинического решения, дали начало новому направлению научной и клинической деятельности. Решение этих проблем не только позволило создать успешные программы с использованием ооцитов донора, но также дало возможность получить новые знания для многих направлений ВРТ.

На первых этапах развития этого направления перенос эмбриона в полость матки реципиента осуществляли путем синхронизации менструальных циклов донора и реципиента. Основные этапы программы заключались в следующем:

Этапы проведения программы ЭКО с донорскими ооцитами:

- Синхронизация менструальных циклов донора и реципиента путем назначения донору, реципиенту или обеим женщинам гормональных препаратов;
- Стимуляция яичников донора ооцитов с помощью гонадотропинов (рекомбинантный ФСГ (рФСГ), человеческие менопаузальные гонадотропины (ЧМГ)) с использованием аналогов гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ) (агонисты гонадотропин-рилизинг гормона (аГнРГ) и антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона (антГнРГ));

- Одновременная подготовка эндометрия реципиента назначением эстрогенов;
- Введение триггера овуляции (хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), аГнРГ) донору;
- Пункция яичников донора, оплодотворение полученных яйцеклеток спермой мужа реципиента;
- Подготовка эндометрия реципиента;
- Перенос эмбрионов реципиенту.

Частота наступления беременностей была высокой – 40-50% на перенос, но и временные и материальные затраты оказались достаточно высокими, что ограничивало применение этого метода в клинической практике[1][2][15].

1.3. Процедура витрификация как новый этап развития криоконсервации ооцитов и эмбрионов

Значимым достижением эмбриологии в программах ЭКО послужила возможность криоконсервации эмбрионов и эффективного использования размороженных эмбрионов в так называемых криоциклах. Эта методика позволила криоконсервировать дополнительные эмбрионы, полученные в программах, и затем переносить их пациентке в случае не наступления беременности или для повторного деторождения. Первый ребенок из криоконсервированной яйцеклетки появился в 1986 году в соответствии с протоколом “медленного замораживания” [1]. Несмотря на то, что протоколы криоконсервации улучшились за последние три десятилетия, имеющиеся данные свидетельствуют, что при использовании эмбрионов, полученных из яйцеклеток, криоконсервированных данным методом, значительно снижется частота наступления беременности и имплантации по сравнению с нативными ооцитами [16]. С другой стороны, в настоящее время имеется значительный объем данных, свидетельствующих о том, что витрифицированные яйцеклетки функционально эквивалентны своим свежим аналогам с точки зрения потенциала оплодотворения, развития и имплантации [15][17]. Хотя

медленное замораживание яйцеклеток может быть успешным [18], витрификация стала более предпочтительным методом [19]. Сохранение яйцеклеток методом витрификации имело значительно более высокую выживаемость, имплантацию и частоту наступления беременности [20].

Превосходная клиническая эффективность и показатели живорождения, связанные с витрификацией, обеспечивают сохранение фертильности и привели к значительному расширению использования криоконсервации яйцеклеток. Кроме того, криоконсервация яйцеклеток предоставляет логистические альтернативы для управления циклом ЭКО человека и облегчает новые услуги, такие как банкинг донорских яйцеклеток. Банкинг донорских яйцеклеток дает преимущества всем вовлеченным сторонам (донору, реципиенту и клинике), включая сокращение времени ожидания, отсутствие необходимости в синхронизации пациентов, повышение безопасности для предотвращения передачи генетических заболеваний и расширение доступа к пулу доноров. Возросшая доступность витрифицированных донорских яйцеклеток, в свою очередь, позволила широко применять донорство яйцеклеток и внедрять новые формы сотрудничества между центрами [21].

Чтобы исследовать эффект витрификации яйцеклеток, важно исключить факторы, которые могут повлиять на клиническую эффективность процесса. Помимо витрификации, на развитие эмбриона и клинические исходы могут влиять несколько факторов, включая внутреннее качество гамет в зависимости от возраста женщины, стимуляции яичников и качества сперматозоидов. Так же влияние любых манипуляций (подготовка спермы, обработка яйцеклеток, техника оплодотворения и культивирования эмбрионов).

Таков был подход Chang и коллег [3], которые так же изучали влияние витрификации на пациенток с бесплодием от 30 до 39 лет. Участники согласились витрифицировать половину своих яйцеклеток, а вторую половину использовать в качестве контрольной группы. Яйцеклетки были витрифицированы и разморожены в течение 30 мин. Чтобы гарантировать, что

гаметы одинакового качества были распределены по разным группам, ооциты и сперматозоиды были получены у одних и тех же пациентов в один день. Качество гамет и манипуляции с яйцеклетками и сперматозоидами контролировались и стандартизировались. Поскольку часть витрифицированных яйцеклеток не пережила процесс витрификации и размораживания (~20%), авторы сообщили как о клинических, так и лабораторных результатах в зависимости от исходного количества яйцеклеток. Хотя тенденция, учитывающая потерю яйцеклеток при расчетах эффективности, установила более высокие показатели оплодотворения в группе нативных ооцитов, когда в качестве знаменателя использовалось исходное число яйцеклеток, показатели оплодотворения и развития эмбрионов тем не менее были статистически сопоставимы между нативной и витрифицированной группами [3]. Более того, полученные данные продемонстрировали, что процесс витрификации и/или протокол стимуляции не является определяющим фактором. Наиболее значимым критерием является возраст матери с очевидными преимуществами для более молодой возрастной группы (30-36 лет) по сравнению с группой матерей 37-39 лет. Женский возраст остается наиболее важным фактором, влияющий на исход лечения [3].

Морфологические критерии используются для оценки качества эмбрионов с самого начала ВРТ, однако развитие эмбриона является линейным и динамичным процессом, и практика мониторинга морфологии эмбриона через регулярные промежутки времени не обеспечивает полной оценки всех критических стадий развития. Замедленная визуализация развития эмбриона потенциально позволяет точно анализировать развитие эмбриона, предоставляя подробную информацию о скорости и сроках морфологических изменений в каждом клеточном делении [22].

Существует консенсус в отношении того, что витрификация не оказывает вредного влияния на клинические и лабораторные результаты, было продемонстрировано, что витрификация, по-видимому, вызывает

незначительные различия в морфокинезе эмбрионов. Первичным изменением морфокинеза была задержка во времени от начала клеточного деления до ранней стадии бластоцисты в группе витрификации [23]. Интересно, что временной интервал между каждым делением клеток не изменялся, что указывает на то, что репликация дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) не была нарушена у эмбрионов, полученных из витрифицированных яйцеклеток. Несмотря на эту статистически значимую задержку времени до бластуляции, продолжительность клеточного цикла все еще соответствовала нативным ооцитам в исследовании Doule и коллег [23]. Остается неясным, имеет ли эта задержка какие-либо последствия для развития, поскольку никакого влияния на имплантацию и клинический исход не наблюдалось. Хотя витрификация является значительным прогрессом по сравнению с “медленной заморозкой” в отношении эффективности криоконсервации ооцитов [24], остается неизвестным, вызывает ли процесс витрификации незначительные повреждения, которые могут привести к долгосрочным повреждениям эмбриона, некоторые из которых проявятся годами или поколениями позже в будущем.

Как и многие предыдущие революции в лабораторной технике ЭКО, витрификация получила широкое признание еще до того, как появились какие-либо данные о безопасности для детей, рожденных в результате этого процесса. Витрификация была «стандартом медицинской помощи» менее десяти лет и долгосрочных последующих исследований по охране здоровья детей не проводилось. Точно так же эта методика слишком нова, чтобы иметь какие-либо данные о ее развитии вплоть до взрослой жизни рожденных при ее использовании детей.

Анализ перинатальных исходов, а также долгосрочного развития родившихся детей необходим для исключения любого неблагоприятного воздействия на потомство. Очень обнадеживающе отметить, что в имеющихся немногочисленных исследованиях нет данных о увеличении неблагоприятных акушерских и перинатальных исходов у детей, рожденных из

витрифицированных ооцитов, по сравнению с нативными [25]. Долгосрочное наблюдение за детьми, рожденными из витрифицированных ооцитов, по-прежнему необходимо для установления общей безопасности процесса.

Недавние исследования о детях, появившихся на свет из криоконсервированных ооцитов, показало, что витрификация не оказывает отрицательного влияния на рост и здоровье потомства после неонатального периода, умственное и физическое развитие детей было сопоставимо с данными контрольной группы в последующем 6-летнем исследовании [26]. Для оценки долгосрочных последствий витрификации яйцеклеток крайне важно провести дополнительные исследования, оценивающие развитие детей, включая психомоторное развитие, успеваемость в школе и распространенность хронических заболеваний.

Возможности эффективной криоконсервации гамет и эмбрионов уже обеспечила огромные преимущества в области медицины. Это позволяет сохранить женскую фертильность, отсрочить деторождение, а также модернизировать программы донации яйцеклеток. Несмотря на то, что витрификация широко применяется в области ВРТ, необходимо приложить усилия для улучшения ее последовательности, эффективности и безопасности.

1.4. Овариальная стимуляция яичников в лютеиновую фазу менструального цикла и использование модифицированной методики у доноров ооцитов

Сегодня фолликулогенез является наиболее важным и достаточно длительным процессом в репродуктивной системе человека [27]. В течение 180 дней фолликул проходит полный цикл созревания от примордиального до овуляторного. В настоящее время нельзя назвать точные факторы, которые определяют начало роста с последующей дифференцировкой примордиальных фолликулов. По данным последних исследований именно в лютеиновую фазу предыдущего менструального цикла берет процесс перехода когорты антральных фолликулов в доминирующий пул благодаря

подъему ФСГ, происходящего в период снижения эстрадиола после овуляции при наблюдении в естественном менструальном цикле [28]. Таким образом, именно повышение уровня ФСГ активирует рост следующей когорты антральных фолликулов.

В последующем, если опираться на концепцию окна ФСГ, именно в поздней фолликулярной фазе происходит преодоление гормонального порога одним из фолликулов и его доминирование над остальными, с дальнейшей их атрезией (Рисунок 1). По последним данным есть несколько групп фолликулов, которые находятся в разных точках развития, в связи с чем не подвергаются атрезии в период формирования доминантного фолликула (Рисунок 2) [29], что является основой для возможности проведения овариальной стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла [30].

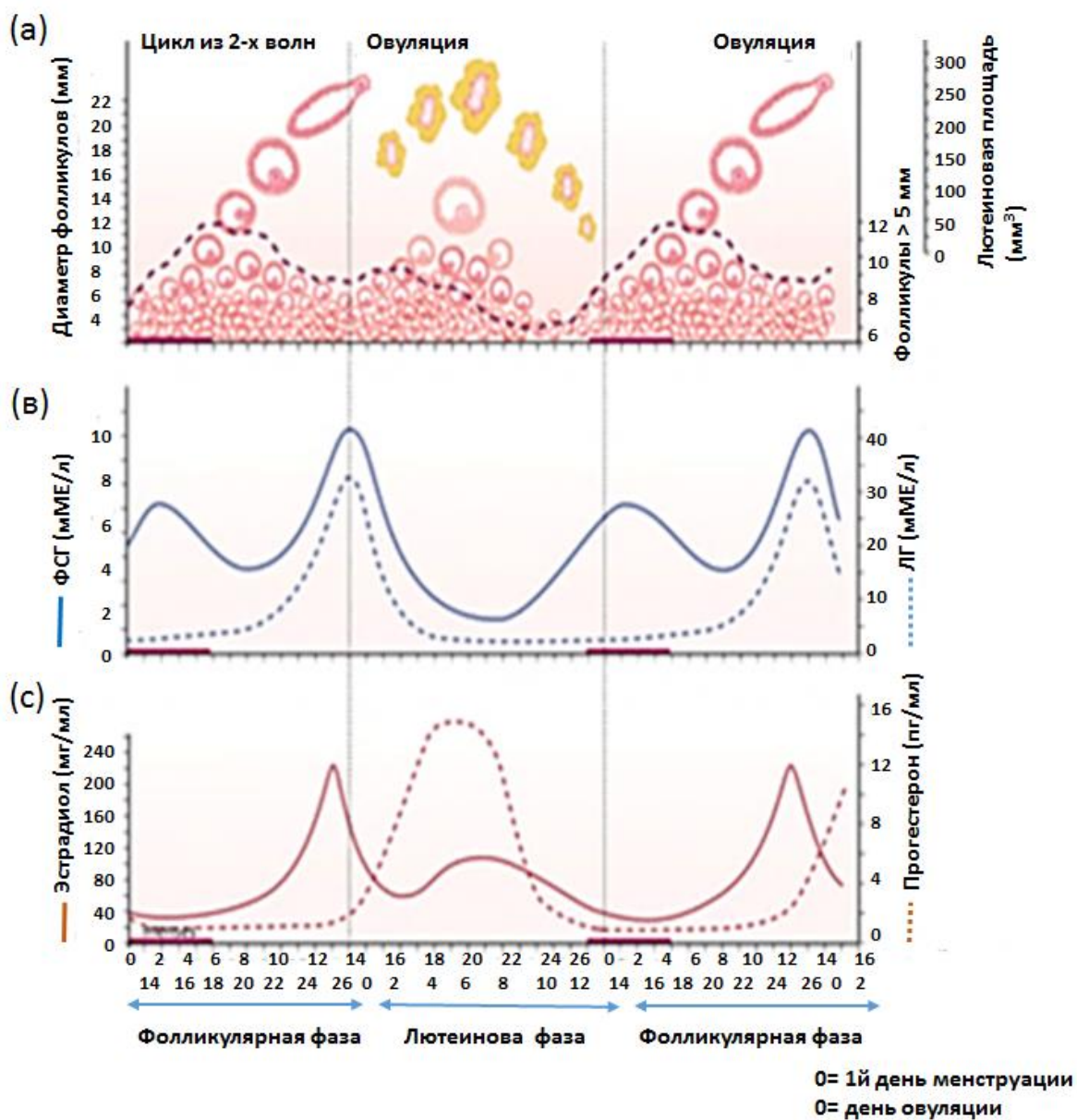


Рисунок 1. Морфологические и гормональные особенности фолликулогенеза в менструальном цикле, состоящем из двух волн

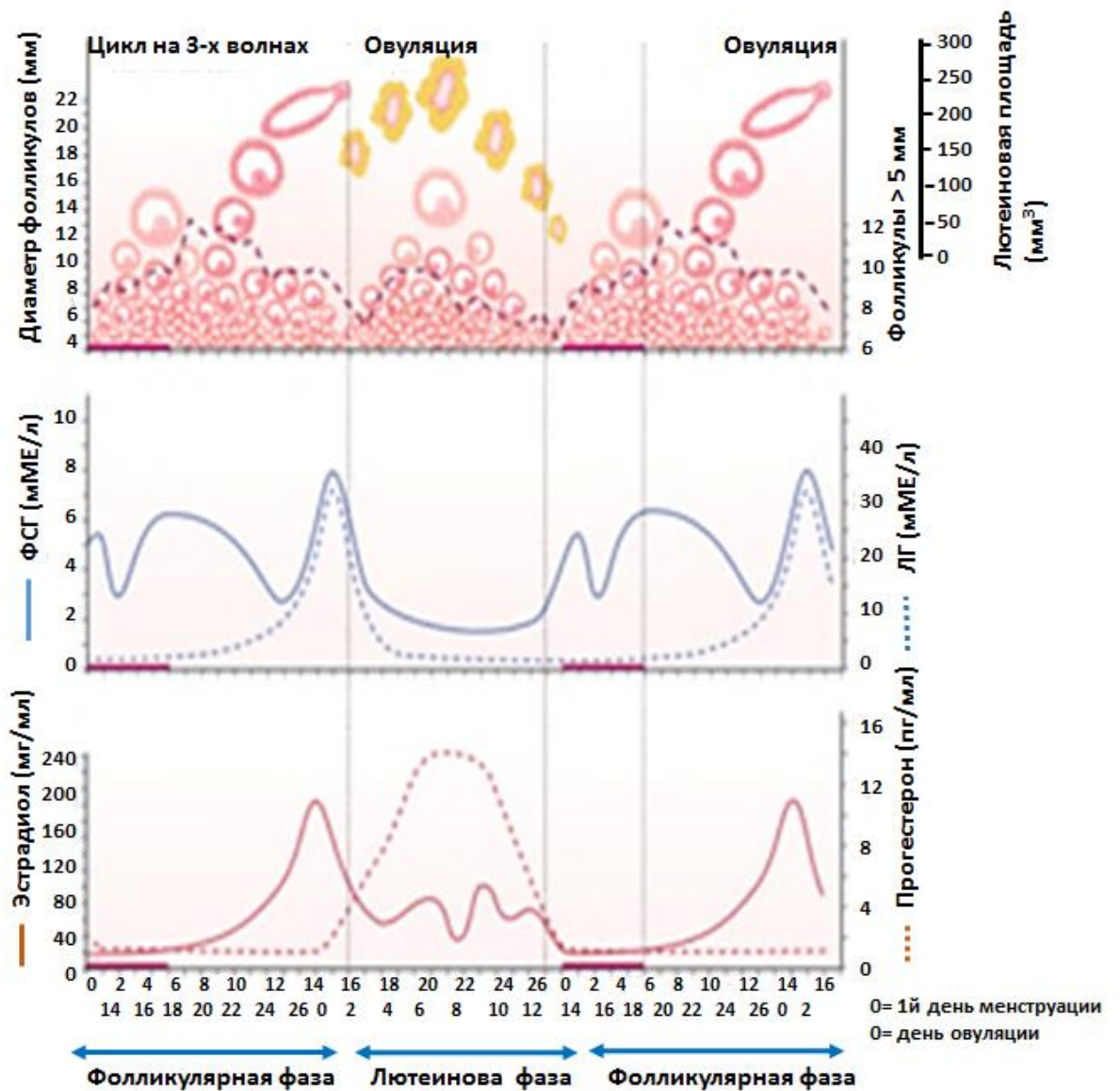


Рисунок 2. Морфологические и гормональные особенности фолликулогенеза в менструальном цикле, состоящем из трех волн

Овариальная стимуляция во вторую фазу менструального цикла впервые была использована с целью сохранения генетического материала у женщин, страдающих онкологическими заболеваниями, в связи с отсутствием продолжительного времени до начала химио-лучевой терапии [31], [32].

В исследовании, проведенном Sönmezer и коллегами, были изучены случаи овариальной стимуляции в разные фазы менструального цикла у пациенток с раком молочной железы. Для стимуляции применяли летрозол и рФСГ, а триггером овуляции был рекомбинантный ХГЧ или мочевого ХГЧ.

Эффективность стимуляции с началом в разные периоды цикла по мнению авторов была достаточно высокой, что позволяет делать выводы об отсутствии ограничений при ее применении [32]. В дальнейшем, проведение стимуляции яичников у онкологических пациентов в любую фазу цикла было успешно применено у пациенток для забора и предварительной криоконсервации репродуктивного материала [33].

Стимуляция яичников с любого дня менструального цикла у онкологических больных для забора и криоконсервации репродуктивного материала перед гонадотоксичной терапией явилась вынужденной мерой, т.к. время до начала лечения основного заболевания было ограниченным, но возможность использования протоколов, с началом стимуляции после овуляции в общей клинической практике заинтересовало специалистов.

В исследовании Ningling Wang и соавторов было предложено сравнить эффективность проведения овариальной стимуляции в разные фазы цикла женщинам с нормальным уровнем АМГ. В исследование приняли участие 2740 человек, которых разделили на три группы. В первой группе овариальная стимуляция была проведена в лютеиновую фазу с использованием антГнРГ (708), во второй группе было принято решение начать овариальную стимуляцию в фолликулярную фазу по «мягкому» протоколу (745), в третьей группе овариальная стимуляция была также проведена в фолликулярную фазу с применением антГнРГ (1287). Анализ результатов исследования, проведенного Ningling Wang и соавторами, показал, что именно в лютеиновую фазу цикла программа овариальной стимуляции была более эффективна при оценке количества зрелых ооцитов, эмбрионов высокого качества, частоты имплантации и частоты наступления беременности. Но, стоит отметить, в данной группе и суммарная доза гонадотропинов, которые были использованы, оказалась выше. Не было обнаружено статистически значимых различий в неонатальных исходах между тремя группами. В итоге исследование показало, что у пациенток с нормальным овариальным резервом эффективность лечения сопоставима при проведении овариальной

стимуляции в разные фазы менструального цикла [30]. Таким образом, результаты данного исследования показывают, что овариальная стимуляция в лютеиновую фазу может быть эффективным методом для повышения эффективности программ ЭКО. Применение данного метода может помочь сократить время ожидания и тем самым улучшить психологическое состояние пациенток.

Исходя из этих принципов, Kansal и коллеги провели пилотное исследование, в котором сравнили результат овариальной стимуляции в фолликулярную и лютеиновую фазы цикла у 18 женщин в возрасте от 20 до 42 лет с бедным ответом, предполагающим в день трансвагинальной пункции получить менее 5 ооцитов. Овариальная стимуляция проводилась по протоколу с анТГнРГ в разные фазы цикла. При оценке количества полученных ооцитов и частоты наступления беременности статистически значимых различий получено не было [34].

Имеющиеся многочисленные работы, показывающие возможность стимуляции яичников в лютеиновую фазу цикла и получение при этом даже большего количества ооцитов [35], явилось предпосылкой для использования этой методики у доноров ооцитов, когда, с одной стороны ставится задача получить больше качественных ооцитов, с другой – сокращается временной период ожидания вступления донора в программу ЭКО. Вместе с тем, в рекомендациях ESHRE 2020г. протоколы с началом стимуляции во вторую фазу менструального цикла рекомендованы лишь для онкологических больных, в других клинических ситуациях пока нет достаточно данных об эффективности применения модифицированных протоколов стимуляции яичников, что делает необходимым продолжение исследований.

1.5. Совершенствование УЗ-визуализации яичников при проведении мониторинга индуцированного цикла в программах ЭКО

На сегодняшний день ультразвуковое исследование (УЗИ) является единственным высокоинформативным неинвазивным методом, который

позволяет получить объективное представление о физиологических процессах, касающихся изменений в период менструального цикла женщины [36]. Впервые в 1977г. были продемонстрированы систематические исследования динамики роста и развития фолликулов по данным ультразвукового мониторинга [37]. Но, несмотря на то, что применение эхографии в медицинской практике началось в 1970-х годах, до середины 1990-х годов были лишь единичные исследования, направленные на изучение и подробное описание характеристик антральных фолликулов [38]. Основными причинами этого послужили ограниченные возможности ультразвуковых аппаратов и компьютерного моделирования, необходимых для оценки состояния яичников в связи с особенностями их топографии и постоянно меняющейся структурой [39, 40].

Развитие ВРТ неразрывно связано с усовершенствованием методов ультразвукового исследования. В 1990-х годах были разработаны вагинальные ультразвуковые датчики, которые заменили трансабдоминальные в программах ЭКО [41]. Помимо улучшения разрешения и качества изображения вследствие более близкого расположения датчика к органам малого таза, при использовании влагалищного доступа отсутствует влияние жировой ткани брюшной полости на результаты исследования. Также пациентка испытывает меньший дискомфорт, так как при этом не требуется наполнения мочевого пузыря, необходимое при трансабдоминальном доступе [42]. Процедура безопасна, а время исследования, как правило, не превышает 10-15 мин.

Для более объективной оценки овариального резерва в программах ВРТ применяется подсчет количества антральных фолликулов (КАФ) в яичниках при помощи эхографии и гормонального анализа. Основываясь на этих показателях, в ходе клинико-лабораторного наблюдения в программе ЭКО врач может оперативно принять решение относительно: [41] ранней отмены стимуляции суперовуляции в отсутствие неадекватного ответа со стороны яичников; дня введения триггера финального созревания ооцитов; [43] риска

развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) и необходимости использования дополнительных методов профилактики данного осложнения.

Таким образом, ультразвуковая эхография в сочетании с гормональным анализом потенциально позволяет получить дополнительные клинические данные и, как следствие, увеличить эффективность и безопасность проводимого лечения.

Успех применения ВРТ напрямую связан с количеством антральных фолликулов диаметром 2-6 мм, так как их количество позволяет прогнозировать овариальный ответ при проведении стимуляции функции яичников. Произвести подсчет антральных фолликулов при 3D-сканировании удалось, используя одно из первых программное обеспечение SonoAVC. С помощью данной программы удалось распознать и измерить каждый антральный фолликул по отдельности. При использовании двухмерной эхографии процедура измерения каждого антрального фолликула занимает достаточно много времени, и успех исследования в большей степени зависит от профессиональных навыков и опыта врача. Некоторые исследования [44] свидетельствуют в пользу того, что подсчет количества антральных фолликулов с помощью трехмерной эхографии объективно отражает фолликулярный резерв яичников и позволяют прогнозировать реакцию на стимуляцию функцию яичников. Авторы делают вывод о том, что подсчет антральных фолликулов при 3D-сканировании и определение уровня антимюллерового гормона (АМГ) позволяют точно предсказать ответ яичников на стимуляцию суперовуляции в отличие от двумерной эхографии антральных фолликулов.

В исследованиях Lass с коллегами [45] было показано, что у пациенток с объемом яичников менее 3,0 см³ часто приходится прерывать курс лечения, в связи с бедным ответом яичников. Последнее приводит к снижению эффективности программ ЭКО. Измерение объема яичников также проводится при помощи трансвагинальной эхографии [46], несмотря на то, что это быстрая и оправдывающая затраты процедура, однако она не позволяет

получить более точный прогноз, чем подсчет антральных фолликулов. В исследовании Kupesic и Kurjak [47] показали, что измерение объема яичников при помощи 3D-сканирования так же менее информативно по сравнению с определением количества антральных фолликулов. Однако данный метод эффективен для дифференциальной диагностики пациенток с нормальным овариальным резервом и синдромом поликистозных яичников (СПКЯ) [47].

Благодаря широкой доступности ультразвукового оборудования, использование его для подсчета антральных фолликулов и прогнозирования овариального ответа, позволяет снизить финансовые затраты при лечении бесплодия методом ЭКО [48]. Кроме того, на данный момент эхография – единственный метод, позволяющий непосредственно рассматривать фолликулярную структуру каждого яичника отдельно [49].

Поскольку фолликулы в яичниках заполнены жидкостью, они имеют анэхогенную структуру в относительно гиперэхогенной овариальной ткани [50] при помощи 3D-сканирования возможно визуализировать фолликулы внутри яичниковой ткани, идентифицировать границы фолликулов и абсолютные значения размеров и объема, что позволяет провести оценку их абсолютных значений [50]. Измерение объема базируется на определении количества вокселей в пределах идентифицированного фолликула.

Таким образом, произведенные измерения способствуют получению более объективного представления о фактическом объеме фолликула, независимо от его формы.

Было показано, что полученные этим методом результаты в значительной степени согласуются с данными двухмерной эхографии и для их получения требуется меньше времени, так как трехмерное сканирование позволяет быстрее осмотреть каждый яичник, фиксируя и анализируя полученные данные в программе SonoAVC, что, в свою очередь, нивелирует дискомфортные ощущения женщины, сопряженные с длительностью осмотра. Метод обладает двумя другими потенциальными преимуществами: во-первых, вычисления диаметров на основании объемов вместо усреднения

нескольких диаметров, снижая колебания измерений для несферических фолликулов; во-вторых, данный подход уменьшает риск пропуска фолликулов при их мультифолликулярном росте.

При сравнении двух методов измерений возникает важный вопрос: насколько могут различаться измерения без риска дать ошибочные интерпретации, влияющие на последующую тактику лечения.

Raine-Fenning и коллеги [51] обследовали 89 женщин, проходящих ЭКО, измеряя количество и средний диаметр фолликулов в обоих яичниках на 10-й день с использованием как двухмерной эхографии, так и при помощи 3D-сканирования с использованием программы SonoAVC с сохраненными измерениями объемов. Фолликулы были разделены на три категории в зависимости от диаметра (10 мм и более, 14 мм и более 18 мм). Результаты двух использованных методов измерений сильно коррелировали, коэффициент корреляции составил 0,84. Среднее различие между результатами применения различных методов не превышало 1 фолликул в каждой категории, что говорит о высокой надежности 3D-сканирования. Ata и коллеги [52] обследовали 100 женщин, проходящих программу ЭКО после 5 и более дней стимуляции. Различия результатов измерений с помощью программы SonoAVC по среднему диаметру при двухмерном измерении и по диаметру объема (dV) в трехмерном измерении фолликулов в категориях 14-17 и более 18 мм составили менее одного мм. В данном исследовании методом SonoAVC-dV были получены более точные показатели, чем при двумерных измерениях вручную, было выявлено на 30% больше дополнительных фолликулов в категории 10-13 мм, с увеличением размеров фолликулов различия в результатах становились менее выраженными. Аналогичная тенденция наблюдалась при измерениях по среднему диаметру фолликулов. В настоящей работе также отмечено, что различия методов более выражены при наличии мультифолликулярного роста фолликулов.

Тем не менее, Ata и коллеги [53] предполагают низкую вероятность того, что описанные различия могут влиять на клинический исход. Deutch и коллеги

[54] исследовали 347 фолликулов 14 женщин, проходящих стимуляцию суперовуляции. Авторы обнаружили наилучшую корреляцию измерений по среднему диаметру фолликула вручную и по dV методом SonoAVC, с коэффициентом корреляции 0,99. В исследовании Deb и коллег [55] методом SonoAVC удалось распознать фолликулы диаметром 1-2 мм, тогда как при двумерной эхографии не удастся распознать ни одного фолликула с такими параметрами. Это различие, скорее всего, отражает пределы разрешения 2D-эхографии и может объясняться его большей субъективностью.

Помимо идентификации диаметров фолликулов необходимо принимать во внимание время, затрачиваемое на исследование пациента. Так Raine-Fenning и коллеги [51] первыми исследовали временные затраты в стимулированных циклах. При использовании 2D и 3D-эхографии в исследовании 89 пациенткам проводилось ультразвуковое исследование на 10-й день стимуляции. Авторы установили, что автоматизированный подсчет фолликулов при объемном сканировании требует значительно меньше времени, чем обследование при стандартной двумерной эхографии ($39,0 \pm 6,0$ секунд против $236,1 \pm 57,1$ секунд, соответственно, ($p < 0,001$)). При использовании трехмерной технологии потребовалось дополнительное время для анализа данных ($141,5 \pm 64,1$ секунд), однако всего времени ($180,5 \pm 63,5$ секунд) было затрачено статистически значимо меньше, чем при двумерном сканировании.

Rodriguez-Fuentes и коллеги [56] провели исследование 58 женщин, проходящих программу ЭКО, и выполнили ультразвуковые сканирования в день введения триггера овуляции. Было установлено, что осмотр женщин, имеющих более 10 фолликулов, занимает 9,6 минут при использовании стандартной двумерной технологии, тогда как объемное автоматизированное обследование занимает 5,6 минут. В среднем при использовании программного обеспечения SonoAVC на обследование одной женщины требовалось на 7,6 минут меньше. Используя указанную опцию, врач может экономить по 4 минуты при осмотре каждой пациентки. В исследовании Deb

и коллег [55] также было показано, что в среднем автоматизированный анализ методом SonoAVC требует значительно меньше времени, чем при двухмерной эхографии ($132,0 \pm 56,2$ секунд и $324,5 \pm 162,2$ секунд, соответственно, $p < 0,001$). Автоматизированный анализ во всех случаях требовал последующей обработки данных. Deutch и коллеги [40, 54] также регистрировали время, необходимое для измерения всех фолликулов в заданном объеме яичников с использованием двумерных измерений вручную и метода SonoAVC. В связи с различиями в содержании фолликулов в каждом яичнике результаты варьировали в широких диапазонах. Измерения методом SonoAVC требовали значительно меньше времени, чем измерения вручную, в среднем — 133 секунды (размах 73-271 секунды) по сравнению с 2D-УЗИ, где затрачивалось в среднем 361 секунда (размах 129-878 секунд), соответственно, $p < 0,001$. Таким образом, удалось сократить время исследования на 3,8 минуты на один яичник, что составляет экономию времени в 7,6 минут на пациентку. При использовании метода SonoAVC большую часть времени занимают расчеты после измерений, что, в целом, является положительным фактом по сокращению времени обследования [40].

Также важно отметить, что автоматический расчет диаметров фолликулов снижает зависимость от влияния человеческого фактора, это позволяет получить более воспроизводимые результаты фолликулометрии. Данный факт подтверждается меньшим варьированием результатов, полученных от разных исследователей.

В рассмотренных исследованиях показано, что автоматизированные измерения позволяют с высокой точностью оценить реальные объемы исследуемых объектов. Однако отличия технологии от стандартного двухмерного метода не столь существенны, хотя необходимо некоторое уточнение: в большинстве вышеупомянутых работ двухмерные измерения были выполнены исследователем с опытом измерений диаметров фолликулов вручную более 30 лет [47, 64]. Это обстоятельство указывает на то, что

автоматические измерения позволяют получить такие же точные результаты, как и измерения, сделанные достаточно опытным исследователем.

Программное обеспечение SonoAVC также обладает рядом ограничений, главное из которых – низкое качество изображений, получаемых у некоторых пациенток. По данным исследования Rodriguez-Fuentes и коллег [59] около 5% женщин не могут быть обследованы по автоматизированной технологии, а в других 15% случаев обработка данных после измерений настолько сложна, что автоматизированный метод теряет свою ценность.

Таким образом, действительное значение автоматизированных методов измерения фолликулов заключается, с одной стороны, в их надежности и, с другой стороны, в экономии времени. Оба фактора являются преимуществами с точки зрения организации лечебной работы и обучения медицинского персонала. С точки зрения организации лечебного процесса меньшее варьирование результатов при анализе одним и несколькими исследователями позволяет врачам при необходимости поручать измерения коллегам. Ввиду низкой зависимости результатов от человеческого фактора различные измерения фолликулов в процессе лечения могут быть выполнены разными врачами. Таким образом, в центрах ЭКО станет возможным более эффективное распределение задач и нагрузки между врачами. Кроме того, было отмечено, что и врачам, и пациенткам удастся сэкономить время, особенно во время стимулированных циклов. Врачи могут осмотреть большее число пациенток за тот же промежуток времени, что снижает нагрузку на центры ЭКО. Существуют преимущества и для пациенток, такие как: менее нагруженные приемные, дополнительное время для консультации с врачом [40].

С другой стороны, возможности хранения информации облегчают начало использования автоматизированных методов измерения фолликулов для начинающих врачей. Сохранение изображений позволяет разработать систему контроля качества на основе случайных проверок для удовлетворения

постоянно повышающихся требований пациентов к качеству оказания медицинской помощи.

Представленные данные литературы позволяют сделать вывод о том, что 3D-технологии и метод SonoAVC будет полезен в клинической практике при проведении программ ЭКО. Стимуляция яичников у донора ооцитов может служить моделью, апробирующей этот метод, ведь задачей является объективная визуализация количества растущих фолликулов и получение большего количества зрелых ооцитов. Более того, автоматическая система хранения информации обеспечивает ее конфиденциальность, что крайне важно именно при проведении программ донор-реципиент. Также будет храниться объективная информация о донорах, что позволит решать важные вопросы – количество и качество полученных у донора ооцитов, наличие беременностей у реципиентов при использовании ооцитов донора, количество проведенных программ у одного донора. Представляется, что внедрение в клиническую практику метода SonoAVC будет крайне полезным.

1.6. Генетическое тестирование доноров ооцитов и полученных эмбрионов в клинической практике

Методы молекулярно-генетической диагностики сегодня являются приоритетным направлением медицины. Целью генетического тестирования как пациентов, так и эмбрионов, полученных в программах ЭКО – предотвращение рождения больных детей. Особое значение молекулярно-генетическое обследование приобретает у доноров ооцитов. Ведь реципиенты крайне заинтересованы в рождении здорового ребенка, тем более что генетически ребенок не родной матери, а генетика донора ооцитов не известна. Более того, по существующим нормативным документам донором ооцитов может быть женщина, не имеющая собственных детей, в отличие от суррогатной матери, т.е. ее репродуктивные возможности также не известны. На практике так и происходит, доноры ооциты — это молодые женщины, еще не рожавшие. По тем же нормативным документам необходимо определить

кариотип донора и медико-генетическое консультирование. Но является ли это обследование достаточным?

В настоящее время использование расширенного скрининга на носительство генетической патологии методом полноэкзомного секвенирования становится более востребованным в программах ВРТ. Однако согласно приказу Минздрава России от 31 июля 2020 г. №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», единственным генетическим анализом, обязательным к выполнению для доноров ооцитов, является кариотипирование. Таким образом, кандидаты в доноры половых клеток не проходят оптимального генетического скрининга, который позволил бы минимизировать риски рождения детей с генетическими заболеваниями. Рауне и коллеги в 2021 году было проведено крупномасштабное исследование с целью оценки частоты исключения доноров гамет после расширенного скрининга на носительство генетической патологии. Всего было изучено 2673 уникальных генов, ответственных за развитие 329 известных заболеваний. Из 883 кандидатов в доноры 17,6% (155/883) были исключены на основании результатов полноэкзомного секвенирования. Наибольшую долю исключенных доноров составляли носители альфа-талассемии (19,4%, 30/155), спинальной мышечной атрофии (15,5%, 24/155) и муковисцидоза (14,8%, 23/155) [2]. Это исследование подчеркивает необходимость разработки протокола более детального обследования донора и реципиента, которое позволит провести индивидуализированный подбор донора ооцитов и снизить риск наследования генетического заболевания ребенком.

По данным ASRM скрининг на муковисцидоз, спинальную мышечную атрофию и статус носительства генов талассемии должен проводиться у всех доноров ооцитов и спермы, а скрининг на носительство синдрома ломкой X-хромосомы должен быть рассмотрен для всех доноров ооцитов, независимо от семейного анамнеза [60].

Несомненно, дополнительное обследование доноров половых клеток методом полноэкзомного секвенирования, назначение целевых генетических исследований реципиентам и подбор доноров с учетом их генетического статуса носительства мутаций позволит в значительной степени снизить риск развития генетического заболевания у детей. Однако следует помнить, что данный подход является экономически более затратным и снижает как число подходящих реципиенту доноров, так и число потенциальных доноров в целом. Тем не менее, увеличение потребности в ооцитах донора и социальная ответственность этих программ делает необходимым постановку вопроса о расширении генетического обследования доноров ооцитов.

Проведение преимплантационной генетической диагностики эмбрионов, полученных при оплодотворении ооцитов донора спермой реципиента, является спорным. С одной стороны, используют ооциты молодой женщины и нет показаний для проведения тестирования эмбрионов, с другой, партнер женщины-реципиента, как правило, старшего возраста, репродуктивные возможности донора не всегда проверены, реципиенты хотят родить здорового ребенка. Кроме того, проведение овариальной стимуляции донора в лютеиновую фазу цикла вносит дополнительное показание, для оценки генетического статуса эмбрионов, в связи с отсутствием достаточного количества аналогичных работ.

Рассматривая мужчин старшего репродуктивного возраста, следует отметить, что формирование хромосомального набора эмбриона зависит от состава и качества как ооцитов, так и сперматозоидов. Также известно, что в старшем возрасте у мужчин страдает качество сперматозоидов, даже при нормальных рутинных показателях спермы [61]. Этот факт может иметь значение при проведении программ донор-реципиент, когда партнер старшего возраста.

Известно, что у здоровых мужчин частота обнаружения сперматозоидов, несущих хромосомную аномалию, варьируется от 1-2% до

10%, как показали результаты различных исследований [62], с возрастом этот процент может значительно увеличиваться.

Яйцеклетки молодых женщин также могут иметь хромосомные aberrации, что является физиологической нормой. По данным литературы, от 20-30% до 70% ооцитов преимущественно стадии МII имеют те или иные хромосомные патологии [63].

Преимплантационное генетическое тестирование – термин, который был введен в 2017г., в настоящее время позволяет осуществить выбор эуплоидных эмбрионов, что в значительной степени повышает эффективность программ ВРТ, и это в свою очередь важно при проведении программ донор-реципиент. [64].

Таким образом, проблема совершенствования проведения программ ЭКО с использованием ооцитов донора не решена полностью, а возрастающая потребность в реализации этих программ диктует необходимость проведения дальнейших углубленных исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

На базе 1-го гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в период с 2014 г. по 2017 г. были обследованы 152 женщины. 30 доноров ооцитов, прошедших овариальную стимуляцию дважды, 36 реципиентов, использующих ооциты, полученные от доноров при их стимуляции в фолликулярную фазу менструального цикла, и 48 реципиентов, использующих ооциты, полученные в лютеиновую фазу менструального цикла. На первом этапе в данной работе было проанализировано 60 программ овариальной стимуляции у доноров ооцитов и 84 цикла ЭКО/ИКСИ у реципиентов.

Отобранные для первого этапа исследования доноры ооцитов, заключающегося в сравнении эффективности овариальной стимуляции в разные фазы менструального цикла, поделены на две группы:

I группа (n=30), доноры ооцитов, овариальная стимуляция осуществлялась в фолликулярную фазу цикла;

II группа (n=30), те же доноры ооцитов, овариальная стимуляция осуществлялась в лютеиновую фазу цикла;

Таким образом, одному и тому же донору была проведена овариальная стимуляция дважды. Первый раз – в фолликулярную фазу, повторно – через 3-6 месяцев в лютеиновую фазу с последующим оплодотворением и переносом эмбрионов реципиентам в криоцикле. Все женщины, вошедшие в исследование, соответствовали критериям включения и невключения (Рисунок 3).



Рисунок 3. Дизайн исследования овариальной стимуляции у доноров ооцитов на первом этапе

На следующем этапе исследования, с целью сравнения эффективности программы ЭКО при использовании витрифицированных и нативных яйцеклеток, было произведено сравнение между I группой (n=30) доноров ооцитов, прошедших овариальную стимуляцию в фолликулярную фазу цикла, и той же группой доноров Ia (n=30), но прошедших овариальную стимуляцию в третий раз через 3-6 месяцев также в фолликулярную фазу цикла с последующей криоконсервацией ооцитов.



Рисунок 3а. Схема проведения программы ЭКО с нативными ооцитами и предварительной витрификацией эмбрионов (N=30)

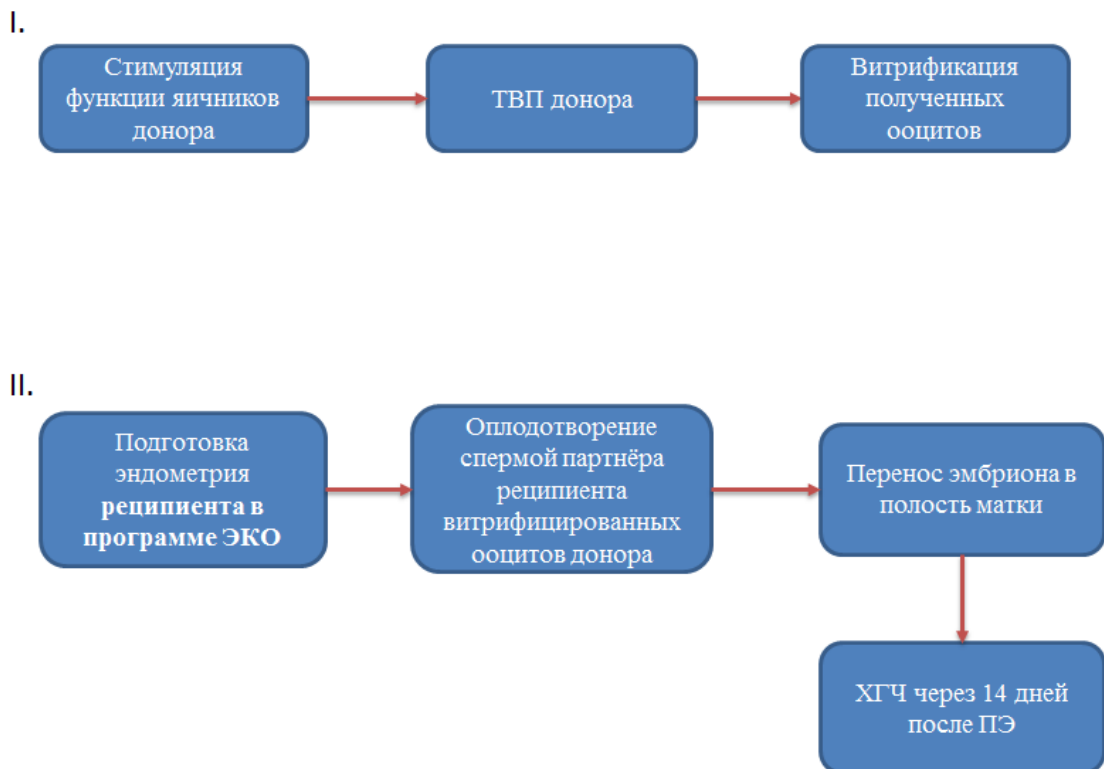


Рисунок 3б. Схема проведения программы ЭКО с витрифицированными ооцитами (N=30)

Критерии включения в исследование для доноров ооцитов:

- Наличие информированного согласия о готовности участвовать в исследовании;
- Возраст от 18 до 35 лет;
- Концентрация ФСГ <10 мМЕ/мл;
- Значение индекса массы тела (ИМТ) от 18 до 26 (включительно);
- Визуализация по данным УЗИ более 10 антральных фолликулов в день начала овариальной стимуляции.

Критерии невключения в исследование для доноров ооцитов:

- Соматические и психические заболевания, являющиеся противопоказаниями для вынашивания беременности и родов;
- Острые воспалительные заболевания любой локализации;
- Хронические заболевания любой локализации в стадии обострения;
- Кисты яичников;
- Злокачественные новообразования любой локализации, в том числе в анамнезе;
- Пороки развития органов малого таза;
- Объемные образования органов малого таза.

Критерии включения в исследование для реципиентов (супружеских пар):

- Возраст от 20 до 49 лет включительно;
- Наличие в анамнезе безуспешных циклов ЭКО/ИКСИ;
- Значение ИМТ от 18 до 29 включительно;
- Информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения в исследование для реципиентов (супружеских пар):

- Тубоовариальные образования по данным УЗИ;
- Миоматозные узлы диаметром >5см и/или их центрипетальный рост;
- Выраженные деформации полости матки;

- Пороки развития органов малого таза, в том числе после состояния их хирургической коррекции;
- Выраженная патозооспермия (III-IV степени);
- Психические и соматические заболевания;
- Период обострения хронических заболеваний;
- Острые воспалительные заболевания;
- Злокачественные новообразования.

2.2. Методы исследования

Клинико-лабораторное обследование доноров ооцитов и реципиентов было проведено в амбулаторных условиях ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России или по месту жительства.

На первом этапе был собран анамнез донора. Наибольший акцент был направлен на акушерско-гинекологический профиль. Уточнение возраста менархе, становление и характер менструального цикла. Тщательно описывали репродуктивную функцию женщины – наличие беременностей, оперативных вмешательств, инфекционно-воспалительных заболеваний. Производили подробный опрос, касающийся наследственных заболеваний.

Вторым этапом производили гинекологический осмотр с оценкой развития наружных половых органов. Осмотр шейки матки. Влагалищное исследование органов малого таза.

На третьем этапе произведено клинико-лабораторное обследование:

- выявление резус фактора и группы крови;
- визуализация органов малого таза на УЗИ методом 2D и 3D-эхографии;
- общий анализ крови;
- общий анализ мочи;
- гемостазиограмма;
- определение антител к ВИЧ, гепатитам В и С, сифилису;

- гормональное обследование;
- мазок на степень чистоты влагалища и цервикального канала;
- молекулярно-биологическое исследование отделяемого слизистых оболочек женских половых органов на возбудителей инфекций, передаваемых половым путем;
- определение антител к вирусу краснухи;
- цитологическое исследование мазков с шейки матки, расширенная кольпоскопия;
- УЗИ щитовидной железы;
- УЗИ молочных желез;
- ЭКГ;
- заключение терапевта об отсутствии противопоказаний для проведения программы ЭКО;
- флюорография;
- заключение смежных специалистов (по показаниям);
- кариотипирование;
- заключение врача-генетика;

Дополнительно у доноров ооцитов в периферической крови определяли концентрации ЛГ, эстрадиола и прогестерона в день начала овариальной стимуляции, на 6 день стимуляции, в день введения триггера овуляции, день ТВП.

На четвертом этапе был собран анамнез реципиентов. Уточнение возраста менархе, становление и характер менструального цикла. Тщательно описывали репродуктивную функцию женщины: наличие беременностей, оперативных вмешательств, инфекционно-воспалительных заболеваний. Производили подробный опрос, касающийся длительности отсутствия наступления беременности, наличие попыток ЭКО в анамнезе и тактики лечения бесплодия.

Пятым этапом производили гинекологический осмотр с оценкой развития наружных половых органов. Осмотр шейки матки. Влагалищное исследование органов малого таза.

На шестом этапе произведено клинико-лабораторное обследование:

- выявление резус-фактора и группы крови;
- визуализация органов малого таза на УЗИ;
- общий анализ крови;
- общий анализ мочи;
- гемостазиограмма;
- определение антител к ВИЧ, гепатитам В и С, сифилису;
- гормональное обследование;
- мазок на степень чистоты влагалища и цервикального канала;
- молекулярно-биологическое исследование отделяемого слизистых оболочек женских половых органов на возбудителей инфекций, передаваемых половым путем;
- определение антител к вирусу краснухи;
- цитологическое исследование мазков с шейки матки, расширенная кольпоскопия;
- УЗИ щитовидной железы;
- УЗИ молочных желез для пациентов младше 40 лет, маммография и УЗИ для реципиентов старше 40 лет;
- ЭКГ;
- заключение терапевта об отсутствии противопоказаний для проведения программы ЭКО и вынашивания беременности;
- флюорография;
- заключение смежных специалистов (по показаниям);
- спермограмма;
- консультация андролога;

На 14-е сутки после ТВП определяли концентрацию бета-ХГЧ у реципиентов после переноса эмбриона в криоцикле.

2.2.1. Ультразвуковое исследование органов малого таза

УЗ-диагностика методом 2D и 3D-эхографии была произведена всем донорам ооцитов на протяжении 60 циклов с целью анализа и сравнения эффективности методик при принятии решения о дне введения триггера овуляции у пациенток с мультифолликулярными яичниками. Для объективности исследования доноров ооцитов поделили на 2 группы в зависимости от метода УЗ-диагностики (2D или 3D) произведенного в день введения триггера овуляции.

В группе А УЗ-мониторинг и принятие решения о дне введении триггера овуляции осуществлялись на основании 2D-эхографии. Данная группа включала в себя 30 доноров ооцитов, из них 15 доноров прошли овариальную стимуляцию в фолликулярную фазу цикла и 15 доноров прошли овариальную стимуляцию в лютеиновую фазу цикла.

В группе В УЗ-мониторинг и принятие решения о дне введении триггера овуляции осуществлялись на основании 3D-эхографии, представленная группа так же включала в себя 30 доноров ооцитов, из них 15 доноров прошли овариальную стимуляцию в фолликулярную фазу цикла и 15 доноров прошли овариальную стимуляцию в лютеиновую фазу цикла:

- 2D-эхография выполнена на аппарате «BK-modical» flexFocus 400 с применением трансвагинального высокоразрешающего датчика с частотой 3,5 и 6,5 МГц;
- 3D-эхография выполнена на аппарате «Voluson E8» с функцией Sono AVC, которая автоматически рассчитывает количество, размер и объем анэхогенных структур и образований на основании объемного изображения.

2.2.2. Процесс витрификации ооцитов

Витрификация ооцитов включает в себя удаление воды, чтобы во время замораживания не образовывались кристаллы льда, которые могут разрушить мембраны и органеллы. Витрификация предполагает использование более высоких концентраций криопротектора и очень быстрое охлаждение при температуре от 15 000°С до 30 000°С/мин. Витрификация заключается в немедленном затвердевании криопротектора до «стеклообразного» состояния. В случае с человеческими ооцитами витрификация вызывает гораздо меньшее повреждение веретена деления, что приводит к более высоким показателям выживаемости яйцеклеток.

2.2.3. Программа ЭКО

В 1-м гинекологическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России проведено 152 программы ЭКО.

Донорам ооцитов проведена овариальная стимуляция по протоколу с анТГнРГ дважды в фолликулярную фазу цикла и однократно в лютеиновую фазу цикла. В группе I со 2-го дня менструального цикла и до дня введения триггера овуляции донорам ооцитов вводили индивидуально подобранную дозу рекомбинантного ФСГ (Гонал Ф) от 150 до 300 МЕ в сутки и/или человеческого менопаузального гонадотропина (Менопур). В процессе стимуляции дозу корректировали в зависимости от ответа яичников. В фолликулярную фазу при достижении фолликулами диаметра 14 мм для предотвращения преждевременного пика ЛГ донорам ооцитов был введен анТГнРГ (цетрореликс 0,25 мг) до дня введения триггера овуляции включительно. Триггер овуляции (трипторелин 0,3 мг) вводили при наличии в яичниках ≥ 5 фолликулов диаметром ≥ 17 мм (Рисунок 4а). ТВП выполняли спустя 36 часов. Через 3-6 циклов тем же донорам ооцитов после визуализации признаков произошедшей овуляции по данным гормонального и УЗ-исследования начинали овариальную стимуляцию в лютеиновую фазу цикла

(II группа). Критерием начала стимуляции было наличие в каждом яичнике более 10 антральных фолликулов 3-8 мм в диаметре. Пациенткам вводили индивидуально подобранную дозу рекомбинантного ФСГ (Гонал Ф) от 150 до 300 МЕ в сутки и/или человеческого менопаузального гонадотропина (Менопур) от 150 до 300 МЕ в сутки. Препараты анГнРГ не применялись. Для предотвращения менструальноподобной реакции назначали норэтистерон (Норколут) в дозе 10 мг с момента достижения доминантными фолликулами 13 мм и до дня введения триггера овуляции. Триггер овуляции (трипторелин 0,3 мг) вводили при наличии в яичниках по данным УЗИ ≥ 5 фолликулов диаметром ≥ 17 мм. ТВП выполнялась через 36 часов после введения триггера овуляции (Рисунок 4б).

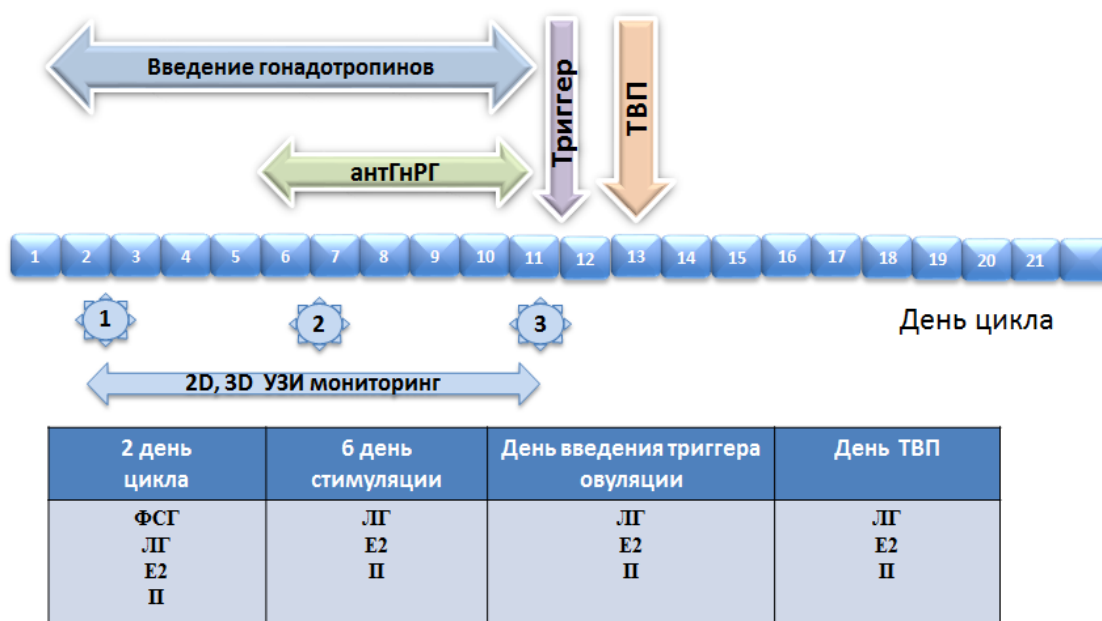


Рисунок 4а. Схема проведения овариальной стимуляции у доноров ооцитов в фолликулярную фазу

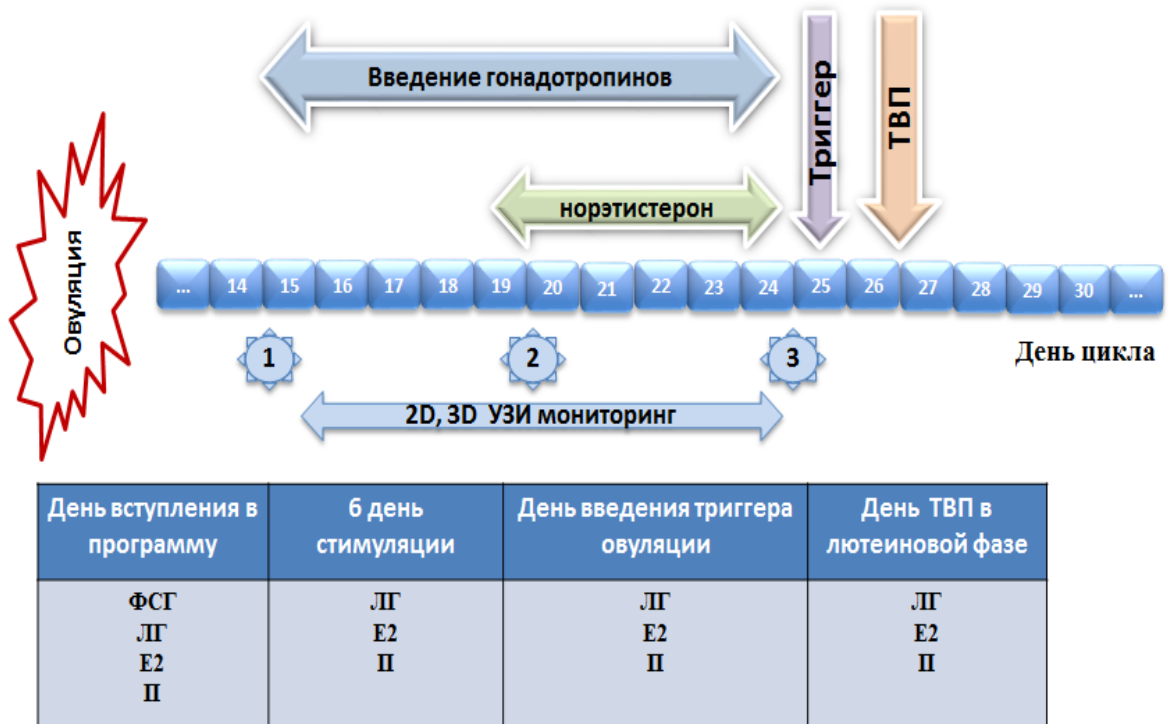


Рисунок 4б. Схема проведения овариальной стимуляции у доноров ооцитов в лютеиновую фазу

2.2.4. Эмбриологический этап

В день ТВП полученным ооцитам произведена оценка зрелости по следующим критериям:

GV – диплоидный незрелый ооцит. Характеризуется наличием видимого большого ядра, которое содержит 1-2 нуклеоли;

MI – ооцит на стадии мейоза метафаза I. Не видно ни ядро, ни полярное тельце;

MII – зрелый ооцит на стадии мейоза метафаза II. Четко видно одно полярное тельце.

Для оплодотворения была произведена интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки.

Оплодотворение можно считать нормальным при визуализации двух пронуклеусов (2PN) через 16-18 часов.

На 5-7 день производилась оценка морфологии и развития полученных эмбрионов на основании классификации Gardner D.K. и Schoolcraft W.B. (1999г.) [65].

Оценка развития бластоцисты:

1 - из объема всей бластоцисты менее 50% составляет бластоцель.

Ранняя бластоциста;

2 - из объема всей бластоцисты 50-80% объема составляет бластоцель.

Ранняя бластоциста;

3 - бластоцель занимает весь объём эмбриона. Полностью сформированная бластоциста;

4 - экспандированная бластоциста с увеличенной бластоцелью и истончённой зоной пеллюцида;

5 - бластоциста, начавшая хетчинг («вылупление»), то есть трофэктодерма бластоцисты начинает прорывать ZP и выпячиваться наружу;

6 - бластоциста, закончившая хетчинг, то есть полностью вышедшая из зоны пеллюцида.

Критерии оценки внутриклеточной масса:

A - плотно упакованное большое количество клеток;

B - небольшое количество свободно сгруппированных клеток;

C - клеток очень мало или практически не определяется;

Критерии оценки трофэктодермы:

A - регулярное строение и много клеток;

B - нерегулярное строение и немного клеток;

C - очень мало крупных нерегулярно организованных клеток.

Для культивирования эмбрионов была использована среда Vitrolife G-IVF и G-TL (Швеция) в инкубаторах со сниженной концентрацией O₂ до 5 %.

На первом этапе исследования при оплодотворении ооцитов в нативном цикле перенос одной размороженной бластоцисты производился реципиенту на фоне заместительной гормональной терапии препаратами эстрадиола валерат в дозе 6 мг/сут с 3-4 д.м.ц., с дальнейшим добавлением препаратов

прогестерона в дозе 600 мг/день, при достижении эндометрием толщины от 7мм и четкой трехслойной структуры.

На шестые сутки приема прогестерона под контролем УЗ-мониторинга в асептических условиях производили перенос одного размороженного эмбриона в полость матки.

На втором этапе исследования при оплодотворении ооцитов в витрифицированном цикле перенос одной нативной бластоцисты производился по протоколу первого этапа.

2.2.5. Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии

В исследовании у части пациентов после овариальной стимуляции в фолликулярную и лютеиновую фазу цикла было проведено ПГТ-А для оценки качества полученных эмбрионов с точки зрения генетического состава и анализа перспективы применения протоколов стимуляции в разные фазы цикла у доноров ооцитов. С этой целью на 5-7 день культивирования эмбрионов производилось рассечение зоны пеллюцида лазерным аппаратом Ostaх и биопсия трофэктодермы микрохирургическими инструментами ТРС. Микропипетки Cook применялись при получении клеток трофэктодермы. При помощи прибора «Agilent» было произведено ПГТ-А методом сравнительной геномной гибридизации на чипе aCGH. Амплификация клеточной ДНК была выполнена методом WGA-PCR (Whole Genome Amplification–Polymerase Chain Reaction) с применением набора PicoPlex SingleCell WGA Kit ("Rubicon Genomics"). Оценка количества и качества ДНК осуществлялась с использованием электрофореза в 1,2%-м агарозном геле. Затем меченые ампликоны наносили на биочип Sure Print G3 8x60 aCGH Agilent, гибридизировали в течение 16 часов и производили их анализ с помощью сканера биологических чипов SureScan Microarray Scanner. Интерпретация полученных данных была реализована благодаря программе Agilent CytoGenomics.

2.2.6 Анализ статистических данных

Полученные данные были обработаны с использованием пакета статистического анализа для Microsoft Office Excel 2007 и SPSSV22.0. Статистическая обработка производилась с использованием общепринятых методов вариационной статистики. Для количественных параметров определяли среднее арифметическое значение (M), стандартное среднеквадратичное отклонение (SD), представлены в формате M (SD). Для качественных данных были определены показатели частоты (%).

С целью проведения сравнительного анализа количественных данных в исследуемых группах определялся вид распределения данных (тест Колмогорова-Смирнова, графический анализ данных). Так для оценки различий в группах при нормальном виде распределения данных применялись методы параметрической статистики, при распределении, отличном от нормального, применялись методы непараметрической статистики – тест Манна-Уитни. Критерий Манна-Уитни считали значимым при значении менее 0,05. Для сравнения групп по качественным признакам был применен тест хи-квадрат (χ^2). При сравнении дихотомических данных и установлении статистически значимых различий между ними использовался метод X^2 с построением таблицы «2x2».

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Анализ потребности в использовании ооцитов донора за период 2019-2022гг

За период с 2019 по 2022гг. было проведено 8168 циклов ЭКО у пациентов, обратившихся в 1-е гинекологическое отделение НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Анализ представленных на диаграмме данных показывает, что с 2019 по 2022гг. значительно увеличился возраст пациенток в программах ВРТ (ЭКО/ИКСИ). Доля женщин 40 лет и старше в 2022 году составила 38,8%, тогда как в 2019 составляла лишь 23%.

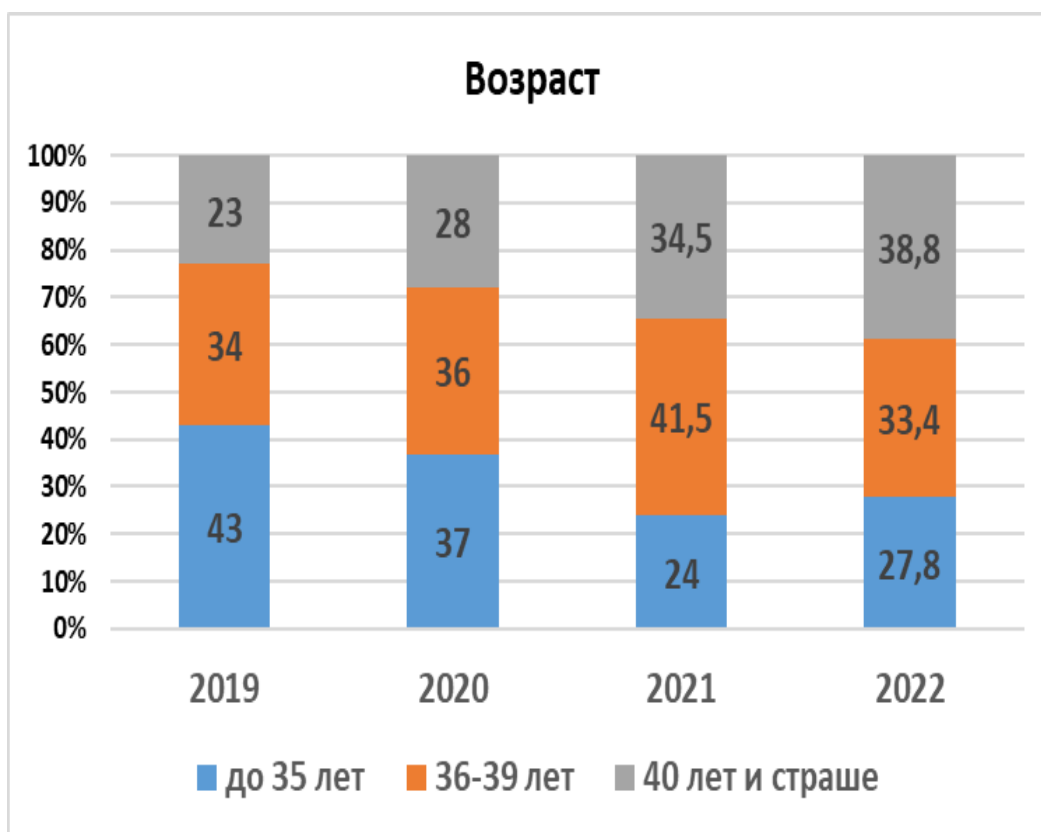


Рисунок 5. Возраст пациентов, обратившихся для проведения программы ВРТ (ЭКО/ИКСИ) с 2019 по 2022 гг.

За период с 2019 по 2022 гг. изменилась структура факторов бесплодия, увеличилась доля пациенток, имеющих сочетанные факторы бесплодия, увеличилось число женщин с гинекологической патологией, процент соматической патологии вырос с 28% до 44%. Представленные данные

свидетельствуют о том, что контингент пациенток, обратившихся к врачу-репродуктологу значительно изменился в сторону увеличения возраста, формирования сочетанных факторов бесплодия, увеличения доли женщин, имеющих гинекологическую и соматическую патологию (Рисунок 6).

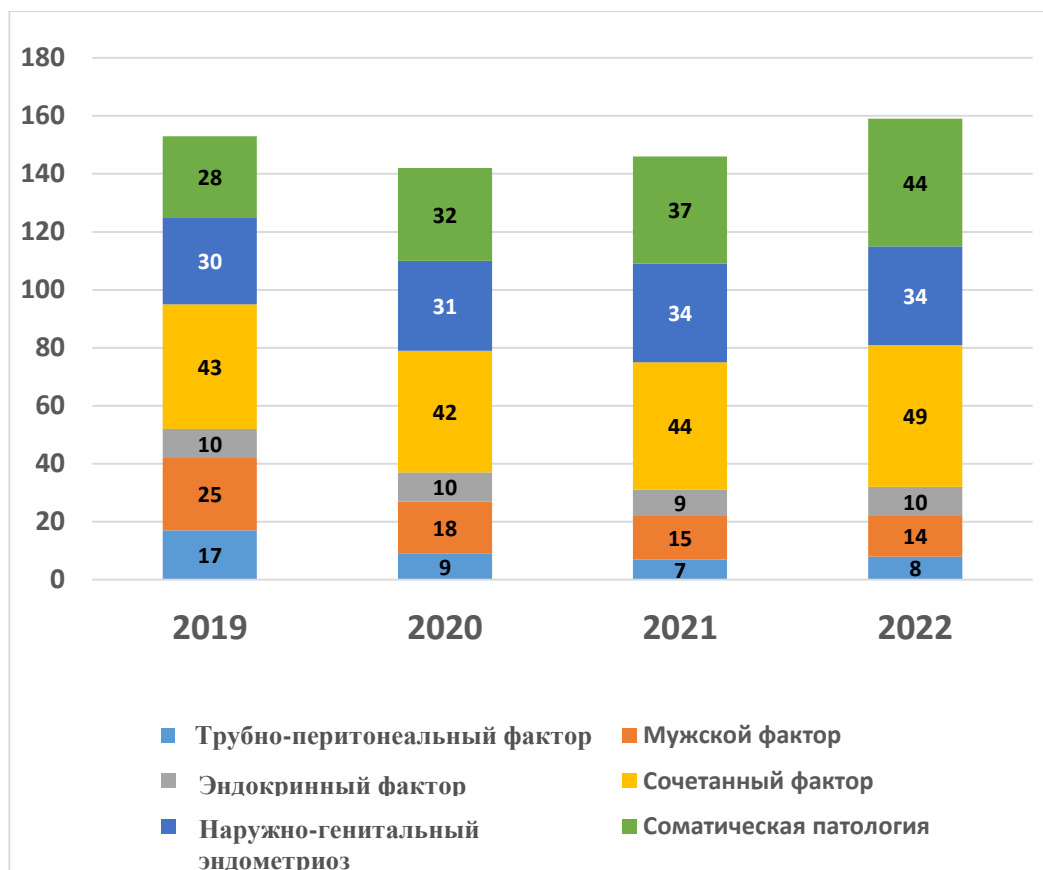


Рисунок 6. Структура факторов бесплодия пациентов, обратившихся в 1-е гинекологическое отделение НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова за период с 2019 по 2022 гг.

Анализируя причины отсутствия переноса эмбрионов в нативном цикле программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) в 1-м гинекологическом отделении, выявлено, что за период с 2019 по 2022 гг. риск гиперстимуляции снизился. Можно предположить, что данная тенденция связана с увеличением доли циклов, когда полученные ооциты и эмбрионы, непригодны для переноса (Рисунок 7), так в 2019 г. процент пациентов, использовавших собственный генетический материал и получивших в программе ВРТ (ЭКО/ИКСИ) ооциты и/или

эмбрионы неудовлетворительного качества, составил 23 %, а уже в 2022 г. увеличился до 31,1 %.

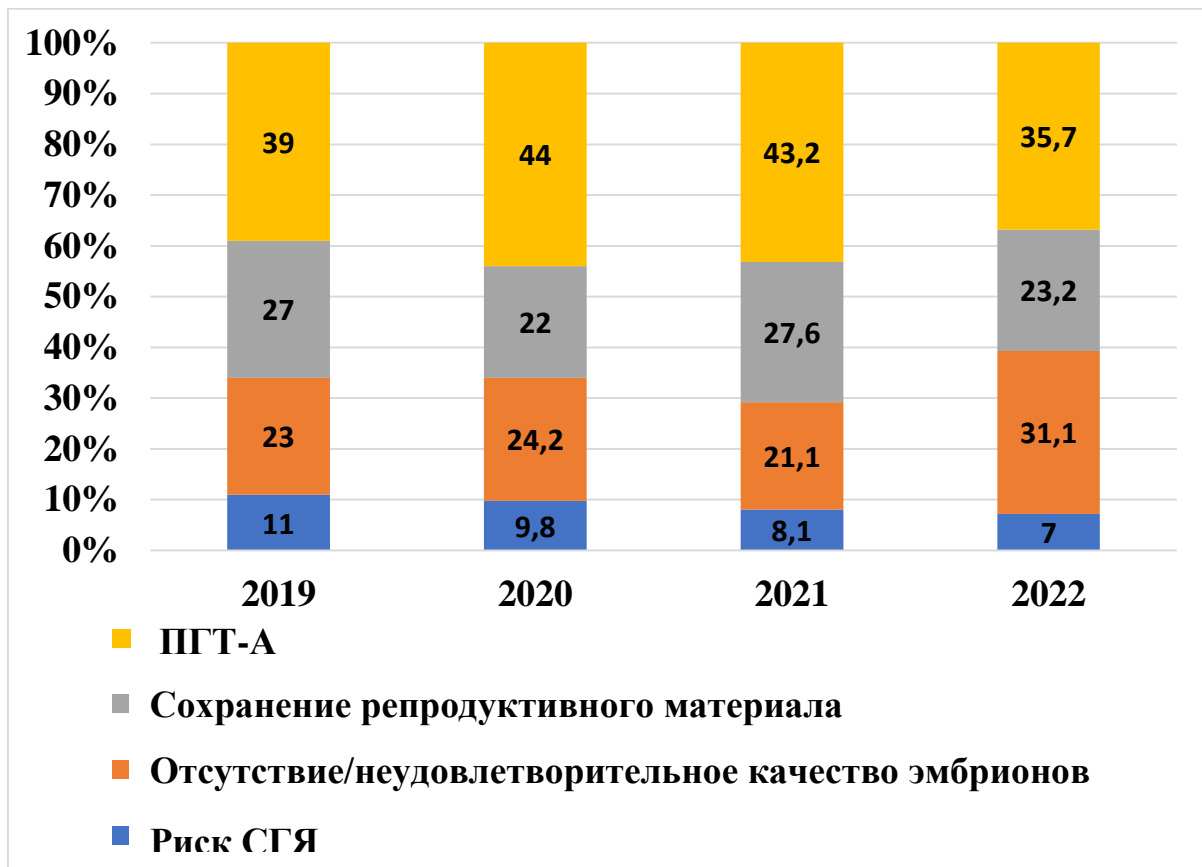


Рисунок 7. Причины отсутствия переноса эмбрионов в нативном цикле у пациентов, обратившихся в 1-е гинекологическое отделение НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова за период с 2019 по 2022 гг.

Представленные данные, указывающие на изменение характеристик пациентов в программах ВРТ (ЭКО/ИКСИ) в сторону увеличения возраста, неблагоприятному акушерско-гинекологическому анамнезу, наличие соматической патологии и увеличение количества циклов овариальной стимуляции с получением неудовлетворительного качества генетического материала обратившихся женщин, привели к повышению потребности в использовании ооцитов донора (Рисунок 8).

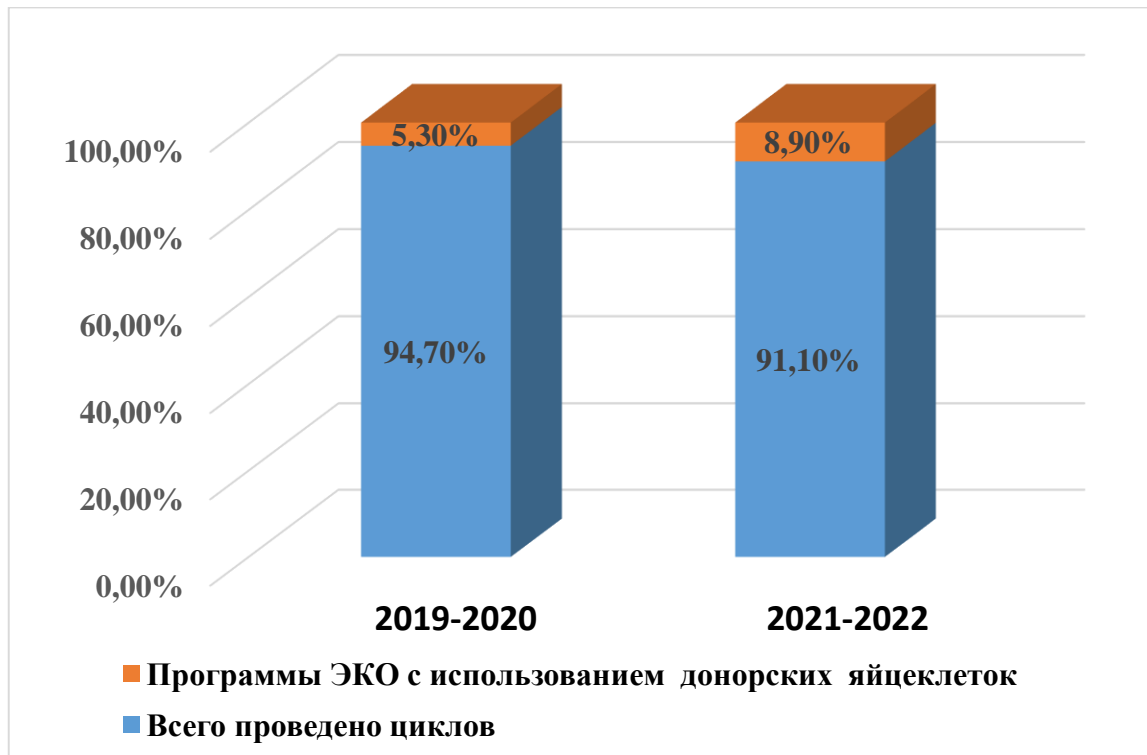


Рисунок 8. Количество проведенных циклов ЭКО с использованием ооцитов донора у пациентов, обратившихся в 1-е гинекологическое отделение НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова за период с 2019 по 2022 гг.

3.2. Клинико-anamнестические данные доноров ооцитов

В данном исследовании возраст доноров ооцитов составил 27,7 (4,2) лет, средний индекс массы тела – 21,1 (3,1) кг/м². Большая часть доноров ооцитов перенесла детские инфекции. Все доноры соматически не отягощены по заключению профильного специалиста. У 3-х доноров в анамнезе была произведена лапароскопия по поводу аппендэктомии.

Характеристики менструального цикла доноров представлены в Таблице 1. Все доноры имели регулярный менструальный цикл. Средний возраст менархе составил 12,5 (0,5) лет.

Таблица 1 - Характеристика менструального цикла и репродуктивного потенциала доноров ооцитов

Параметры	Доноры (n=30)
Возраст менархе (лет)	12,5 (0,5)
Длительность менструального цикла (количество дней)	5,3 (0,8)
Продолжительность менструального цикла (количество дней)	30,3 (1,9)
Уровень АМГ	3,7 (4,4)
КАФ по данным УЗИ в день начала овариальной стимуляции	18,3 (7,9)

Примечание: данные представлены в форме М (SD)

3.3 Клинико-anamнестические данные реципиентов ооцитов

При анализе среднего возраста реципиентов в данном исследовании было выявлено, что в I группе возраст составил 38,54 (6,5) лет, во II группе - 39,53 (5,5) лет, в Ia группе - 38,78 (6,53) лет. При оценке индекса массы тела у реципиентов в I группе составил - 24,3 (4,1), во II группе - 23,9 (3,8), в Ia группе - 24,6 (2,9).

Статистически значимых отличий в продолжительности бесплодия у представленных групп найдено не было, составив 6,3 (3,4) года в I группе, 5,7 (4,1) во II группе, 5,9 (3,8) в Ia группе ($p>0,05$).

Характеристики менструального цикла реципиентов представлены в Таблице 2.

Таблица 2 - Характеристика менструального цикла реципиентов

Параметры	I группа, реципиенты (фолликулярная фаза) (n=36)	II группа, реципиенты (лютеиновая фаза) (n=48)	Ia группа реципиенты (фолликулярная фаза) (n=38)	p
Возраст менархе (лет)	12,1 (1,2)	12,9 (1,3)	12,3 (1,5)	(p>0,05).
Длительность менструации (дней)	5,2 (1,4)	5,0 (2,8)	5,4 (1,7)	(p>0,05).
Продолжительность менструального цикла (дней)	26,5 (4,9)	26,9 (5,3)	25,9 (4,1)	(p>0,05).

Используемый метод: t-критерий Стьюдента

Структура гинекологических заболеваний у реципиентов описана в Таблице 3.

Таблица 3 - Гинекологические заболевания реципиентов

Гинекологические заболевания	I группа, реципиенты (фолликулярная фаза) (n=36)		II группа, реципиенты (лютеиновая фаза) (n=48)		Ia группа реципиенты (фолликулярная фаза) (n=38)		p
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Инфекции, передаваемые половым путем	10	27,8	13	27,0	11	28,9	p>0,05
Гиперплазия эндометрия	9	25,0	13	27,0	10	26,3	p>0,05
Полипы эндометрия	5	13,8	6	12,5	5	13,2	p>0,05
Миома матки	14	38,9	18	37,5	14	38,4	p>0,05
Эндометриоз I-II ст	27	75,0	35	72,9	29	76,3	p>0,05

Используемый метод: тест хи-квадрат (χ^2)

Практически треть реципиентов в анамнезе перенесла оперативные вмешательства (Таблица 4). В структуре оперативных вмешательств наибольшая частота встречаемости наблюдалась для лапароскопии, миомэктомии и коагуляции очагов НГЭ.

Таблица 4 - Перенесенные оперативные вмешательства у реципиентов в анамнезе

Перенесенные операции	I группа, реципиенты (фолликулярная фаза) (n=36)		II группа, реципиенты (лютеиновая фаза) (n=48)		Ia группа реципиенты (фолликулярная фаза) (n=38)		P
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Лапароскопия	10	27,8	13	27,0	10	26,3	>0,05
Тубэктомия	3	8,3	5	10,4	5	13,2	>0,05
Резекция яичников	6	16,6	7	14,6	7	18,4	>0,05
Сальпинго-овариолизис	5	13,8	6	12,5	4	19,5	>0,05
Миомэктомия	9	25,0	11	22,5	10	26,3	>0,05
Коагуляция очагов НГЭ	7	19,4	9	18,8	7	18,4	>0,05

Используемый метод: тест хи-квадрат (χ^2)

При анализе данных о типе бесплодия (первичное/вторичное) у женщин обследуемых групп не было выявлено статистически значимых различий ($p>0,05$).

Таблица 5 – Распределение реципиентов по типу бесплодия

	I группа, реципиенты (фолликулярная фаза) (n=36)		II группа, реципиенты (лютеиновая фаза) (n=48)		Ia группа реципиенты (фолликулярная фаза) (n=38)		P
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Первичное	9	25	14	29,17	10	26,3	$p>0,05$
Вторичное	27	75	34	70,83	28	73,7	$p>0,05$

Используемый метод: тест хи-квадрат (χ^2)

Среди факторов бесплодия реципиентов ведущее место заняли снижение овариального резерва и старший репродуктивный возраст (Таблица 6).

Таблица 6 - Факторы бесплодия у реципиентов

Факторы бесплодия	I группа, реципиенты (фолликулярная фаза) (n=36)		II группа, реципиенты (лютеиновая фаза) (n=48)		Ia группа реципиенты (фолликулярная фаза) (n=38)		P
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Трубно-перитонеальный	5	13,8	6	12,5	5	13,2	p>0,05
Мужской	10	27,8	13	27,0	11	28,9	p>0,05
Сочетанный	14	38,9	18	37,5	15	39,5	p>0,05
Старший репродуктивный возраст	27	75,0	35	72,9	29	76,3	p>0,05
Снижение овариального резерва	32	88,89	43	87,5	34	89,5	p>0,05

Используемый метод: тест хи-квадрат (χ^2)

Таким образом, все пациентки имели объективные показания для использования ооцитов донора, т.к. имели сниженный овариальный резерв, у большинства были неоднократные неэффективные попытки ЭКО. Указанные данные подтверждены анализом причин использования ооцитов донора, среди которых возраст пациентки занимает ведущее место.

Основные причины использования донорского генетического материала представлены на Рисунке 9.



Рисунок 9. Основные причины использования донорских ооцитов

3.4. Сравнительный анализ программ ЭКО при стимуляции доноров ооцитов в фолликулярную и лютеиновую фазы менструального цикла

В данном исследовании 30 доноров ооцитов проходили овариальную стимуляцию в фолликулярную фазу менструального цикла, начиная с 2-3 дня цикла в стандартном протоколе с анТГнРГ. Те же доноры ооцитов через 3-6 месяцев после первой программы вступали в овариальную стимуляцию повторно, но стимуляцию яичников начинали уже в лютеиновую фазу цикла, с 16-19 дня цикла после констатации овуляции и визуализации желтого тела в яичнике.

При сравнении параметров проведения овариальной стимуляции в разные фазы менструального цикла не было обнаружено статистически значимых различий ($p > 0,05$): в стартовой дозе гонадотропинов, которая составила в I группе 271,2 (37,2) МЕ, во II группе - 283,7 (32,2) МЕ, ($p > 0,05$); суммарной дозе гонадотропинов: в I группе 2556,0 (399,8) МЕ, во II группе 2898,8 (511,5) МЕ ($p > 0,05$). При анализе длительности стимуляции – в I группе - 10,1 (0,8) дней, во II группе - 10,8 (1,4) дней ($p > 0,05$) также не было выявлено

статистически значимых различий; базальная концентрация ФСГ в I группе составила 4,6 (3,2) МЕ/мл, во II группе - 3,8 (2,9) МЕ/мл ($p>0,05$).

В Таблице 8 представлены концентрации гормонов: ЛГ, эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови доноров ооцитов, проходивших овариальную стимуляцию в разные фазы цикла.

Таблица 8 - Концентрации гормонов в сыворотке крови исследуемых групп доноров ооцитов

Гормоны	Группы	День начала стимуляции	бй день стимуляции	День триггера	День ТВП
ЛГ, МЕ/л	I	4,2 (2,6; 5,7)	1,7 (1,2; 2,3)	0,5 (0,2; 1)	2,1 (1; 2,9)
	II	6,3 (5,1; 13,6)	0,8 (0,3; 1,8)	0,3 (0,2; 0,5)	4,9 (2,5; 6,1)
	<i>p</i>	0,01*	0,06	0,48	0,03*
Эстрадиол, пмоль/л	I	99,2 (78,4; 147,5)	3201 (2137; 4310)	9175,5 (6332; 12478)	3850 (3036; 4680,5)
	II	282,5 (211,9; 445,2)	4666 (2026; 5668)	9136 (7309; 14567)	5710 (3302; 6200,5)
	<i>p</i>	<0,001*	0,31	0,48	0,26
Прогестерон, нмоль/л	I	1,7 (1,4; 2,1)	1,7 (1,3; 2,5)	3,5 (2; 5,4)	31,4 (17,7; 47,9)
	II	12,7 (3,9; 23,9)	7,8 (5; 13)	4,5 (3,7; 6,8)	28,6 (12,1; 49,9)
	<i>p</i>	<0,001*	<0,001*	0,05	0,83

Примечание: данные представлены в формате Me (Q1; Q3), где ME – медиана, (Q1; Q3) – межквартильный размах.

Используемый метод: критерий Манна-Уитни.

* – значение статистически значимо при сравнении I и II группы

МЕ/л

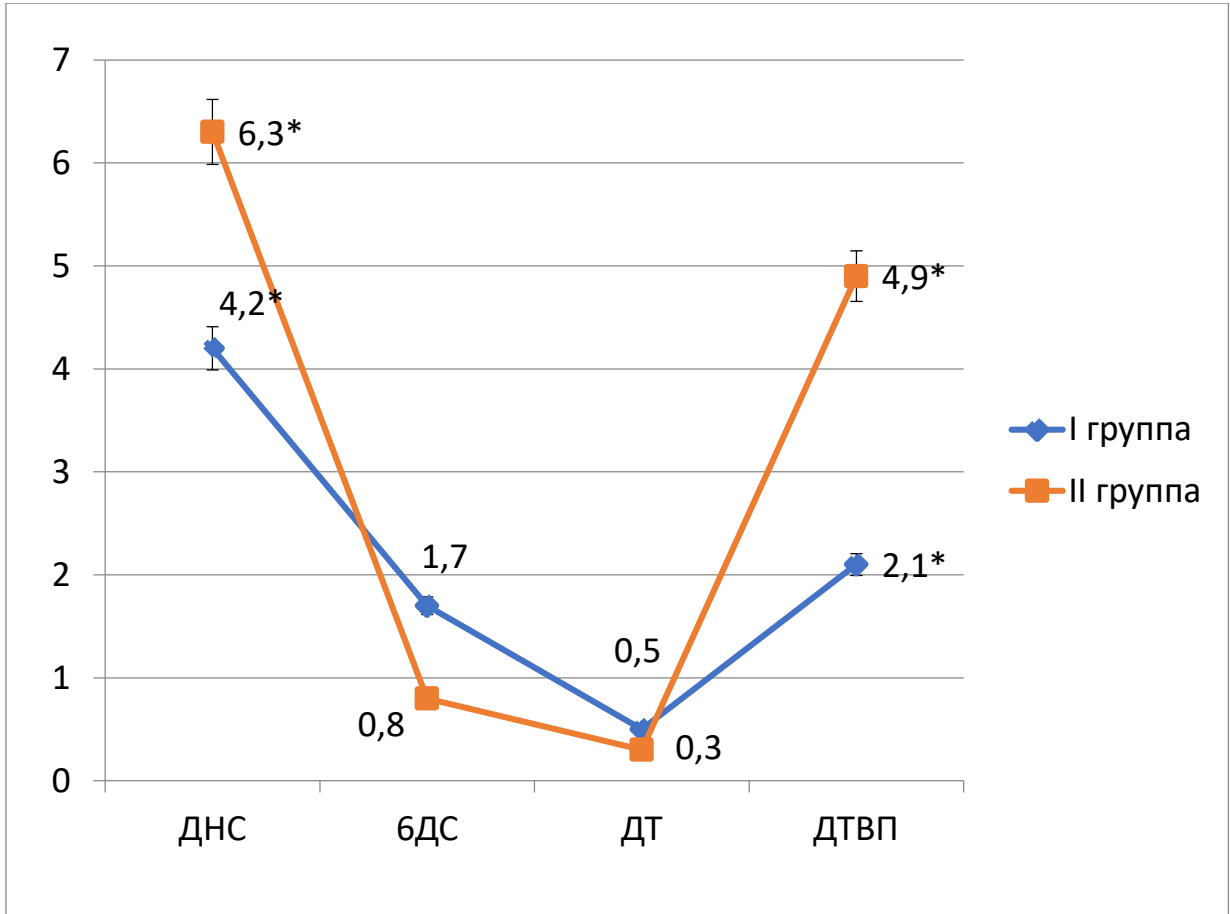


Рисунок 10. Динамика концентрации ЛГ в сыворотке крови доноров ооцитов (ДНС - день начала овариальной стимуляции, 6ДС - 6-й день овариальной стимуляции, ДТ - день введения триггера, ДТВП - день трансвагинальной пункции яичников)

Примечание: * – различия статистически значимы

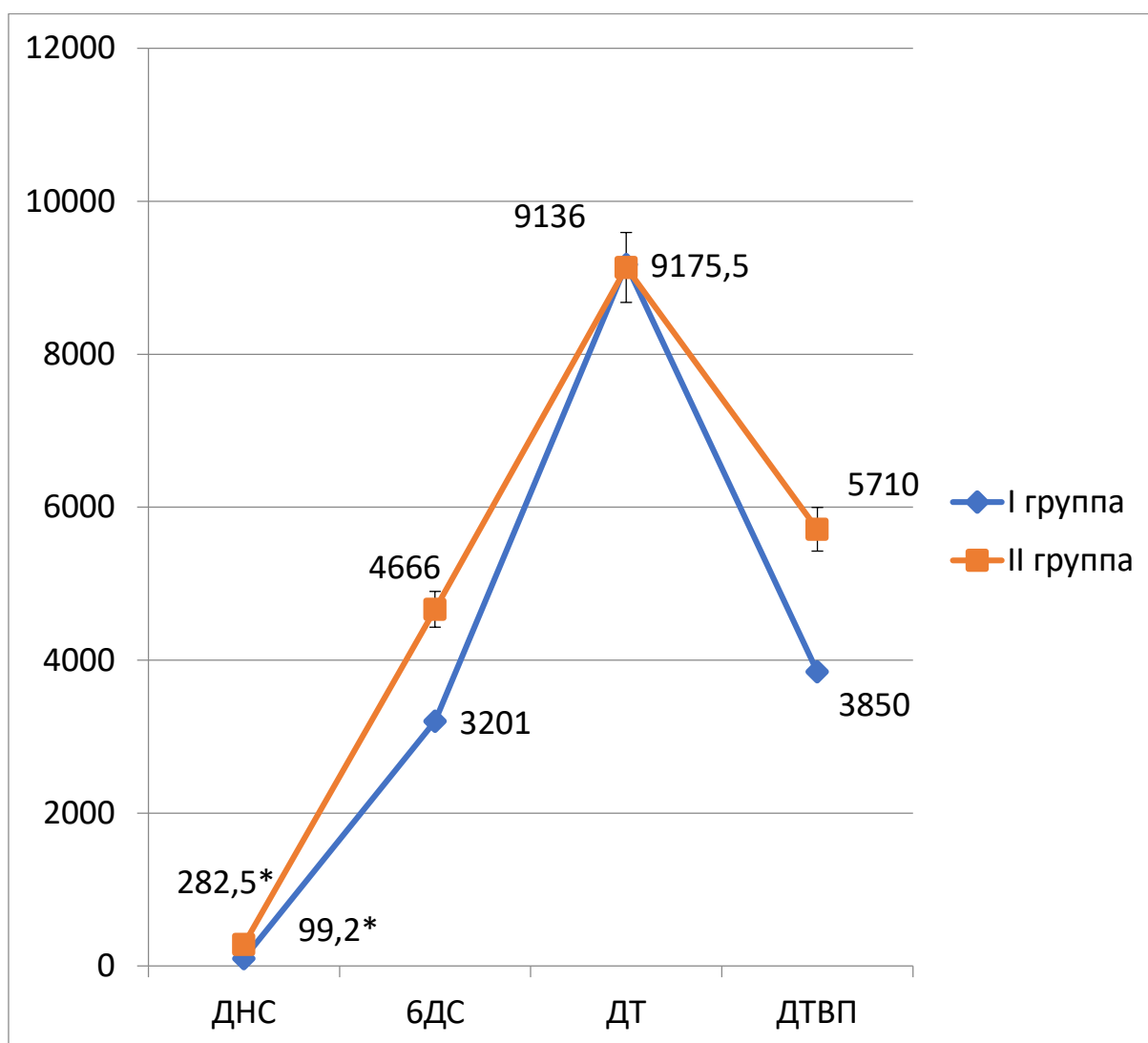


Рисунок 11. Динамика концентрации эстрадиола в сыворотке крови доноров ооцитов (ДНС - день начала овариальной стимуляции, 6ДС - 6-й день овариальной стимуляции, ДТ - день введения триггера, ДТВП - день трансвагинальной пункции яичников)

Примечание: * – различия статистически значимы

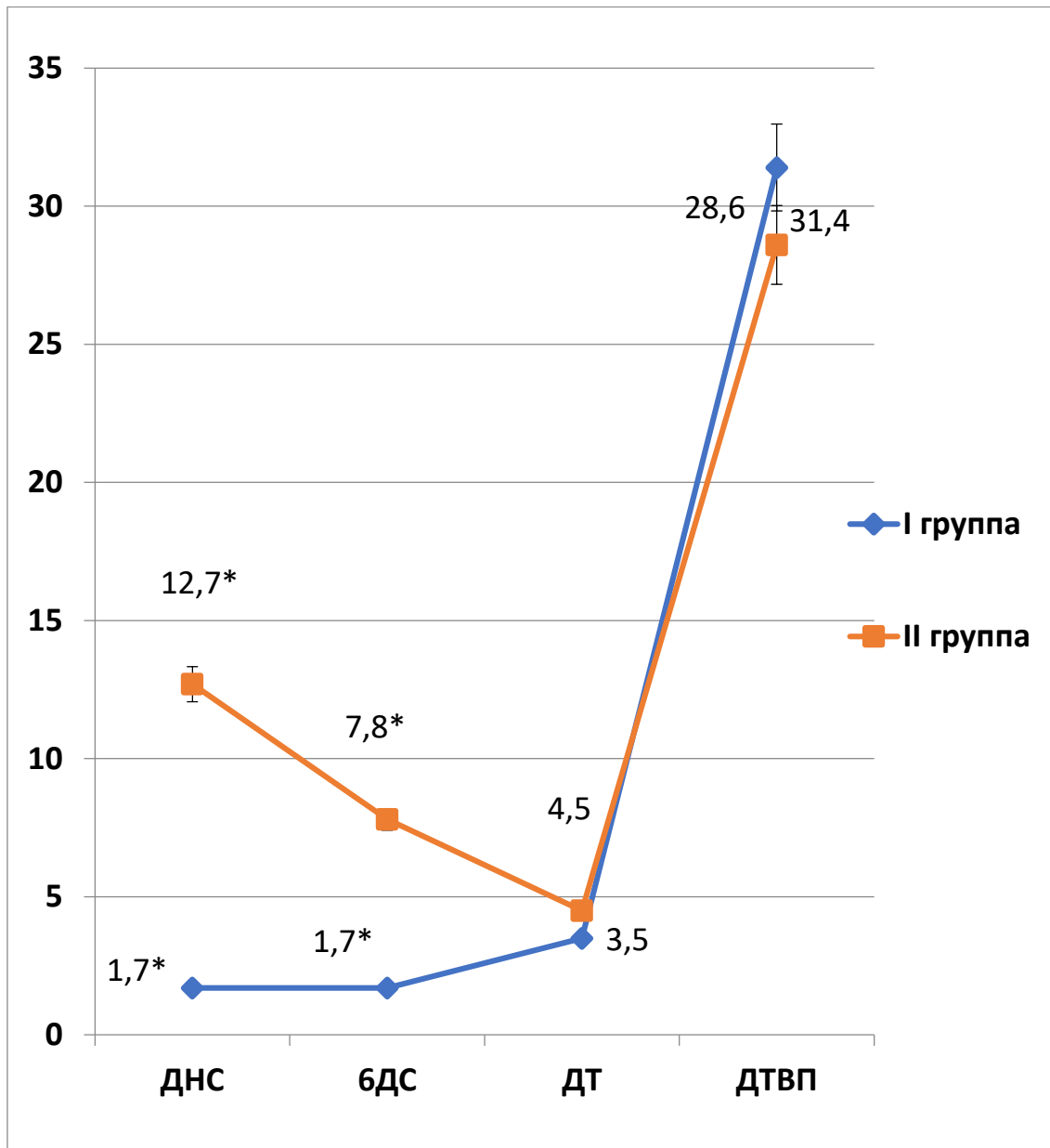


Рисунок 12. Динамика концентрации прогестерона в сыворотке крови доноров ооцитов (ДНС - день начала овариальной стимуляции, БДС - 6-й день овариальной стимуляции, ДТ - день введения триггера, ДТВП - день трансвагинальной пункции яичников)

Примечание: * – различия статистически значимы

На 1-й день овариальной стимуляции были выявлены статистически значимые отличия для концентраций ЛГ (рис.10), эстрадиола (рис.11) и прогестерона (Рисунок 12), что обусловлено началом стимуляции в лютеиновую фазу цикла при ультразвуковой диагностике произошедшей овуляции ($p < 0,05$). При анализе тех же значений в последующих точках (на 6-

й день стимуляции, день триггера, день ТВП яичников) выявлено постепенное, однако статистически незначимое ($p > 0,05$), увеличение сывороточного эстрадиола между группами, сопровождающее рост фолликулов (Рисунок 11). Концентрация прогестерона (Рисунок 12) была статистически значимо выше в день начала стимуляции ($p < 0,001$) и на 6-й день ($p < 0,001$) во II группе (лютеиновая фаза), что можно объяснить продолжающейся гормональной активностью желтых тел. Однако концентрации прогестерона в исследуемых группах выравниваются в день триггера овуляции, вероятно, в связи с угасанием активности желтых тел. В день ТВП уровни прогестерона также сопоставимы, независимо от фазы менструального цикла, в которую была проведена овариальная стимуляция.

3.5. Сравнительный анализ визуализации растущих фолликулов при использовании 2D и 3D - эхографии

В процессе проведения овариальной стимуляции было выявлено, что диаметр преовуляторных фолликулов методом 3D - эхографии был меньше на 1,1 мм по сравнению с 2D. На основании полученных данных принималось решение о времени завершения введения гонадотропинов у доноров ооцитов. Таким образом длительность стимуляции в группе 3D - эхографии была длиннее на 1 день и сопровождалась статистически значимым увеличением количества зрелых (MII) ооцитов, полученных в день ТВП. Это говорит о более высокой информативности данных при трехмерном измерении фолликулов (Таблица 9).

Таблица 9 - Параметры фолликулометрии доноров ооцитов

Критерии оценки	А группа (2D) (15 доноров- стимуляция в ФФ; 15 доноров- стимуляция в ЛФ) (n=30)	В группа (3D) (15 доноров- стимуляция в ФФ; 15 доноров- стимуляция в ЛФ) (n=30)	p
Диаметр доминантного фолликула в день введения триггера овуляции	18,4 (6,9)	18,82 (7,7)	0,16
Количество преовуляторных фолликулов в день введения триггера овуляции	16,3 (6,7)	16,9 (7,1)	0,78
Количество зрелых ооцитов МП, полученных в день трансвагинальной пункции	12,5 (4,9)	15,4 (5,2)	0,04*
Длительность стимуляции	9,8 (0,9)	10,9 (1,3)	0,03*

Примечание: данные представлены в форме М (SD)

Используемый метод: t-критерий Стьюдента

* – различия статистически значимы

Особенности визуализации при 2 D и 3 D – эхографии представлены на Рисунке 13а и Рисунке 13б.

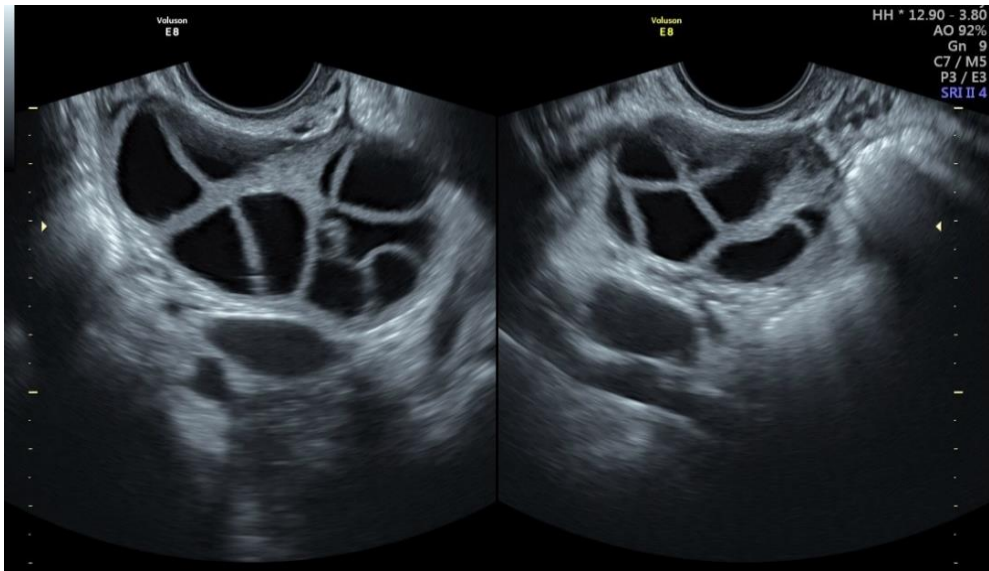


Рисунок 13а. Визуальная иллюстрация 2D - эхографии

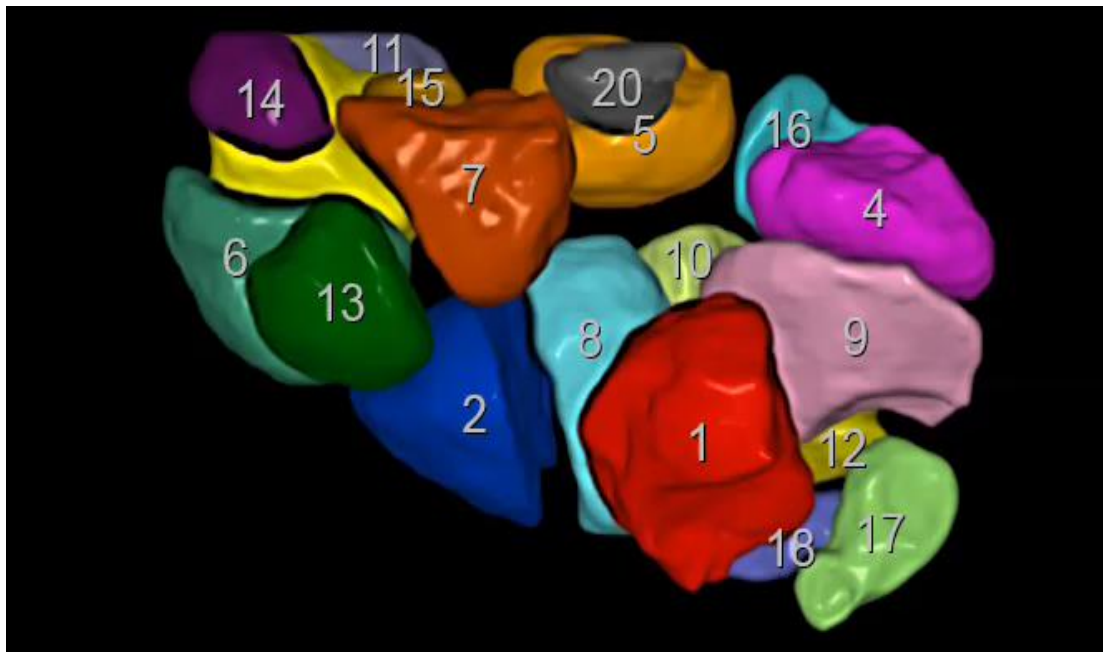


Рисунок 13б. Визуальная иллюстрация 3D – эхографии

Полученные данные продемонстрировали, что использование 3D – сканирования обладает большей информативностью для выбора дня введения триггера овуляции, что отражается в большем числе зрелых ооцитов (МII) в день ТВП, а это в свою очередь свидетельствует о приоритетном использовании данного метода исследования в программах донор-реципиент.

3.6. Сравнительная характеристика эмбриологического этапа программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) при стимуляции яичников доноров в разные фазы менструального цикла

При анализе эмбриологического этапа программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) исследуемых групп не было выявлено статистически значимых различий в числе полученных и зрелых ооцитов, числе донированных ооцитов, количестве нормально оплодотворившихся ооцитов и, соответственно, количестве blastocyst, и blastocyst отличного качества, что представлено в Таблице 10.

Таблица 10 - Эмбриологические характеристики программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ)

Параметры	А группа Фолликулярная фаза (n=30)	В группа Лютеиновая фаза (n=30)	Уровень значимости различий между группами, Р I и II
Общее количество ооцитов	15,9 (6,4)	18,5 (7,6)	0,17
Количество зрелых ооцитов (M II)	13,0 (5,6)	14,2 (6,8)	0,51
Среднее число донированных ооцитов на 1 реципиента	6,17 (2,3)	5,7 (2,01)	0,57
Количество нормально оплодотворившихся ооцитов (2PN)	11,0 (4,4)	12,2 (5,3)	0,44
Частота оплодотворения (%)	84,6	85,9	0,08
Количество blastocyst	8,7 (3,7)	9,0 (4,3)	0,84
Количество blastocyst отличного качества	5,3 (2,9)	5,8 (3,1)	0,60
Количество криоконсервированных эмбрионов	6,5 (3,9)	7,5 (3,4)	0,39

Примечание: данные представлены в форме M (SD)

Используемый метод: t-критерий Стьюдента

3.7. Характеристика плоидности эмбрионов, полученных в программах ВРТ (ЭКО/ИКСИ) у исследуемых групп

В проведенном исследовании эмбрионам, полученным от 25 доноров ооцитов, было выполнено генетическое тестирование на анеуплоидии методом ПГТ-А за счет личных средств реципиентов, таким образом было проведено ПГТ-А для 152 эмбрионов. Подробная характеристика эмбриологического этапа и оценки плоидности эмбрионов приведена в Таблице 11.

Таблица 11 - Характеристика эмбриологического этапа с оценкой плоидности эмбрионов

Показатель	Эмбрионы, Культивированные из ооцитов, полученных в фолликулярную фазу (n=78)	Эмбрионы, Культивированные из ооцитов, полученных в лютеиновую фазу (n=74)	P
Среднее число эуплоидных бластоцист	1,9 (1,3)	1,7 (1,2)	0,78
Доля эуплоидных бластоцист/ донированный ооцит (%)	30,4	31,8	1,0
Доля эуплоидных бластоцист/зиготу (2PN) (%)	31,8	38	0,56
Доля эуплоидных бластоцист/сбиопсированную бластоцисту (%)	63,6	70	0,78
Частота наступления беременности на перенос эуплоидного эмбриона (%)	66,7 (8/12)	61,5 (8/13)	1,0

Используемый метод: тест хи-квадрат (χ^2)

Не было выявлено статистически значимых различий в количестве полученных бластоцист, числе эуплоидных бластоцист, числе эуплоидных бластоцист на донированный ооцит, числе эуплоидных бластоцист на полученную зиготу (2PN), доле эуплоидных бластоцист на сбиопсированную бластоцисту. Таким образом, ооциты, полученные как в фолликулярную, так

и в лютеиновую фазы, приводят к сопоставимой частоте получения эуплодных бластоцист, что свидетельствует о сопоставимой компетенции ооцитов независимо от фазы.

3.8 Сравнительная характеристика исходов программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) при стимуляции яичников доноров в разные фазы менструального цикла

В рамках подготовки эндометрия к переносу размороженных эмбрионов реципиенты обеих групп получали идентичную терапию (см. раздел «Материалы и методы»). Перенос 1 размороженного эмбриона в полость матки осуществлялся под УЗ-контролем в асептических условиях при помощи одноразового гибкого катетера. Толщина эндометрия (М-эхо) в день переноса эмбрионов составила 8 - 11 мм ($p > 0,05$) в обеих группах.

При анализе исходов программ ЭКО/ИКСИ у женщин исследуемых групп не было выявлено статистически значимых различий в частоте наступления беременности, частоте прогрессирующей беременности и частоте живорождения (Таблица 12).

Таблица 12 - Исходы программ ЭКО/ИКСИ у женщин исследуемых групп

Исходы циклов донор-реципиент	I группа Фолликулярная фаза (n=36)	II группа Лютеиновая фаза (n=48)	Уровень значимости различий между группами, P
Частота наступления беременности на перенос эмбриона, %	52,9 (n=19/36)	51 (n=24/47)	0,06
Частота наступления клинической беременности, %	52,9 (n= 19)	51 (n= 24)	0,06
Частота репродуктивных потерь до 12 недель, %	10,5 (n=2/19)	4,2 (n=1/24)	0,86
Частота живорождения, %	44,4 (n= 16)	48,9 (n= 23)	0,08

3.9. Сравнительная характеристика эффективности программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) в циклах донор-реципиент с использованием нативных и витрифицированных ооцитов

При использовании витрифицированных ооцитов производилась разморозка яйцеклеток и их оплодотворение за 6 дней до переноса эмбриона.

Сравнение эффективности программ ЭКО в циклах донор-реципиент с использованием нативных и витрифицированных ооцитов показало, что применение нативных яйцеклеток является более эффективным, чем витрифицированных. Частота оплодотворения, количество полученных бластоцист и бластоцист высокого качества была статистически значима выше при использовании нативных ооцитов (Таблица 13).

Наибольшая эффективность программ донор-реципиент имеет место при оплодотворении нативных ооцитов донора спермой партнера реципиента и витрификацией полученных эмбрионов, с последующим переносом эмбриона в криоцикле.

Таблица 13 - Сравнительная оценка эффективности программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) донор-реципиент с использованием нативных и витрифицированных ооцитов

Параметры	I группа (Нативные ооциты) (n=30)	Ia группа (Витрифициро ванные ооциты) (n=30)	P
Общее количество ооцитов, полученных у донора	15,9 (6,4)	16,3 (4,3)	0,17
Среднее число донированных ооцитов на реципиента	6,17 (2,3)	6,8 (3,17)	0,57
Частота оплодотворения (%)	84,6%	55,9%	0,04*

Общее количество бластоцист	8,7 (3,7)	2,9 (1,3)	0,02*
Количество бластоцист высокого качества	5,3 (2,9)	2,1 (0,7)	0,03*

Примечание: данные представлены в форме М (SD)

Используемый метод: t–критерий Стьюдента

* – различия статистически значимы

Таким образом, при размораживании витрифицированных ооцитов частота оплодотворения размороженных ооцитов снижена на 30% по сравнению с оплодотворением нативных ооцитов, в 3 раза меньше количество бластоцист и бластоцист хорошего качества. Полученные данные свидетельствуют о более низкой эффективности использования витрифицированных ооцитов по сравнению с нативными.

Таблица 14 - Исходы программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) у женщин исследуемых групп при переносе эмбрионов, полученных при оплодотворении нативных ооцитов донора и при оплодотворении витрифицированных ооцитов

Исходы циклов донор-реципиент	Нативные ооциты (n=30)	Витрифицированные ооциты (n=30)	P
Частота наступления беременности на перенос эмбриона, %	52,9 (n=19/36)	31,5 (n=12/38)	0,04*
Частота наступления клинической беременности, %	52,9 (n= 19)	28,9 (n= 11)	0,02*
Частота репродуктивных потерь до 12 недель, %	10,5 (n=2/19)	9 (n=1/11)	0,86
Частота живорождения, %	44,4 (n= 16)	26,3 (n= 10)	0,01*

Используемый метод: тест хи-квадрат (χ^2)

* – различия статистически значимы

При анализе исходов программ ВРТ (ЭКО/ИКСИ) у женщин исследуемых групп были выявлены статистически значимые различия в частоте наступления беременности, частоте прогрессирующей беременности и частоте живорождения при переносе эмбрионов, полученных при оплодотворении нативных ооцитов донора и витрифицированных ооцитов (Таблица 14).

Таким образом, методика оплодотворения нативных ооцитов донора спермой партнера реципиента с последующей криоконсервацией эмбриона и переносом размороженного эмбриона в криоцикле является более эффективной. При использовании витрифицированных ооцитов частота наступления беременности и живорождения значительно снижается.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Откладывание деторождения на поздний репродуктивный возраст делает проблему донорства ооцитов чрезвычайно актуальной, причем актуальность проблемы возрастает с каждым годом. Наши данные, согласующиеся с мнением других исследователей, подтвердили факт увеличения пациентов старшей репродуктивной группы в программах ЭКО, когда количество пациенток в возрасте 40 лет и старше достигает 38,8% и более. Естественно, что это является основной причиной увеличения потребности в использовании ооцитов донора. Анализ данных, полученных за три года работы первого гинекологического отделения, показал увеличение потребности в использовании ооцитов донора на 3-4%. К сожалению, эта тенденция возрастает. Среди других причин, не связанных с возрастом, продолжает иметь значение нерациональная медицинская тактика, а именно, резекции яичников, зачастую повторные, у женщин, не реализовавших репродуктивную функцию. Использование гамет донора является не только медицинской проблемой, решаемой в рамках вспомогательных репродуктивных технологий, но и имеет значимые морально – этические и юридические аспекты. Не случайно в ряде стран мира донорские программы не разрешены или значительно ограничены. В Российской Федерации существующие законодательные акты следует признать наиболее гуманными, позволяющими использовать ооциты донора по медицинским показаниям, представленным в клинических рекомендациях «Женское бесплодие» от 2021 года и приказе Минздрава РФ № 803н от 31.07. 2020г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Тем не менее, использование ооцитов донора осуществляется только по медицинским показаниям. В настоящем исследовании скрупулезное обследование пациенток-реципиентов ооцитов подтвердило наличие у них показаний для использования ооцитов донора.

Донорами ооцитов были молодые здоровые женщины, имеющие хорошие показатели овариального резерва, и прогностически у каждой из них планировалось получить не менее 10 ооцитов.

Одной из задач настоящего исследования явилось проведение сравнительного анализа результатов овариальной стимуляции у женщин-доноров как в фолликулярную, так и лютеиновую фазы менструального цикла. Обоснованием необходимости проведения указанного анализа были данные о потенциальной возможности получения большего числа качественных ооцитов при стимуляции в лютеиновую фазу цикла, а также отсутствие необходимости ожидания начала фолликулярной фазы цикла, что является немаловажным фактом для доноров, проживающих в разных регионах страны. Особенностью данного этапа исследования явилось то, что 30 доноров ооцитов подвергались стимуляции яичников три раза, в разные фазы цикла. Это дало возможность объективизировать полученные результаты, исключив вмешательство индивидуальных особенностей доноров ооцитов.

Начало овариальной стимуляции не зависимо от фазы цикла, первоначально было предложено для пациенток с онкологическими заболеваниями, с целью сохранения генетического материала до проведения химио- и/или лучевой терапии в связи с невозможностью отсрочить лечение основного заболевания [9]. Следующим этапом внедрения стимуляций в разные фазы менструального цикла было применение «Шанхайского протокола» и двойной стимуляции, проведенной в рамках одного цикла, которые подразумевали проведение овариальной стимуляции в разные фазы цикла для лечения пациентов с бедным ответом [35]. Целью такого подхода было увеличение числа полученных ооцитов, и, соответственно, увеличение числа полученных эмбрионов [66].

Для изучения влияния овариальной стимуляции в лютеиновую и фолликулярную фазы менструального цикла на параметры оогенеза и эмбриогенеза нами была выбрана концепция донор-реципиент в связи с тем, что доноры ооцитов являются идеальной моделью для изучения влияния

периода начала овариальной стимуляции на качество ооцитов и эмбрионов, поскольку они представлены группой здоровых, потенциально или доказано фертильных женщин, которые добровольно проходят программу стимуляции яичников [67].

На первом этапе исследования нами проведена сравнительная характеристика доноров, вошедших в исследование. При анализе параметров стимуляции функции яичников не было выявлено статистически значимого увеличения длительности овариальной стимуляции в фолликулярную фазу – в I группе 10,1 (0,8) дней, во II группе 10,8 (1,4) дней ($p > 0,05$). Как и не было обнаружено статистически значимой разницы в стартовой дозе гонадотропинов, которая составила в I группе 271,2 (37,2) МЕ, во II группе 283,7 (32,2) МЕ, ($p > 0,05$); суммарной дозе гонадотропинов: в I группе 2556,0 (399,8) МЕ, во II группе 2898,8 (511,5) МЕ ($p > 0,05$). Овариальная стимуляция в раннюю лютеиновую фазу у доноров ооцитов сопоставима по длительности с овариальной стимуляцией в фолликулярную фазу. Полученные данные сопоставимы с данными Martínez и соавторов [10].

При изучении динамики изменения гормональной концентрации в сыворотке крови при проведении овариальной стимуляции в изучаемых группах выявлена значимая разница в концентрации ЛГ на день начала стимуляции в лютеиновой фазе, что является отражением произошедшего овуляторного пика ЛГ. Далее уровень ЛГ был сопоставим в обеих группах, что свидетельствует об отсутствии паразитарных пиков ЛГ при проведении овариальной стимуляции в лютеиновой фазе цикла в рамках использованной в данном исследовании схемы стимуляции, несмотря на концентрацию эстрадиола, сопоставимую с таковой на 6-й день стимуляции функции яичников в фолликулярную фазу. Так, концентрация эстрадиола на 6-й день стимуляции в I группе составила 3201 (2137; 4310) пмоль/л, во II группе 4666 (2026; 5668) пмоль/л ($p > 0,05$), при концентрации ЛГ в I группе 0,5 (0,2; 1) МЕ/л, во II группе 0,3 (0,2; 0,5) МЕ/л. Такие же данные представил Li-Hong Wei и соавторы в 2015 г [68]. Они предположили, что высокие концентрации

прогестерона блокируют выброс гонадотропин-рилизинг гормона, что в свою очередь приводит к снижению секреции ЛГ. По результатам нашего исследования, концентрация прогестерона ко дню введения триггера овуляции в лютеиновую фазу значительно снижается и достигает значений, сопоставимых со значениями в I группе (концентрация прогестерона в день введения триггера в I группе 3,5 (2; 5,4) нмоль/л, во II группе 4,5 (3,7; 6,8) нмоль/л ($p>0.05$)). Однако для предотвращения менструальноподобной реакции донорам во II группе был назначен норэтистерон 10 мг/сут, концентрация которого в сыворотке, используемыми нами тест-системами, не определялась. Таким образом, мы не можем опровергнуть вероятность того, что отсутствие преждевременного пика ЛГ не связано с высокой концентрацией циркулирующего прогестерона. Также существует гипотеза, что отсутствие преждевременного пика ЛГ в лютеиновую фазу связано не с прогестероном, а с другими медиаторами, секретирруемыми желтым телом, среди них ингибин и фоллистатин [69]. При сравнительном анализе уровня эстрадиола в исследуемых группах была отмечена одинаковая динамика роста его концентрации, соответствовавшая овариальному ответу на введение гонадотропинов, что также согласуется с исследованием Li-Hong Wei [69].

По результатам нашей работы не выявлено негативного воздействия высоких концентраций прогестерона на качество получаемых ооцитов, что подтверждается сопоставимым числом полученных и зрелых ооцитов как при стимуляции в фолликулярную так и в лютеиновую фазы (средняя концентрация прогестерона в плазме крови на начало стимуляции в I группе- 1,7 (1,4; 2,1) нмоль/л, во II группе 12,7 (3,9; 23,9) нмоль/л ($p<0.05$), число полученных ооцитов на стадии МII составило в I группе 13,0 (5,6) нмоль/л во II группе 14,2(6,8) нмоль/л. Вероятнее всего, данное обстоятельство объясняется отсутствием рецепторов к прогестерону в ооцит-кумулясных комплексах [69].

При сравнительном анализе гормонального профиля исследуемых групп, нами не было обнаружено какой-либо корреляции между

концентрацией ЛГ, эстрадиола и прогестерона и количеством эуплоидных эмбрионов, а также влияния на частоту наступления беременности. Это согласуется с данными исследования Jochum и коллег [70], продемонстрировавшего, что на показатели эуплоидии и живорождения после переноса эуплоидных эмбрионов продолжительность стимуляции яичников, уровень эстрадиола, количество извлеченных ооцитов не влияет.

Исходя из вышеизложенных данных, нами сделан вывод о том, что стимуляция яичников в лютеиновую фазу менструального цикла обеспечивает гормональный профиль фолликулогенеза, сопоставимый с таковыми при стимуляции функции яичников в фолликулярной фазе цикла.

Тогда как высокие концентрации прогестерона и лютеинизирующего гормона в сыворотке крови, сопровождающие овариальную стимуляцию в лютеиновую фазу менструального цикла, не оказывают негативное влияние на параметры оогенеза у доноров и раннего эмбриогенеза у реципиентов. Таким образом, овариальная стимуляция в лютеиновую фазу цикла у доноров ооцитов не оказывает негативного влияния на параметры оогенеза, что подтверждается сопоставимым числом полученных и зрелых ооцитов. А у реципиентов приводит к сопоставимым показателям раннего эмбриогенеза независимо от фазы получения ооцитов, что подтверждается сопоставимым числом нормально оплодотворившихся ооцитов, бластоцист высокого качества, а также эуплоидных бластоцист.

Возможность старта стимуляции в обе фазы менструального цикла согласуется с мультиволновой теорией фолликулогенеза [30]. Предыдущие исследования не выявили различий в количестве и компетенции ооцитов, полученных при проведении программы ЭКО в лютеиновую фазу, по сравнению с обычной стимуляцией [70], более того часть авторов продемонстрировали увеличение числа полученных ооцитов при стимуляции в лютеиновую фазу [34]. Также было продемонстрировано получение сопоставимого количества эуплоидных бластоцист после овариальной стимуляции в лютеиновую фазу в рамках программы двойной стимуляции у

пациенток со сниженным овариальным резервом, и, соответственно, получение большего количества ооцитов и эмбрионов хорошего качества в течение одного менструального цикла, что привело к более высокой частоте наступления беременности [34]. Кроме того, современные данные не выявили различий в количестве клинических беременностей, массе тела и росте у новорожденных, аномалии развития между детьми, родившимися в результате стимуляции в лютеиновую фазу цикла, по сравнению с теми, кто родился в результате стимуляции в фолликулярную фазу [71]. Тем не менее данные об эмбриологических исходах и эффективности лечения у пациенток с нормальным овариальным резервом, прошедших программу ЭКО в лютеиновой фазе цикла, весьма ограничены. И, как уже было описано ранее, учитывая то, что доноры ооцитов являются идеальной моделью для изучения влияния периода начала стимуляции яичников на качество ооцитов и эмбрионов, поскольку они представлены когортой здоровых, потенциально или доказано фертильных женщин, которые добровольно проходят программу овариальной стимуляции [67], нами была выбрана модель донор-реципиент для оценки параметров оогенеза и эмбриогенеза, а также плоидности полученных эмбрионов.

При сравнении эффективности использования витрифицированных и нативных ооцитов донора, важной составляющей успеха программ ЭКО является применение нативных яйцеклеток. Данный факт подтверждает сразу несколько крупных исследований. Так, согласно работе Eaton и соавторов было проанализировано 36925 циклов ЭКО, использование витрифицированных ооцитов ассоциировалось с более низкими показателями живорождения при сравнении с применением нативных яйцеклеток (39,6% против 47,7%) [72]. В нашем исследовании при оценке эффективности проведения программ ВРТ с использованием витрифицированных и нативных ооцитов было также показано, что частота наступления беременности, частота клинической беременности и частота живорождения статистически значимо выше в группе с нативными ооцитами. Так частота наступления беременности

в I группе составила 52,9%, в Ia группе 31,5% ($p < 0,05$); частота клинической беременности (52,9% по сравнению с 28,9%, ($p < 0,05$)), частота живорождения в I группе составила 44,4 %, в Ia группе- 26,3 % ($p < 0,05$).

Учитывая одинаковую компетенцию ооцитов, полученных при стимуляции как в фолликулярной, так и в лютеиновой фазах цикла, донорам ооцитов возможно проведение стимуляции яичников в лютеиновой фазе цикла при необходимости отложенного старта стимуляции функции яичников для синхронизации с реципиентами, с последующей возможностью оплодотворения свежих ооцитов и переносом нативных эмбрионов.

Так в ретроспективном когортном исследовании с использованием нативных ооцитов донора проведено сравнение переноса эмбрионов, не подвергнутых витрификации, и переносом эмбрионов после витрификации, было показано, что перенос эмбрионов в свежем цикле статистически значимо связан с более высокими показателями клинической беременности (66,7% против 54,2%) [73].

В нашем исследовании, в связи с тем, что все доноры были анонимными, полной синхронизация циклов между донорами и реципиентами не проводилось, и полученные эмбрионы были витрифицированы для последующего переноса в криоцикле.

Циклы донор-реципиент имеют высокую частоту наступления беременности, в связи с тем, что использование ооцитов данной когорты женщин компенсирует снижение эффективности протоколов ЭКО из-за высокого уровня анеуплоидии у эмбрионов, характерного пациенткам со снижением овариального резерва и пациенткам позднего репродуктивного возраста независимо от овариального резерва [74].

По данным многоцентрового исследования, частота эуплоидии среди доноров ооцитов составляет от 39,5 до 82,5%, что может быть результатом ятрогенного воздействия [75]. С другой стороны, получены данные, опровергающие влияние дозы гонадотропинов, продолжительность стимуляции, количество полученных ооцитов, пиковые уровни эстрадиола на

наличие анеуплоидии [76]. Однако влияние времени начала стимуляции яичников на эуплоидность эмбриона менее ясно. В большинстве исследований участвуют пациенты с бедным ответом [77], поэтому целью нашего исследования также являлась оценка влияния стимуляции яичников в лютеиновой фазе на уровень эуплоидии в циклах донор-реципиент.

Нами изучено влияние фазы стимуляции функции яичников на плоидность эмбрионов, полученных из ооцитов, извлеченных в лютеиновую фазу цикла у доноров яйцеклеток, для этого мы провели ПГТ-А эмбрионов, полученных в результате оплодотворения ооцитов, пунктированных в разные фазы менструального цикла.

Исходя из полученных данных, нами сделан вывод о том, что стимуляция функции яичников в лютеиновую фазу цикла у доноров ооцитов не оказывает негативного влияния на параметры оогенеза, что подтверждается сопоставимым числом полученных и зрелых ооцитов. Овариальная стимуляция в фолликулярной и в лютеиновой фазах у доноров приводит к сопоставимым показателям раннего эмбриогенеза у реципиентов, независимо от фазы получения ооцитов, что подтверждается сопоставимым числом нормально оплодотворившихся ооцитов, бластоцист высокого качества, а также эуплоидных бластоцист.

Согласно данным литературы, были единичные исследования, в которых сравнивали результаты эмбриологии в программе донор-реципиент. Среди них исследование, в которое вошли 9 доноров, вступавшие в овариальную стимуляцию на первом этапе начиная со 2-го дня менструального цикла, а затем, через 3 месяца с 15-го дня менструального цикла. Авторы не обнаружили статистически значимой разницы в частоте оплодотворения, количестве перенесенных эмбрионов и частоте наступления беременности между реципиентами, использовавших ооциты, полученные при овариальной стимуляции со 2-го дня менструального цикла или с 15-го [10]. Частота наступления клинической беременности у реципиентов

составила 62,5% против 58,3%, статистически значимой разницы выявлено не было [10].

Наши данные согласуются с данным исследованием, мы так же как и Martinez с коллегами [10], не обнаружили каких-либо различий в эффективности проведенных программ ЭКО, так частота клинической беременностей составила 52,9 % (фолликулярная фаза) и 51 % (лютеиновая фаза), соответственно ($p > 0,05$).

В крупном ретроспективном исследовании, включавшем пациенток с нормальным овариальным резервом, авторы продемонстрировали сопоставимую частоту наступления беременности и неонатальных исходов при стимуляции как в фолликулярной, так в лютеиновой фазах менструального цикла [78].

Кроме того, в проспективном когортном исследовании стимуляция в лютеиновую фазу менструального цикла применялась у женщин с нормальным овариальным резервом, проходящих программу ЭКО, и было показано, что данная тактика высоко эффективна для получения ооцитов и эмбрионов хорошего качества с оптимальными исходами беременности в криоциклах. У всех участников исследования удалось получить ооциты, и у большинства из них были эмбрионы хорошего качества для криоконсервации с частотой наступления клинической беременности после первого криопереноса 59% [33].

Таким образом, нами сделан вывод, что фаза цикла, в которую проведена овариальная стимуляция, не влияет на параметры эффективности программы ЭКО в обеих группах реципиентов, что подтверждается сопоставимой частотой наступления беременности, частотой наступления клинической беременности, частотой прогрессирующей беременности и частоты живорождения.

Половина доноров из каждой группы проходили 3D - эхографию в день предполагаемого введения триггера овуляции. И решение о введении триггера овуляции у 15 доноров из А группы и 15 доноров из В группы было основано

на данных 3D - эхографии, у другой половины доноров решение о дне введения триггера овуляции было основано на данных 2D - эхографии.

При сравнении двух методов визуализации фолликулов с помощью программы SonoAVC по среднему диаметру при двухмерном измерении и по диаметру объема (dV) в трехмерном измерении в условиях мультифолликулярного роста использование 3D-объемной эхографии обладает более высокой диагностической точностью и объективностью при проведении фолликулометрии, длительность стимуляции в группе 3D-эхографии была длиннее на 1 день и сопровождалась статистически значимым увеличением количества зрелых (MII) ооцитов, полученных в день ТВП (в I группе 12,5 (4,9), во II группе 15,4 (5,2) (р 0,04)), что позволяет получить большее количество зрелых ооцитов.

В исследовании Lamazou и коллег, [52] при обследовании 100 женщин, проходящих программу ЭКО после 5 и более дней стимуляции, разница результатов измерений с помощью программы SonoAVC по среднему диаметру при двухмерном измерении и по диаметру объема (dV) в трехмерном измерении фолликулов в категориях 14-17 и более 18 мм составила более 1 мм. С увеличением размеров фолликулов различия в результатах становились более существенными. Тем не менее, Ata и соавторы [53] предполагают низкую вероятность того, что описанные различия влияют на клинический исход. Deutch и соавторы [54], исследовавшие 347 фолликулов 14 женщин, проходящих овариальную стимуляцию, обнаружили наилучшую корреляцию измерений ($r=0,99$) по среднему диаметру фолликула вручную и по dV методом SonoAVC. В исследовании Deb и коллег [55] методом SonoAVC удалось визуализировать фолликулы диаметром 1 – 2 мм, тогда как при двумерной эхографии не удается обнаружить ни одного фолликула с такими параметрами. Это различие, скорее всего, отражает пределы разрешения 2D-эхографии и, также, может объясняться его большей субъективностью. Наименьшее сходство двух методов наблюдалось в категории антральных фолликулов диаметром 3,0 – 4,99 мм.

Полученные данные демонстрируют, что стимуляция как в фолликулярной, так и лютеиновой фазах менструального цикла может быть применена для синхронизации циклов донор-реципиент. Также важным аспектом является возможность проведения овариальной стимуляции у доноров ооцитов в любой день менструального цикла, когда с одной стороны ставится задача получить больше качественных ооцитов, с другой – сокращается временной период ожидания вступления донора в программу ЭКО. Полученные результаты вносят вклад в изучение проведения овариальной стимуляции в любую фазу менструального цикла для разных групп пациенток. Так, учитывая высокую значимость экстренного проведения программы ЭКО для онкологических пациентов в связи с отсутствием времени для ожидания «оптимальных» условий начала программы, возможность овариальной стимуляции яичников в лютеиновую фазу менструального цикла для многих из них может стать последним шансом сохранения генетического материала до начала лечения основного заболевания. Кроме того, возможность проведения программы ЭКО с началом стимуляции, независимо от фазы цикла, и применение двойной стимуляции дает возможность женщинам со сниженным овариальным резервом получить более высокие результаты. Актуально также экстренное сохранение генетического материала пациентам при планировании оперативных вмешательств на органах малого таза.

Несмотря на то, что овариальная стимуляция в лютеиновую фазу цикла у доноров ооцитов имеет значимые отличия по гормональному профилю от овариальной стимуляции в фолликулярную фазу менструального цикла, нами сделан вывод о том, что данная методика позволяет обеспечить гормональный профиль и параметры фолликулогенеза, сопоставимые с таковыми при стимуляции в фолликулярную фазу цикла. Выявленные особенности не оказывают негативного влияния на овариальный ответ, параметры фолликуло- и оогенеза, и в результате – получение «качественных» донорских ооцитов.

Ооциты, полученные как в фолликулярную, так и в лютеиновую фазы, приводят к сопоставимой частоте получения эуплодных бластоцист, что свидетельствует о сопоставимой компетенции ооцитов независимо от фазы.

Данное исследование показало, что методика оплодотворения нативных ооцитов донора спермой партнера реципиента с последующей криоконсервацией эмбриона и переносом размороженного эмбриона в криоцикле, является более эффективной относительно частоты наступления беременности и живорождения.

Полученные данные продемонстрировали, что использование 3D – эхографии обладает большей информативностью для выбора дня введения триггера овуляции, что отражается в большем числе зрелых ооцитов (MII) в день трансвагинальной пункции.

Таким образом, данное исследование наглядно продемонстрировало неуклонный рост необходимости использования ооцитов донора в программах ВРТ. Эффективность программ донор-реципиент высока и не зависит от фазы цикла, в которую проводилась овариальная стимуляция. Возможные пути повышения эффективности программ донор-реципиент связаны с началом овариальной стимуляции вне зависимости от фазы цикла, использованием трехмерной эхографии и применением нативных ооцитов донора.

ВЫВОДЫ

1. Тенденция увеличения числа пациентов позднего репродуктивного возраста с 23% до 38,8% в течение трех лет в программах вспомогательных репродуктивных технологий, обуславливает повышение востребованности в применении ооцитов донора.
2. Стимуляция яичников у доноров ооцитов в фолликулярную и лютеиновую фазы менструального цикла характеризуется сопоставимыми результатами: количеству полученных ооцитов в I группе 15,9 (6,4) во II группе- 18,5(7,6) ($p>0,05$), зрелых ооцитов 13,0 (5,6) и 14,2 (6,8) соответственно ($p>0,05$), количеству нормально оплодотворенных ооцитов 11,0 (4,4) и 12,2 (5,3) ($p>0,05$) соответственно, числу криоконсервированных эмбрионов в I группе 6,5 (3,9), во II группе- 7,5 (3,4) ($p>0,05$).
3. При овариальной стимуляции в лютеиновой фазе менструального цикла не происходит преждевременного пика лютеинизирующего гормона: в I группе - 0,5 (0,2; 1) МЕ/л, во II группе-0,3 (0,2; 0,5) МЕ/л, что может быть связано с протективным влиянием прогестерона, продуцируемого желтым телом, в то же время высокие уровни прогестерона в сыворотке крови при стимуляции в лютеиновую фазу цикла не оказывают негативного влияния на качество получаемых ооцитов.
4. Донорские ооциты, полученные как в фолликулярную, так и в лютеиновую фазы, приводят к сопоставимой частоте получения эуплоидных blastocyst у реципиентов: доля эуплоидных blastocyst/донированный ооцит I группе составила 30,4 %, во II группе - 31,8 % ($p >0,05$).
5. Использование 3D-объемной эхографии обладает более высокой диагностической точностью и объективностью при проведении фолликулометрии, длительность стимуляции в группе 3D-эхографии была длиннее на 1 день и сопровождалась статистически значимым увеличением количества зрелых (MII) ооцитов, полученных в день ТВП (в А группе 12,5 (4,9), во В группе - 15,4 (5,2) ($p=0,04$)).

6. Эффективность проведения овариальной стимуляции в разные фазы менструального цикла в рамках программы донор-реципиент сопоставима и не зависит от фазы, в которой были получены донированные ооциты: так частота наступления беременности в I группе составила 52,9%, во II группе - 51% ($p>0,05$); частота клинической беременности (52,9% по сравнению с 51%, $p>0,05$), частота ранних репродуктивных потерь (10,5 % по сравнению с 4,2 %, $p>0,05$), частота живорождения - 44,4 % и 48,9 % соответственно ($p>0,05$).

7. При оценке эффективности проведения программ ВРТ с использованием витрифицированных и нативных ооцитов было выявлено, что частота наступления беременности, частота клинической беременности и частота живорождения статистически значимо выше в группе с нативными ооцитами. Так, частота наступления беременности в I группе составила 52,9%, против Ia группы - 31,5% ($p<0,05$); частота клинической беременности 52,9% по сравнению с 28,9%, ($p<0,05$), частота живорождения 44,4 % и 26,3 % соответственно ($p<0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Донорам ооцитов возможно проведение овариальной стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла при необходимости отложенного старта программы ЭКО с целью синхронизации с реципиентами.
2. При проведении овариальной стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла следует назначать гестагены при достижении доминантных фолликулов 13-14 мм для блокирования менструальноподобной реакции, что способствует комфорту пациентки.
3. В условиях мультифолликулярного роста, использование 3D-объемной эхографии обладает более высокой диагностической точностью и объективностью при проведении фолликулометрии, что позволяет получить большее количество зрелых ооцитов.
4. При проведении программ ВРТ с донорским генетическим материалом, использование ооцитов, полученных в нативном цикле, повышает эффективность программы по сравнению с витрифицированными ооцитами.
5. Перспективным для клинического применения является протокол оплодотворения нативных ооцитов донора, полученных в программе ЭКО, спермой партнера реципиента, криоконсервация полученных эмбрионов с последующим переносом в полость матки женщине – реципиенту.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

аГнРГ – агонисты гонадотропин-релизинг гормона

АМГ – антимюллеров гормон

антГнРГ – антагонисты гонадотропин-релизинг гормона

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ГнРГ - гонадотропин-релизинг гормона

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДО – ооциты донора

Е2 – эстрадиол

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит

ИМТ – индекс массы тела

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

КАФ – количество антральных фолликулов

КИО – контролируемая индукция овуляции

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ПГТ-А – преимплантационное генетическое тестирование на анеуплодии

ПНЯ – преждевременная недостаточность яичников

рФСГ – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон

СПКЯ – синдром поликистозных яичников

ТВП – трансвагинальная пункция

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЧМГ – человеческий менопаузальный гонадотропин

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smajdor, A. The ethics of egg donation in the over fifties / A. Smajdor // *Menopause Int.* -2008.- Vol.14, N 4. - P.173–177.
2. Payne, M.R. The use of expanded carrier screening of gamete donors / M. R. Payne, A. B. Skytte, J. C. Harper J.C. // *Human Reproduction.* - 2021. - Vol. 36, N 6. - P.1702–1710.
3. Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years / C. C. Chang, T. A. Elliott, G. Wright [et al.] // *Fertility Sterility.* - 2013. - Vol.99, N 7. - P.1891–1897.
4. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance / L. Rienzi, C. Gracia, R. Maggiulli [et al.] // *Human Reproduction Update.* - 2017. - Vol. 23, N 2. - P. 139–155.
5. Edgar, D.H. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos / D.H. Edgar, D. A. Gook // *Human Reproduction Update.* - 2012. - Vol. 18, N 5. - P.536–554.
6. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial / A. Cobo, M. Meseguer, J. Remohí [et al.] // *Human Reproduction.* - 2010. - Vol. 25, N 9. - P.2239–2246.
7. Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy / K. Oktay, A. Hourvitz, G. Sahin [et al.] // *J Clinical Endocrinology Metabolism.* - 2006. - Vol.91, N 10. - P.3885–3890.
8. Oktay, K. GnRH agonist trigger for women with breast cancer undergoing fertility preservation by aromatase inhibitor/FSH stimulation / K. Oktay, I. Türkçüoğlu, K. A. Rodriguez-Wallberg // *Reproduction Biomed Online.* - 2010. - Vol. 20, N 6. - P.783–788.
9. Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase / M. von Wolff, C. J. Thaler, T. Frambach [et al.] //

Fertility Sterility. - 2009. - Vol. 92, N 4. - P.1360–1365.

10. Comparison of starting ovarian stimulation on day 2 versus day 15 of the menstrual cycle in the same oocyte donor and pregnancy rates among the corresponding recipients of vitrified oocytes / F. Martínez, E. Clua, M. Devesa [et al.] // Fertility Sterility. - 2014. - Vol. 102, N 5. - P.1307–1311.

11. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes / F. Pellestor, B. Andréo, F. Arnal [et al.] // J. Human Genetic. - 2003. - Vol. 112, N 2. - P.195–203.

12. New national outcome data on fresh versus cryopreserved donor oocytes / V. A.Kushnir, S. K. Darmon, D. H. Barad [et al.] // J Ovarian Res. -2018. - Vol. 11, N 1. - P.2.

13. Краснопольская К.В., Назаренко Т.А. Клинические аспекты лечения бесплодия в браке. Диагностика и терапевтические программы с использованием методов восстановления естественной фертильности и вспомогательных репродуктивных технологий. - ГЭОТАР-Медиа.- 2013.- 376 С.

14.The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure / P. Lutjen , A. Trounson, J. Leeton [et al.] // Nature. - 1984. - Vol. 307(5947). - P.174–175.

15.Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking / Z. P. Nagy, C. -C. Chang, D. B. Shapiro [et al.] // Fertility Sterility. - 2009. - Vol. 92, N 2. - P.520–526.

16.Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration / A. Borini, R. Sciajno, V. Bianchi [et al.] // Human Reproduction. - 2006. - Vol. 21, N 2. - P.512–517.

17.Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method / A.Cobo, M. Kuwayama, S. Pérez [et al.] // Fertility Sterility. - 2008. - Vol. 89, N 6. - P.1657–1664.

18.Borini, A. The efficacy and safety of human oocyte cryopreservation by

slow cooling / A. Borini, G. Coticchio // *Semin Reproduction Medicine*. - 2009. - Vol. 27, N 6. - P.443–449.

19.Oocyte cryopreservation for donor egg banking / A. Cobo, J. Remohí, C. - C. Chang [et al.] // *Reproduction Biomed Online*. - 2011. - Vol. 23, N 3. - P.341–346.

20.Levi-Setti, P.E. Evolution of human oocyte cryopreservation: slow freezing versus vitrification / P.E. Levi-Setti, P. Patrizio, G. Scaravelli // *Curr Opin Endocrinology Diabetes Obes*. - 2016. - Vol. 23, N 6. - P.445–450.

21.Clark, N.A. Oocyte cryopreservation: searching for novel improvement strategies / N. A. Clark, J. E. Swain // *J Assist Reproduction Genetic*. - 2013. - Vol. 30, N 7. - P. 865–875.

22.The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation / M. Meseguer, J. Herrero, A. Tejera [et al.] // *Human Reproduction*. - 2011. - Vp. 26, N 10. - P. 2658–2671.

23. Morphokinetic evaluation of embryos generated from vitrified oocytes maintaining the meiotic spindle / L. Heydari, M. A. Khalili, E. Mangoli [et al.] // *Cryobiology*. - 2021. - Vol. 100. - P.40–45.

24.Successful elective and medically indicated oocyte vitrification and warming for autologous in vitro fertilization, with predicted birth probabilities for fertility preservation according to number of cryopreserved oocytes and age at retrieval / J. O. Doyle, K. S. Richter, J. Lim [et al.] // *Fertility Sterility*. - 2016. - Vol. 105, N 2. - P.459 4-66.e2.

25. Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes / A. Cobo, V. Serra, N. Garrido [et al.] // *Fertility Sterility*. - 2014. - Vol. 102, N 4. - P.1006-1015.e4.

26. Six-year follow-up of children born from vitrified oocytes / Y. Takeshige, M. Takahashi, T. Hashimoto [et al.] // *Reproduction Biomed Online*. - 2021. -Vol. 42, N 3. - P.564–571.

27. Gougeon, A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results / A. Gougeon // *Human Reproduction*. - 1986. - Vol. 1,N 2. -

P.81–87.

28.Baerwald, A.R. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review / A. R. Baerwald, G. P. Adams, R.A. Pierson // *Human Reproduction Update*. -Vol. 18, N 1. - P.73–91.

29. Baerwald, A.R. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women / A.R. Baerwald, G. P. Adams, R. A. Pierson // *Biology Reproduction*. - 2003. - Vol. 69, N 3. - P. 1023–1031.

30.Review: follicular waves in the human ovary: a new physiological paradigm for novel ovarian stimulation protocols / P. H. de Mello Bianchi, P. Serafini, A. Monteiro da Rocha [et al.] // *Reproduction Sci*. - 2010. - Vol. 17, N 12. - P.1067–1076.

31.Ovarian stimulation during the luteal phase for fertility preservation of cancer patients: case reports and review of the literature / G. M. Bedoschi, F. O. de Albuquerque, R. A. Ferriani [et al.] // *J Assist Reproduction Genetic*. - 2010. - Vol. 27, N 8. - P.491–494.

32.Sönmezer, M. Random-start controlled ovarian hyperstimulation for emergency fertility preservation in letrozole cycles / M. Sönmezer, I. Türkçüoğlu, U. Coşkun [et al.] // *Fertility Sterility*. -2011. - Vol. 95, N 6. - P.2125.e9-11.

33.Luteal-phase ovarian stimulation is feasible for producing competent oocytes in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment, with optimal pregnancy outcomes in frozen-thawed embryo transfer cycles / Y. Kuang, Q. Hong, Q. Chen [et al.] // *Fertility Sterility*. - 2014. - Vol. 101, N 1. - P.105–111.

34.Randomized controlled pilot trial of luteal phase recombinant FSH stimulation in poor responders / S. K.Kalra, S. Ratcliffe, C. R. Gracia [et al.] // *Reproduction Biomed Online*. - 2008. - Vol. 17, N 6. - P.745–750.

35.Double stimulations during the follicular and luteal phases of poor responders in IVF/ICSI programmes (Shanghai protocol) / Y. Kuang, Q. Chen, Q. Hong [et al.] // *Reproduction Biomed Online*. - 2014. -Vol. 29, N 6. - P. 684–691.

36.Sonographic monitoring of ovarian follicular development / A. C.

Fleischer, J. F. Daniell, J. Rodier [et al.] // J Clinical Ultrasound. -Vol.9, N 6. - P.275–280.

37.Ultrasonics of ovarian changes under gonadotrophine stimulation (author's transl)] / B. J. Hackelöer, S. Nitschke, E. Daume[et al.] // Geburtshilfe Frauenheilkd. - 1977. - Vol. 37, N 3. - P.185–190.

38.Gore, M.A. Prediction of ovarian cycle outcome by follicular characteristics, stage 1 / M.A. Gore, P. L. Nayudu, V. Vlaisavljevic, N. Thomas // Human Reproduction. - 1995. - Vol. 10, N 9. - P.2313–2319.

39.Core, M.A.Attaining dominance in vivo: distinguishing dominant from challenger follicles in humans / M. A. Gore, P. L. Nayudu, V. Vlaisavljevic // Human Reproduction. - 1997. - Vol. 12, N 12. - P.2741–2747.

40.Оценка эффективности эхографических методов диагностики в программах экстракорпорального оплодотворения / В. С. Лапина, А. Н. Абубакиров, Н. Г. Мишиева [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2017. - N3. - С.19–24.

41.Ovarian stimulation monitoring: past, present and perspectives // S. Salama,A. Torre, B. Paillusson [et.al.] // Gynecology Obstetrics Fertility. - 2011. - Vol.39, N 4. - P.245–254.

42.Transvaginal three-dimensional ultrasound: accuracy of follicular volume measurements / A. Kyei-Mensah, J. Zaidi, R. Pittrof [et al.] // Fertility Sterility. - 1996. - Vol. 65, N 2. - P.371–376.

43.Lass, A.The role of ovarian volume in reproductive medicine / A. Lass, P.Brinsden // Human Reproduction Update. - Vol. 5, N 3. - P.256–266.

44.Intracycle variation in number of antral follicles stratified by size and in endocrine markers of ovarian reserve in women with normal ovulatory menstrual cycles / S. Deb, B. K. Campbell, J. S. Clewes [et al.] // Ultrasound Obstetrics Gynecology. - 2013. - Vol. 41, N 2. - P.216–222.

45. Intraobserver and interobserver reproducibility of ovarian volume, antral follicle count, and vascularity indices obtained with transvaginal 3-dimensional ultrasonography, power Doppler angiography, and the virtual organ computer-aided

analysis imaging pr / L. T. Mercé, B.. Gómez, V. Engels [et al.] // J Ultrasound Medicine. - 2005. - Vol. 24, N 9. - P.1279–1287.

46.Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in-vitro fertilization can predict poor response / A. Lass, J. Skull, E. McVeigh [et al.] // Human Reproduction. -1997. - Vol. 12, N 2. - P.294–297.

47.Kupesic, S. Predictors of IVF outcome by three-dimensional ultrasound / S. Kupesic, A. Kurjak // Human Reproduction. - 2002.- Vol. 17, N 4. - P.950–955.

48.Intraobserver and interobserver reliability of automated antral follicle counts made using three-dimensional ultrasound and SonoAVC / S. Deb, K. Jayaprakasan, B. K. Campbell [et al.] // J. Ultrasound Obstetrics Gynecology. - 2009. - Vol. 33, N4. - P.477–483.

49.The interovarian variation in three-dimensional ultrasound markers of ovarian reserve in women undergoing baseline investigation for subfertility /S. Deb, J. Kannamannadiar, B. K. Campbell [et al.] // Fertility Sterility. -2011. - Vol. 95, N2. - P.667–672.

50.Ata, B. Ultrasound automated volume calculation in reproduction and in pregnancy / B. Ata, T. Tulandi // Fertility Sterility. - 2011. - Vpl. 95, N 7. - P.2163–2170.

51.Automated follicle tracking improves measurement reliability in patients undergoing ovarian stimulation / N. Raine-Fenning K. Jayaprakasan, S. Deb [et al.] // Reproduction Biomed Online. - 2009. -Vol. 18, N 5. - P.658–663.

52.Reliability of automated volumetric measurement of multiple growing follicles in controlled ovarian hyperstimulation / F. Lamazou, E. Arbo, S. Salama [et al.] // Fertility Sterility. - 2010. - Vol. 94, N 6. - P.2172–2176.

53.Comparison of automated and manual follicle monitoring in an unrestricted population of 100 women undergoing controlled ovarian stimulation for IVF / B. Ata, A. Seyhan, S. L. Reinblatt [et al.] // Human Reproduction. - 2011. - Vol. 26, N 1. - P.127–133.

54.Automated assessment of ovarian follicles using a novel three-dimensional

ultrasound software / T.D. Deutch, I. Joergner, D.O. Matson [et al.] // Fertility Sterility. - 2009. - Vol. 92, N 5. - P.1562–1568.

55.Quantitative analysis of antral follicle number and size: a comparison of two-dimensional and automated three-dimensional ultrasound techniques/ S. Deb , B. K. Campbell, J. S. Clewes [et al.] // Ultrasound Obstetrics Gynecology. - 2010. - Vol. 35, N 3. - P.354–360.

56.Prospective evaluation of automated follicle monitoring in 58 in vitro fertilization cycles: follicular volume as a new indicator of oocyte maturity. / A. Rodríguez-Fuentes, J. Hernández, R. García-Guzman [et al.] // Fertility Sterility. - 2010. -Vol. 93,N 2. - P.616–620.

57.Timing of oocyte maturation and egg collection during controlled ovarian stimulation: a randomized controlled trial evaluating manual and automated measurements of follicle diameter / N. Raine-Fenning, S. Deb, K. Jayaprakasan [et al.] // Fertility Sterility. - 2010. -Vol. 94, N 1. - P.184–188.

58.Повышение эффективности программ ЭКО на основании определения копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов /А. И. Королькова, Н. Г. Мишиева, Б. А. Мартазанова [и др.] // |Акушерство и гинекология. - 2019. - N 3. - С. 98–104.

59.Prospective evaluation of automated follicle monitoring in 58 in vitro fertilization cycles: follicular volume as a new indicator of oocyte maturity./ A. Rodríguez-Fuentes, J. Hernández, R. García-Guzman [et al.] // Fertility Sterility. - 2010. - Vol. 93, N 2. - P. 616–620.

60.Interests, obligations, and rights in gamete and embryo donation: an Ethics Committee opinion / J. Daar, L. Collins, J. Davis [et al.] // Fertility Sterility. - 2019. - Vol. 111, N 4. - P.664–670.

61.Colaco, S.Paternal factors contributing to embryo quality/ S. Colaco, D. Sakkas // J Assist Reprodrcyion Genetic. - 2018. - Vol. 35, N 11. - P.1953–1968.

62. Meiosis and maternal aging: insights from aneuploid oocytes and trisomy births / M. Herbert, D. Kalleas,D. Cooney [et al.] // Cold Spring Harb Perspect Biology. - 2015. - Vol. 7, N 4. -a017970.

63.Oocyte development, meiosis and aneuploidy / M. MacLennan, J. H. Crichton, C. J. Playfoot [et al.] // *Semin Cell Dev Biol.* - 2015. - Vol. 45. - P.68–76.

64.Next generation sequencing for preimplantation genetic testing of blastocysts aneuploidies in women of different ages / K. Lukaszuk, G.Jakiel, W.Kuczynski [et al.]// *Ann Agric Environ Medicine.* - 2016. - Vol. 23, N 1. - P.163–166.

65.Gardner, D.K. Culture and transfer of human blastocysts / D. K. Gardner,W. B. Schoolcraft // *Curr Opin Obstetrics Gynecology.* - 1999. - Vol. 11, N 3. - P.307–311.

66. Cumulus cell gene expression in luteal-phase-derived oocytes after double stimulation in one menstrual cycle / N. Mishieva, B. Martazanova, K. Bogatyreva [et al.] // *Reproduction Biomed Online.* - 2020. - Vol. 41, N 3. - P.518–526.

67.Ovarian stimulation for oocyte donation: a systematic review and meta-analysis / F. Martinez, A. Racca, I. Rodríguez [et al.] // *Human Reproduction Update.* - 2021. - Vol. 27, N 4. - P.673–696.

68.Luteal-phase ovarian stimulation is a feasible method for poor ovarian responders undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer treatment compared to a GnRH antagonist protocol: A retrospective study / L. -H. Wei, W.-H. Ma, N. Tang [et al.] // *J Obstetrics Gynecology.* - 2016. - Vol. 55, N 1. - P.50–54.

69.The predictive accuracy of anti-Müllerian hormone for live birth after assisted conception: a systematic review and meta-analysis of the literature / S. Iliodromiti, T. W. Kelsey, O. Wu [et al.] // *Human Reproduction Update.* - Vol. 20, N 4. - P.560–570.

70. Luteal phase stimulation, the future of fertility preservation? Retrospective cohort study of luteal phase versus follicular phase stimulation. / F. Jochum, N. Sananès, M. Teletin [et al.] // *Gynecology Obstetrics Human Reproduction.* - 2019. -Vol. 48, N 2. - P.91–94.

71.The euploid blastocysts obtained after luteal phase stimulation show the

same clinical, obstetric and perinatal outcomes as follicular phase stimulation-derived ones: a multicenter study / A. Vaiarelli, D. Cimadomo, E. Alviggi [et al.] // *Human Reproduction*. - 2020. - Vol. 35, N 11. - P. 2598–2608.

72.Prevalence of a Good Perinatal Outcome With Cryopreserved Compared With Fresh Donor Oocytes / J. L. Eaton, T. Truong, Y.-J. Li [et al.] // *J. Obstetrics Gynecology*. - 2020. - Vol. 135, N 3. - P.709–716.

73.Association of Fresh Embryo Transfers Compared With Cryopreserved-Thawed Embryo Transfers With Live Birth Rate Among Women Undergoing Assisted Reproduction Using Freshly Retrieved Donor Oocytes. / I. G. Insogna, A. Lanes, M. S. Lee [et al.] // *JAMA*. -2021. - Vol. 325, N2. - P.156–163.

74.Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes / M. Tsutsumi, R. Fujiwara, H. Nishizawa [et al.] // *PLoS One*. - 2014. -Vol.. 9, N 5. -e96710.

75.Euploidy rates in donor egg cycles significantly differ between fertility centers / S. Munné, M. Alikani, L.Ribustello [et al.] // *Human Reproduction*. - 2017. -Vol. 32, N 4. - P.743–749.

76.No effect of ovarian stimulation and oocyte yield on euploidy and live birth rates: an analysis of 12 298 trophectoderm biopsies / M. Irani, C. Canon, A. Robles [et al.] // *Human Reproduction*. - 2020. - Vol. 35, N 5. - P.1082–1089.

77.Follicular versus luteal phase ovarian stimulation during the same menstrual cycle (DuoStim) in a reduced ovarian reserve population results in a similar euploid blastocyst formation rate: new insight in ovarian reserve exploitation / F. M. Ubaldi, A. Capalbo, A. Vaiarelli [et al.] / *Fertility Sterility*.- 2016.-Vol.105,N 6. - P.1488-1495.e1.

78.Luteal-phase ovarian stimulation vs conventional ovarian stimulation in patients with normal ovarian reserve treated for IVF: a large retrospective cohort study / N. Wang, Y. Wang, Q. Chen [et al.] // *Clinical Endocrinology (Oxf)*. - 2016.-Vol. 84, N 5.-P. 720–728.