МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

МОСКОВСКИЙ ОБЛАСТНОЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ АКУШЕРСТВА И ГИНЕКОЛОГИИ ИМ. АКАДЕМИКА В.И. КРАСНОПОЛЬСКОГО

На правах рукописи

Самойлова Анастасия Александровна

ИСХОДЫ ПРОГРАММ ЭКО ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОМ ПОДХОДЕ К ЭТАПУ РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

3.1.4. Акушерство и гинекология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

член-корр. РАН, профессор, д.м.н.

Краснопольская К.В.

Москва – 2025 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ **5**

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 15

1.1. Актуальные вопросы бесплодного брака 15

1.2. Программы ВРТ у пациенток разных групп 25

1.3. Программы ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации 29

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 32

2.1. Материалы исследования 32

2.2. Методы исследования 42

2.3. Ведение пациенток в программах ЭКО 45

2.3.1. Стандартная программа ЭКО 45

2.4. Методы статистического анализа 49

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 50

3.1. Клинико-анамнестические данные и лабораторные параметры пациенток, прошедших программу ЭКО и включённых в исследование ... 51

3.2. Анализ параметров циклов стимуляции суперовуляции. 60

3.3. Анализ параметров этапа раннего эмбриогенеза в зависимости от способа культивирования 61

3.4. Анализ частоты наступления беременности и ранних репродуктивных потерь в представленных когортах пациентов в зависимости от способа культивирования эмбрионов 66

3.5. Анализ результатов ПГТ-А в зависимости от способа культивирования эмбрионов и возраста пациентов 69

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 73

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 84

ВЫВОДЫ **86**

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ **88**

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ **89**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМГ – антимюллеров гормон

АТ-ТГ – антитела к тиреоглобулину

АТ-ТПО – антитела к тиреопероксидазе

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

ИМТ – индекс массы тела

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ПГД – преимплантационная генетическая диагностика

ПГТ-А – преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидию

ПНИ – повторные неудачи имплантации

ПЭ – перенос эмбриона

РАРЧ – Российская Ассоциация Репродукции Человека

рФСГ – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон

$Т_3$ – трийодтиронин

$Т_4$ – тироксин

ТВП – трансвагинальная пункция

ТТГ – тиреотропный гормон

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ХЭ – хронический эндометрит

чМГ – человеческий менопаузальный гормон

ЧНБ – частота наступления беременности

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

TLT – культивирование эмбрионов с применением Time-lapse технологий

TLM – Time-lapse-микроскопия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

С той поры, когда на свет появился первый ребёнок после ЭКО (в 1978 г. в Англии – Луиза Браун, а в России в 1988 г. – Лена Донцова), вспомогательные репродуктивные технологии стали занимать одно из ведущих мест в лечении бесплодия, также широко они используются для решения проблемы бесплодного брака [1,18]. Согласно статистике Российской Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ), ежегодно в Российской Федерации регистрируется свыше 165 000 циклов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), результатом которых является рождение более 36 000 детей. Показатель распространенности бесплодия в браке в России стабильно 15-20% без выраженной тенденции к снижению [1]. Наиболее эффективными в преодолении бесплодного брака считается рациональное использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Несмотря на накопленный опыт и оптимизацию протоколов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), эффективность имплантации эмбрионов при ЭКО остается в пределах 30-40%. При этом показатель частоты наступления клинической беременности (ЧНБ) в последние годы демонстрирует стабильность без существенной динамики. [1,79,80].

Стоит отметить, что в последние годы демографические тенденции претерпели существенные изменения и в мире, и Российской Федерации: на сегодняшний день подавляющее большинство женщин откладывают период деторождения на более поздний возрастной период: возраст первых родов составляет 31-32 года, следовательно, в период деторождения начинают вступать женщины, родившиеся в период «Русского креста» (1991 г.) [90]. Кроме этого, возрастной фактор вносит свой вклад в снижение рождаемости за счёт обратно пропорциональной связи между ЧНБ и наличием сопутствующих гинекологических и экстрагенитальных заболеваний, а также генетическими и акушерскими рисками во время вынашивания беременности (выкидыши, преждевременные роды, эклампсия) [20,21]. Многочисленные исследования

продемонстрировали значительное снижение ЧНБ с возрастом. В старшем репродуктивном возрасте отмечено резкое снижение овариального резерва, а, следовательно, и эффективности программ ЭКО: у женщин старше 36 лет данный показатель не превышает 20-25%, стремительно снижаясь с каждым годом после 40 лет [1,19,20,21]. Хирургические вмешательства на органах малого таза являются фактором, способствующим снижению овариального резерва. Это, в свою очередь, приводит к «бедному» ответу яичников на стимуляцию суперовуляции в рамках программ ВРТ, что влечет за собой значительное снижение эффективности программ ЭКО. [23]. ЧНБ коррелирует с количеством полученных ооцитов. Каждый дополнительный ооцит увеличивает вероятность положительного результата, женщины с «бедным» ответом яичников имеют более низкие шансы на зачатие по сравнению с женщинами с нормальным или высоким овариальным резервом даже после нескольких циклов ЭКО [24].

Одним из нерешённых вопросов являются повторные неудачи имплантации при использовании ВРТ, которые могут быть связаны с качеством переносимых эмбрионов. Низкое количество полученных ооцитов в циклах ЭКО коррелирует с повышенными рисками на этапе раннего эмбриогенеза. Это может привести к отсутствию эмбрионов высокого качества, подходящих для переноса, и, как следствие, к увеличению частоты «незавершенных циклов» ЭКО, характеризующихся отсутствием качественных эмбрионов на 5 сутки культивирования. Таким образом, у данных групп пациенток наибольшего внимания заслуживает этап раннего эмбриогенеза. В целом, к причинам отсутствия клинической беременности после трех и более неудачных переносов эмбрионов (ПЭ) в анамнезе относят старший возраст матери, различные болезни органов малого таза, в том числе матки, а также качество переносимых эмбрионов [22].

Известно, что около 80% зигот не развиваются до преимплантационной стадии, а также не все полученные бластоцисты имплантируются. В связи с

этим, все больше внимания уделяется этапу культивирования эмбрионов и выбору эмбриона для переноса.

Разработка воспроизводимых и эффективных критериев оценки эмбрионов, позволяющих с высокой точностью идентифицировать эмбрион с наибольшим имплантационным потенциалом, представляет собой одну из ключевых задач современной репродуктивной медицины и является приоритетным направлением научных исследований в данной области.

Селекция эмбрионов оптимального качества остается актуальной проблемой в практике ЭКО, поскольку критически важные этапы раннего эмбриогенеза протекают в условиях закрытой инкубационной системы, что ограничивает возможности прямого визуального мониторинга развития эмбриона.

Первоначальной доступной оценкой эмбриона была единственно возможная доступная морфологическая стратегия, предложенная Гарднером [3]. В Венском консенсусе (2017) были обозначены наиболее эффективные параметры оценки качества эмбриона [30]. Однако, для получения эмбрионов хорошего качества на 5 сутки, необходимо обеспечить оптимальные условия для их культивирования. Появление инкубатора нового типа со встроенной системой видеомониторирования позволяет анализировать динамические события в развитии эмбрионов – от оплодотворения до образования бластоцисты, что позволяет существенно повысить оценку качества эмбриона и спрогнозировать эффективность его имплантации в эндометрий [4].

Time-lapse-микроскопия (TLM), или покадровая микроскопия, внесла существенный вклад в повышение эффективности отбора эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом. Данная технология предоставляет возможность осуществлять непрерывный неинвазивный мониторинг развития эмбрионов в динамике с интервалом 5-10 минут, не нарушая оптимальных условий культивирования и исключая необходимость извлечения эмбрионов из инкубатора. Это позволяет проводить более детальную оценку морфокинетических параметров эмбрионального развития. [5-6].

Многие морфокинетические параметры эмбрионов, культивируемых в системе Time-lapse, оцениваются как биомаркеры оптимального отбора эмбрионов, в том числе для прогнозирования плоидного статуса эмбрионов [7].

Однако сохраняющиеся неудачи программ ЭКО требуют продолжения научного поиска биомаркеров, способных прогнозировать эмбриогенез для конкретных практических целей: выбора персонализированного метода ВРТ для лечения бесплодия у конкретной супружеской пары.

Степень разработанности темы исследования

К настоящему времени данные о результатах использования Time-lapse технологии остаются несистематизированными, по ряду позиций противоречивыми, базирующимися на неселективных выборках пациенток, разделенных исключительно по способу культивирования эмбрионов.

Таким образом, несмотря на многочисленные исследования, весьма актуальным остается поиск новых способов повышения результативности ЭКО, особенно у женщин старшего репродуктивного возраста, «бедного» ответа на стимуляцию.

Цель исследования

Повышение эффективности программ ВРТ с использованием системы Time-lapse в селективно отобранных клинических группах.

Задачи исследования

1. Сравнить эффективность программ ЭКО по показателям этапа раннего эмбриогенеза при использовании разных технологий культивирования у пациенток с хорошим прогнозом программ ЭКО, пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию, пациенток с повторными неудачами имплантации, пациенток позднего репродуктивного возраста.
2. Оценить эффективность программ ЭКО по частоте наступления беременности в зависимости от технологии культивирования полученных эмбрионов у пациенток с хорошим прогнозом программ ЭКО, пациенток с

«бедным» ответом на стимуляцию, пациенток с повторными неудачами имплантации, пациенток позднего репродуктивного возраста.

3. Сравнить частоту ранних репродуктивных потерь при культивировании в стандартных условиях и при применении Time-lapse системы у пациенток указанных групп

4. Определить наличие/отсутствие корреляционной связи между хромосомными аномалиями эмбрионов и их эмбриологическим развитием при культивировании в системе Time-lapse.

5. Определить наличие корреляционной зависимости плоидного статуса эмбриона и морфокинетической оценкой по шкале KIDScore D5, версия 4 в группе пациенток оптимального и старшего репродуктивного возраста

6. Разработать алгоритм использования системы Time-lapse в программах ВРТ

Научная новизна

Впервые на территории Российской Федерации реализовано исследование, посвященное сравнительной оценке эффективности различных технологий культивирования эмбрионов на селективно сформированных группах пациенток. Полученные результаты продемонстрировали преимущество Time-lapse технологии в повышении эффективности программ ЭКО у пациенток старшей репродуктивной возрастной группы и пациенток с «бедным» ответом яичников на стимуляцию суперовуляции. Впервые показано, что применение инкубатора с системой Time-lapse способствует возрастанию кумулятивной ЧНБ на каждый стимулированный цикл, хотя и не обеспечивает увеличения показателя ЧНБпэ при переносе эмбрионов в нативном цикле стимуляции. До настоящего момента отсутствовали исследования, посвященные оценке влияния культивирования эмбрионов с использованием Time-lapse технологии на кумулятивную частоту наступления беременности посредством потенциального увеличения числа эмбрионов высокого качества в селективно сформированных группах пациентов. Данный

подход может способствовать снижению частоты «незавершенных» циклов ЭКО и увеличить количество полученных эмбрионов высокого качества. Это, в свою очередь, позволит выполнить большее количество переносов эмбрионов в расчете на один цикл стимуляции суперовуляции за счет криоконсервации и последующего использования оставшихся эмбрионов. Впервые оценена корреляционная связь балльной оценки KIDScore D5 с частотой анеуплоидий у пациенток различных возрастных групп.

Теоретическая и практическая значимость работы

Оптимизация процесса культивирования эмбрионов с применением Time-lapse системы достоверно увеличивает частоту наступления и вынашивания беременности, особенно в группе пациенток старшего репродуктивного возраста и с наличием повторных неудачных попыток ЭКО.

Использование стандартных условий культивирования для пациенток молодого репродуктивного возраста с сохранным овариальным резервом и адекватным ответом на стимуляцию суперовуляции, не приводит к снижению частоты наступления беременности, одновременно позволяя оптимизировать финансовые затраты, связанные с применением Time-lapse технологии.

Методология и методы исследования

Исследовательская работа выполнена на базе ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. академика В.И. Краснопольского». Лечение бесплодия методом ВРТ выполнялась сотрудниками отделения репродуктологии ГБУЗ МО МОНИИАГ им. академика В.И. Краснопольского (руководитель – член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор Краснопольская К. В.).

Проведён ретроспективный анализ 2185 пациенток, проводивших программы ЭКО,

Когорта I – 671 пациентка с хорошим прогнозом программ ЭКО:

- группа 1 (n = 551) пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- группа 2 (n = 120) пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием инкубатора с Time-lapse системой

Когорта II – 457 пациенток с «бедным» ответом на гонадотропины в программах ЭКО:

- группа 3 (n = 374) пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- группа 4 (n = 83) пациентки у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием инкубатора с Time-lapse системой

Когорта III – 399 пациенток с повторными неудачами имплантации в программах ЭКО:

- группа 5 (n = 247) пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- группа 6 (n = 152) пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием инкубатора с Time-lapse системой

Когорта IV – 658 пациенток старшего репродуктивного возраста:

- группа 7 (n = 526) пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- группа 8 (n = 132) пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием инкубатора с Time-lapse системой.

Проведение настоящего исследования одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ МО МОНИИАГ до его начала (протокол № 9 от 23.11.2021 г.). Все испытуемые перед включением в исследование подписали информированное добровольное согласие на обработку их персональных данных в научных целях. Тема исследования утверждена на заседании учёного совета ГБУЗ МО МОНИИАГ от 23 ноября 2021 г. (протокол № 10.5).

Основные положения, выносимые на защиту

У пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию, пациенток старшего репродуктивного возраста культивирование эмбрионов с применением системы Time-lapse достоверно увеличивает число генерируемых бластоцист хорошего качества и достоверно снижает число «незавершенных» циклов. У пациенток в неселективной популяции, пациенток с хорошим прогнозом успеха программы ЭКО и женщин с повторными неудачами имплантации культивирование эмбрионов с применением системы Time-lapse, по сравнению со стандартными условиями культивирования, не улучшает параметры раннего эмбриогенеза по показателям оплодотворения, количеству генерируемых качественных бластоцист, «незавершенных» циклов.

2. Частота ранних репродуктивных потерь имеет тенденцию к снижению при культивировании эмбрионов с использованием системы Time-lapse у пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию суперовуляции. Культивирование эмбрионов с применением системы Time-lapse не приводит к снижению частоты ранних репродуктивных потерь у пациенток с хорошим прогнозом программ ЭКО, пациенток с повторными неудачами имплантации и женщин позднего репродуктивного возраста. Частота наступления беременности на перенос эмбриона достоверно не отличается во всех когортах, независимо от условий культивирования, несмотря на тенденцию к улучшению показателей имплантации в когорте пациенток с «бедным» ответом и в старшем репродуктивном возрасте при культивировании эмбрионов с использованием системы Time-lapse.

3. Использование искусственного интеллекта в инкубаторе с системой Time-lapse позволяет выявить у пациенток старшего репродуктивного возраста, в отличие от пациенток молодого репродуктивного возраста, достоверно большее количество эмбрионов с низкой суммой баллов. Наибольшее количество анеуплоидных эмбрионов встречается при низкой сумме баллов по шкале KIDScore D5 вне зависимости от возраста, при этом у пациенток старшего репродуктивного возраста средняя и высокая сумма баллов по шкале KIDScore D5 дает одинаково высокий процент анеуплоидий.

Личный вклад автора в проведённое исследование

Автор участвовала в сборе анамнестических, клинико-лабораторных и инструментальных данных у части проспективных пациенток. Диссертант провела ретроспективный анализ более 600 карт для оценки проведённых программ ЭКО и репродуктивных исходов. Автор принимала активное участие в проведении программ ЭКО и ведении беременности в 1 триместре.

Совместно с научным руководителем по результатам проведённого исследования сформулированы выводы и практические рекомендации. Диссертантом лично было подготовлено к публикации 5 печатных работ.

Публикации по теме диссертации

Результаты, полученные в рамках данного исследования, нашли отражение в пяти публикациях, размещенных в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертационных исследований на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Это свидетельствует о соответствии проведенного исследования требованиям ВАК к научным публикациям, подтверждает актуальность и научную значимость полученных данных, а также официально признает их достоверность и оригинальность. Публикация в ВАК-рецензируемых журналах гарантирует прохождение материалов через процедуру независимого рецензирования экспертами в соответствующей области знаний, что повышает доверие к полученным результатам и позволяет включить их в научный дискурс. Данный факт подчеркивает важность проведенной работы для развития медицинской науки и практического здравоохранения. Из данных научных работ 4 были опубликованы в журнале, индексируемом реферативной базой данных SCOPUS.

Апробация диссертации
и внедрение полученных результатов в практику

Апробация диссертационной работы состоялась в ходе заседания № 7 Учёного совета ГБУЗ МО МОНИИАГ имени академика В.И. Краснопольского (в рамках Государственной итоговой аттестации) 28.05.2024 г.

Материалы диссертации были представлены в ходе следующих научных мероприятий:

1. «Time-lapse инкубатор, есть ли реальные преимущества?» проф. Краснопольская К.В., Самойлова А.А., Конькова А.Л. – XVII Общероссийский научно-практический семинар «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии». 8–11 сентября 2023 года, г. Сочи.

2. «Использование Time-lapse технологии при дифференцированном подходе к пациентке в программах ВРТ» проф. Краснопольская К.В., Самойлова А.А. – Международный форум по репродуктивной медицине. 30 сентября 2023 года, г. Екатеринбург.

3. «Искусственный интеллект в ВРТ» проф. Краснопольская К.В., Самойлова А.А. – I Московский Областной конгресс «Подмосковные вечера. У истоков жизни» 24 мая 2024 года, г. Москва.

4. «Способы повышения эффективности программ экстракорпорального оплодотворения» – проф. Краснопольская К.В., Самойлова А.А. – XVII Общероссийский научно-практический семинар «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии». 6-9 сентября 2024 года, г. Сочи.

Структура и объем диссертации

Диссертация представлена рукописью на русском языке, объемом 102 машинописных страницы и состоит из введения, 4-х глав, выводов, практических рекомендаций и списка используемой литературы. Иллюстративный материал включает 17 таблиц и 6 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Актуальные вопросы бесплодного брака

Согласно данным ВОЗ, бесплодием считается болезнь мужской или женской репродуктивной системы, определяемая как неспособность добиться беременности после регулярных незащищённых половых актов на протяжении 12 или более месяцев [78]. Несмотря на отсутствие изменений в определении этой глобальной проблемы на протяжении десятилетий, частота бесплодия неуклонно растёт и по данным международных ассоциаций составляет около 17,5-20,0 % взрослого населения, то есть примерно каждая шестая пара в мире сталкивается с проблемами бесплодия [79]. Стоит отметить, что в современном мире, ввиду трансформации демографического поведения и изменения приоритетов, возрастает возраст первых родов у женщин. Отсрочка детородного возраста наряду с современным образом жизни открывает более широкие возможности для влияния различных негативных факторов образа жизни и генетических факторов, влияющих на фертильность [80].

На сегодняшний день, несмотря на множество способов, позволяющих решить вопрос бесплодия, наиболее эффективным остаются программы ЭКО, однако показатели имплантации эмбрионов не превышают 30 – 40 %, а ЧНБ в последние годы существенно не меняется и не превышает 20-25 % [1,79, 80]. В контексте репродуктивных исходов выделяют две группы факторов: неуправляемые и управляемые. [81,82,83].

К неуправляемым относятся факторы, не поддающиеся модификации в рамках ведения конкретной пациентки. Это, в первую очередь, возраст, овариальный резерв, наличие сопутствующей соматической и гинекологической патологии, а также расовая принадлежность. Вторая группа включает управляемые факторы, на которые возможно воздействовать посредством корректно подобранных медицинских вмешательств. К ним относятся количество переносимых эмбрионов, протоколы стимуляции суперовуляции и дозировки применяемых препаратов, состояние эндометрия,

прегравидарная подготовка, варианты поддержки лютеиновой фазы, методика проведения эмбриологического этапа, а также квалификация специалистов-эмбриологов.

С каждым днём появляется все больше исследований, направленных на улучшение программ ВРТ. С одной стороны, это работы, стремящиеся улучшить этап стимуляции овуляции путём модификации протоколов, а также путём создания новых препаратов. С другой стороны, это исследования, направленные на совершенствования условий культивирования эмбрионов, открытие новых сред, улучшение способов генетической диагностики эмбрионов. Данные инновации получили широкое распространение по всему миру, однако, несмотря на повышение спроса на использование новейших технологий центрами ВРТ, не каждый из них смог оправдать свою эффективность.

Поиски способов повышения эффективности ЭКО привели к открытию новых схем стимуляции овуляции в добавление к классическим схемам с агонистами и антагонистами ГнРГ. После открытия волн фолликулогенеза появилась возможность получать ооциты с эквивалентным качеством в фолликулярной и лютеиновой фазе и был создан протокол Duostim, способный увеличивать количество ооцитов в одном цикле [24,25].

Созданный для преодоления бесплодия протокол Random start в ситуациях онкоинфертильности позволяет начинать стимуляцию суперовуляции в фолликулярную или лютеиновую фазу, не ориентируясь на конкретный день менструального цикла [26,27]. Хотя множество проведенных зарубежных и отечественных исследований не указывают на увеличение числа полученных ооцитов при использовании данного протокола, в отличие от классических схем стимуляции он позволяет не откладывать начало стимуляции до следующего менструального цикла [28, 29].

Критически важные этапы раннего эмбриогенеза протекают в условиях закрытых инкубаторов, что исключает возможность непрерывного визуального мониторинга развития эмбрионов. Это ограничение существенно

затрудняет объективный отбор эмбрионов с наивысшим потенциалом развития. [44].

В процессе оплодотворения полученная зигота претерпевает серию митотических делений, проходя стадии 2-х и 4-х клеточного эмбриона, на 3 день он состоит из 8 бластомеров, к 4-му дню 12-32 плотно объединённых бластомеров представляют собой морулу, которая затем к 5-му дню развивается в бластоцисту (шар с двумя линиями клеток: внутренней клеточной массой и трофэктодермой). Полученная бластоциста переносится в полость матки. К сожалению, не каждый перенос заканчивается наступлением клинической беременности. Однако достаточно часто с целью сохранения собственного генетического материла на 5 сутки развития также производят криоконсервацию оставшихся эмбрионов. Данная процедура позволяет избегать повторных программ стимуляции суперовуляции и снижать уровень гормональной нагрузки на организм [84]. Стандартом считается получение не менее 80-90% зигот от всех полученных ооцитов, и 45-80% качественных бластоцист от количества зигот (ESHRE, 2017).

Первоначально перенос эмбрионов в полость матки осуществлялся на стадии дробления. В связи с несовершенными условиями культивирования у истоков ЭКО, во-первых, возникали сложности с процессом культивирования эмбрионов до стадии бластоцисты, во-вторых, учёные считали, что матка является лучшим инкубатором и поддерживает более стабильные условия для развития эмбрионов [88]. В 80-х годах XX века для повышения эффективности ЭКО приобрела популярность тенденция к переносу нескольких эмбрионов, а, следовательно, и многоплодной беременности. Преодоление «блока» развития эмбрионов и открытие двуступенчатых сред расширило представление о способах культивирования и позволило культивировать эмбрионы in vitro до стадии бластоцисты [85]. Бластоциста представляет собой сложную клеточную структуру, имеющую в своём составе около 200 клеток, следовательно, менее подвержена внешним факторам, чем эмбрион на стадии дробления. Более стабильная структура эмбриона 5 суток развития привела к смене вектора в

сторону селективного переноса эмбриона. Данная динамика оказала положительное влияние на частоту многоплодных беременностей, а также на акушерские риски в процессе вынашивания.

Культивирование эмбрионов в оптимальных условиях имеет решающее значение для успешной программы ЭКО [44]. Эффективность данного этапа зависит от двух составляющих: культуральной среды, как субстрата для полученного эмбриона, а также инкубатора, в котором поддерживаются оптимальные условия для его развития.

Первое упоминание о культивировании датируется 1882 годом, когда Sydney Ringer изобрел солевой раствор, названный его именем, состав которого был близок к составу биологических жидкостей и успешно применялся для поддержания жизнеспособности тканей лягушки [8]. В 1890 году Хипом был произведён первый успешный перенос 4-клеточного эмбриона ангорских кроликов в полость матки бельгийского зайца с последующим живорождением [9]. В 1912 г. А. Браше впервые удалось наблюдать процесс культивирования бластоцисты кролика в течение 48 часов [10]. Несмотря на многочисленные экспериментальные работы с эмбрионами животных, которые описывают использование сложных биологических жидкостей для культивирования, таких как плазма и сыворотка крови, большинство эмбрионов млекопитающих не могли развиваться в данных условиях [11,12,13]. В 1949 г. Хаммонду впервые удалось проследить развитие эмбриональной культуры и дорастить эмбрион мыши со стадии расщепления до бластоцисты [14]. В 1956 г., основываясь на исследованиях Хаммонда, Виттен создал среду «M16», основой которой стал раствор Рингера-Кребса с добавлением антибиотиков и глюкозы. Эмбрионы, полученные при культивировании на данной среде, хорошо приживались и впоследствии давали потомство. Год спустя Виттен продолжил исследования: путём добавления лактата в свою среду он добился развития эмбриона со стадии 2-х клеток, но, к сожалению, не из зигот [15]. Аналогичную блокаду на 2-х клеточной стадии развития у эмбрионов хомяка за счет повышения уровня

глюкозы и фосфатов описала группа Бавистера [16]. В результате исследований было выявлено явление остановки развития эмбриона на определенной стадии дробления, получившее название "Блок дробления" [15].

Первые попытки культивирования эмбрионов человека относятся к 1969 году, когда Эдвардс и Стептоу использовали модифицированный раствор Рингера (Тирода "Т6") с добавлением энергетических субстратов. Несмотря на предшествующий успех с эмбрионами хомяков, результаты культивирования человеческих эмбрионов оказались неудовлетворительными [17]. Только спустя почти 10 лет исследований Эдвардс открыл среду «Ham's F-10», содержащую 20% телячьей сыворотки, которая позволила получить первые бластоцисты и беременность, завершившуюся рождением первого ребёнка после ЭКО – Луизы Браун в 1978 г. [18].

Несмотря на прорыв в истории культивирования, в дальнейшем при использовании данной среды все чаще наблюдался блок развития эмбрионов на стадии 4-8 клеток, а количество полученных бластоцист резко снижалось. Исследования выявили недостатки в среде, как например, содержание гипоксантина оказывало неблагоприятное влияние на этапы развития эмбрионов, а также токсическое действие на бластоцисту человека [32,33]. Кроме выявления факторов среды, которые могут негативно сказываться на процессы культивирования, появились опасения негативного влияния факторов питательной среды на здоровье будущего потомства [34]. Таким образом, в начале 90-х годов Национальный институт здоровья детей и развития человека США создаёт «Национальную совместную программу по экстракорпоральному оплодотворению и преимплантационному развитию» под руководством Ричарда Таски. Цель создания данной программы с неофициальным названием «Культуральный клуб» была направлена на поиски новых безопасных сред для культивирования эмбрионов. Открытие среды «Chatot– Ziomek–Bavister» (CZB), в которой глюкоза добавлялась только с 4-х клеточной стадии, предотвратила «блок развития» на 2-х клеточной стадии культивирования и позволяла получать большее число бластоцист, однако не

оказывала влияние на ЧНБ [35]. Симплексная оптимизация выявила 4 компонента (NaCl, пируват, KH2PO4 и глюкоза), которые при высоких концентрациях вредили развитию эмбриона по сравнению с другими протестированными компонентами. Например, все эмбрионы, культивируемые в среде с высоким NaCl, блокируются на стадии 2-х клеток. Затем метод оптимизации корректировал каждую среду, снижая концентрацию компонента или полностью удаляя его, что привело к значительному прогрессу в преодолении «блока» развития [36]. Таким образом, появилась среда Simplex Optimized Medium (SOM) [37]. В дальнейшем, путём обнаружения аномально низкого уровня калия в эмбрионах, группой Биггерса была создана среда KSOM, которая привела к дальнейшему улучшению развития бластоцисты по сравнению с SOM и CZB в тех же условиях [38]. Изучение аминокислотного состава среды группой Бавистера эмпирическим путём показало, что аминокислоты, отдельно и в сочетании, могут заметно стимулировать или ингибировать развитие эмбриона хомяка in vitro до стадии бластоцисты [39]. Группа Биггерса показала, что уровни глутамина коррелируют с уровнями NaCl, снижая вредные последствия последнего, тем самым оказывая проективное действие на развивающийся эмбрион [37].

В процессе истории разработки сред для культивирования Биггерсом были заданы вопросы «Можно ли разработать единую культуральную среду, которая будет поддерживать развитие на протяжении всего преимплантационного периода?» и «Должен ли быть изменён состав среды, чтобы он соответствовал физиологическим изменениям, которые происходят по мере развития?» [36]. Стоит отметить, что культуральные среды для поддержки развития эмбриона до стадии бластоцисты были основаны на двух различных подходах: последовательный подход «назад к природе» и единый средний подход «пусть эмбрион выберет» [40]. Данные подходы привели к открытию двуступенчатых сред. С помощью подхода «назад к природе» эмбрионы выращиваются первые 72 часа в первой среде, а затем, на стадии расщепления на 3-и сутки, перемещаются во вторую среду (среду

«бластоцисты»). Цель этого подхода заключается в том, чтобы поэтапно изменять химический состав среды путём изменения концентраций пирувата, лактата и глюкозы, аналогично данным процессам, происходящим в фаллопиевой трубе по сравнению с маткой [41]. Многие исследователи проводили различные исследование с целью поиска преимуществ однофазных и двухфазных сред, но на сегодняшний день не обнаружено достоверно значимых различий по эффективности какой-либо из двух сред. При этом однофазные среды имеют некие преимущества, в частности, отсутствие необходимости перемещения эмбриона между двумя чашками во время культивирования, в отличие от двухфазных. Одноступенчатые среды позволяют избегать влияние таких факторов как pH, температура, состав газового окружения и воздействия света, происходящих во время замены сред, также эмбрион не теряет аутокринных факторов, которые производит в процессе развития [42]. На сегодняшний день эмбриологические лаборатории используют множество сред различных производителей, однако компоненты, входящие в состав каждой среды, остаются нераскрытым [89].

Оптимизация методов отбора эмбрионов с максимальным потенциалом имплантации остается актуальной задачей репродуктивной медицины, несмотря на многолетние исследования. Поиск воспроизводимых и эффективных критериев отбора привел к разработке и применению разнообразных методик. Первоначально использовалась стандартная морфологическая оценка, которая была единственной доступной стратегией. Первая классификация бластоцист была предложена в 1999 г. Гарднером, которая представляет собой численно-буквенное обозначение: цифра (от 1 до 6) – показывает степень развития эмбриона, первая буква (A, B, C), означает качество зародышевого узла (эмбриобласт-ICM), вторая буква (A, B, C) – обозначает качество трофобласта [3]. В Венском консенсусе 2017 г. были обозначены наиболее эффективные её параметры для оценки качества эмбрионов [30].

Стабильность культивирования эмбрионов in vitro, обеспечиваемая инкубаторами в лабораториях ЭКО, является критическим фактором для оптимизации эмбрионального развития и достижения высоких клинических результатов. Важно отметить, что различные подходы и технологии используются различными инкубаторами для регулирования этих экологических переменных, и каждый из них имеет свои преимущества и недостатки, которые следует учитывать. [86].

Изначально ранние этапы культивирования эмбрионов in vitro осуществлялись в однодверных инкубаторах. Главный недостаток этой системы заключался в неизбежном воздействии внешних факторов на все культивируемые эмбрионы при каждом открытии дверцы. Технологический прогресс привел к появлению планшетных инкубаторов с индивидуальными камерами и независимой подачей газа. Эта инновация позволила минимизировать влияние открытия одной камеры на микросреду остальных, снизив риск негативного воздействия колебаний температуры и газового состава на развивающиеся эмбрионы. Тем не менее, необходимость извлечения эмбрионов для оценки качества на 3-и сутки культивирования по-прежнему обуславливает определенное влияние внешних факторов, которое полностью исключить не удаётся. [87]

В последнее время произошло развитие культуры эмбрионов с внедрением инкубатора нового типа со встроенной системой таймлапс-мониторинга, которая позволяет интегрировать более стабильные условия культивирования эмбриона, а также анализировать динамические события развития эмбрионов от оплодотворения до образования бластоцисты. Эта новая практика быстро распространяется и используется во многих центрах ЭКО по всему миру [4, 44]. В условиях in vitro культивирования с использованием стандартных инкубаторов, оценка и селекция эмбрионов традиционно основаны на морфологических критериях. Эти критерии включают в себя морфологию пронуклеусов и ядрышек, количественные и размерные характеристики бластомеров на каждой стадии развития, степень

фрагментации, наличие мультинуклеации, динамику экспансии бластоцисты, а также морфологию внутренней клеточной массы и трофэктодермы. В случае использования инкубаторов, оснащенных системой покадровой съемки (Time-lapse), морфологическая оценка проводится с помощью специализированного программного обеспечения. [87]. Уже существует более 23 параметров, позволяющих отбирать эмбрион с высоким потенциалом имплантации. Достаточное количество качественных бластоцист, полученных с применением time-lapse технологии, позволяет эмбриологам осуществлять отбор на основе комплексной оценки, учитывающей не только традиционные морфологические (гарднеровские) критерии, но и морфокинетические параметры развития эмбриона [43].

Time-lapse системы представляют собой инкубаторы, интегрированные с одним или несколькими инвертированными микроскопами и цифровой камерой. Изображения фиксируются с заданной периодичностью в различных плоскостях фокусировки на протяжении всего периода культивирования эмбриона in vitro. Последовательность полученных изображений преобразуется в видеофайл, предоставляющий непрерывную запись развития эмбриона. Данная технология исключает необходимость извлечения эмбрионов из контролируемой среды инкубатора для проведения морфологической оценки, тем самым минимизируя воздействие внешних факторов.

Также при использовании технологии Time-lapse после оплодотворения эмбрионы могут постоянно находиться в инкубаторе до дня переноса или криоконсервации, что, несомненно, упрощает работу лаборатории и позволяет произвести оценку эмбриона в любой момент времени в течение ежедневного рабочего процесса [44]. Технология time-lapse обеспечивает непрерывный мониторинг эмбрионов in vitro, позволяя регистрировать морфокинетические события в режиме реального времени. Анализ полученных данных способствует более точной оценке потенциала развития эмбриона

(эмбриональной компетентности) и повышению эффективности отбора эмбрионов для переноса.

К настоящему времени проведено немало исследований по сравнению двух методов культивирования, однако до сих пор нет единого мнения об эффективности каждого из них.

В работе Reignier A. и соавт., наблюдавших за частотой живорождения и временем до наступления беременности у пар, прошедших программу ЭКО, на протяжении 5-ти лет, отмечены лучшие результаты в группе пациенток с TLT-культивированием по сравнению с культивированием в стандартных условиях (66,9% против 56,4%, p=0,02, и 464 дней против 596 дней, p=0,01 соответственно) [43].

В исследовании китайских учёных была продемонстрирована статистическая разница в двух группах женщин по ЧНБ и частоте живорождения, которые были значительно ниже в группе TLT, чем в группе стандартного культивирования (ЧНБ 49,18% против 70,42%; частота живорождения 45,90% против 64,79% соответственно) [48].

Напротив, проведённый обзор 6 рандомизированных клинических исследований египетскими учёными показал отсутствие существенной разницы между обеими группами в отношении текущей беременности, клинической беременности и показателей имплантации [49].

В исследовании, проведённом в Абу-Даби и включавшем 796 зрелых ооцитов, которые были случайным образом разделены между двумя инкубаторами, не выявлено достоверных различий в скорости оплодотворения (79,3% против 78,8%, P = 0,932), скорости расщепления (98,5% против 99,1%, P = 0,676) и качестве эмбриона на 3-й день (P = 0,543) между обоими инкубаторами, соответственно [45]. Однако на 5 сутки культивирования наблюдалась наиболее высокая частота получения эмбрионов, пригодных к биопсии, а в последующем – получение большего числа эуплоидных бластоцист по данным ПГТ-А [45,46].

В мета-анализе, опубликованном в октябре 2023 г., включавшем в себя 14 рандомизированных исследований, было показано отсутствие преимуществ использования TLT, в отличие от стандартных инкубаторов [47].

Конраверсионные данные проведённых исследований указывают на необходимость дальнейшей работы в изучаемой области для получения более надежной доказательной базы.

1.2. Программы ВРТ у пациенток разных групп

На сегодняшний день тенденции современной медицины направлены на персонифицированный подход к каждой пациентке. Увеличение числа супружеских пар, обращающихся в клиники ВРТ для достижения долгожданной беременности, приводит репродуктологов к поиску индивидуальных инструментов, повышающих эффективность программ ЭКО у конкретной пациентки. 1]

Женская репродуктивная система имеет более высокую скорость старения, чем любая другая в организме человека [50]. Согласно последнему отчёту РАРЧ, основанному на >161 000 циклов ЭКО, по всей России происходит изменение возрастной структуры – тенденция к увеличению материнского возраста пациенток с проблемами бесплодия, обращающихся в клиники ВРТ с проблемами бесплодия с тенденцией к увеличению материнского возраста [1]. Ткань яичников, как и каждый орган тела, подвергается старению. Каждый день в яичнике определенное количество первичных фолликулов переходит из фолликулярного резерва в процесс, называемый фолликулогенезом, чтобы в итоге из антрального фолликула была получена зрелая яйцеклетка [50]. Пациентки позднего репродуктивного возраста сталкиваются с двумя основными проблемами: снижение количества антральных фолликулов в связи с возрастным увеличением скорости апоптоза, а также с повышенными рисками получения анеуплоидных эмбрионов [51]. С другой стороны, с возрастом приобретается больший «багаж» сопутствующих экстрагенитальных заболеваний, а также повышаются акушерские риски во время вынашивания беременности (выкидыши, преждевременные роды,

эклампсия) [20,21]. Велика роль фактора экстрагенитальных заболеваний – уже 16 лет они занимают 1 место в структуре причин материнской смертности и в нашей стране, и в мире; 33% анемизация менструирующих женщин и 62% женского ожирения и ИМТ – доказанные факторы снижения индекса фертильности. [20]

Зная роль возраста в приумножении хромосомных аномалий и указанного снижения «индекса здоровья», все более распространенным становится преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидию (ПГТ-А) для оценки наличия/отсутствия хромосомных аномалий у эмбрионов. Исследования показали, что доля бластоцист без анеуплоидии у женщин в возрасте 27-35 лет составляла примерно 55% и быстро снижалась примерно до 35% в возрасте 38 лет и до 20% в возрасте 43 лет [52]. Частота живорождения увеличивалась при биопсии на 5 сутки культивирования эмбрионов и ПГТ-А у пациенток старшего репродуктивного возраста [53,54].

Кроме того, отрицательные изменения накапливаются в геноме ооцитов, снижая возможность оплодотворения, нормального развития и имплантации эмбриона. Среди существующих подходов можно выделить два основных: методы, позволяющие сохранить репродуктивные клетки в более молодом возрасте с использованием витрификации ооцитов, а также методы, направленные на улучшение базового функционального состояния ооцитов, условий их культивирования, и эмбрионов женщин старшего репродуктивного возраста [55]. Пациентки позднего репродуктивного возраста часто оказываются от проведения ПГТ-А по материальным или религиозным соображениям. Повышение стоимости программы ЭКО также происходит ввиду отказа от переноса эмбрионов, направленных на генетическое тестирование, и, как следствие, необходимости использования криотехнологий для сохранения генетического материала. В связи с дороговизной исследования, ПГТ-А на сегодняшний день проводится относительно редко. По данным последних отчетов Российской ассоциации репродукции человека, применение преимплантационного генетического тестирования во всех его

технических вариантах в циклах ВРТ в России составляет лишь 10,4%. [6]. Высокая стоимость генетического тестирования эмбрионов, а также неудобства при ее проведении приводят к невозможности использования данной методики как скринингового исследования [7, 8]. Следовательно, необходим поиск дополнительных критериев для определения показаний к выполнению ПГТ-А, которые бы снижали недостатки данной методики и выявляли преимущества для ее обязательного проведения. Перспективным направлением повышения эффективности преимплантационной генетической диагностики анеуплоидий (ПГТ-А) является разработка экономически выгодных альтернативных методов оценки плоидного статуса эмбрионов. Актуальные исследования фокусируются на создании алгоритмов, позволяющих прогнозировать имплантационный потенциал эмбрионов на основе анализа корреляции множества морфокинетических параметров с исходом имплантации. Разрабатываемые алгоритмы предусматривают балльную оценку совокупности морфокинетических характеристик эмбрионов. [12]. Так, TLT-инкубатор EmbrioSkope+ имеет в своём программном обеспечении шкалу KIDScore D5 (сокращенно KS5), которая дает возможность, в зависимости от суммы баллов, оценить прогноз эмбриона для успешной имплантации. Высокая суммарная оценка морфокинетических параметров эмбриона коррелирует с повышенной вероятностью успешной имплантации. [13, 14]. Применение шкалы KS5 для оценки морфокинетических параметров эмбрионов способствует селекции образцов с наивысшим имплантационным потенциалом, выраженным в максимальной сумме баллов, для последующего переноса или криоконсервации. [15].

Снижение количества ооцитов, которое резко происходит в старшем репродуктивном возрасте, снижает реакцию яичников на стимуляцию овуляции и чаще приводит к «бедному» ответу, а соответственно, к меньшему количеству получаемых эмбрионов [91].

«Бедный» ответ яичников на стимуляцию овуляции остаётся одной из самых сложных задач для врача ЭКО. Число таких пациенток составляет около

9–24% проходящих овариальную стимуляцию женщин, то есть с данной проблемой сталкивается почти каждая четвертая из них [56]. Болонские критерии (2011) определяют «бедный» ответ на стимуляцию яичников в циклах ЭКО при наличии как минимум двух из следующих трех признаков: поздний репродуктивный возраст женщины (40 лет и старше) или наличие других факторов риска сниженного овариального ответа; предыдущий «бедный» ответ на стимуляцию (получение трех и менее ооцитов или отмена цикла); сниженный овариальный резерв, определяемый по количеству антральных фолликулов (менее 5-7) или уровню антимюллерова гормона (АМГ) (менее 0,5-1,1 нг/мл). Два эпизода «бедного» ответа после максимальной стимуляции достаточны, чтобы определить пациентку, как плохо реагирующую, при отсутствии фактора позднего репродуктивного возраста или сниженного овариального резерва [57].

Учитывая несомненную актуальность проблемы, в последние годы проводится все больше исследований, направленных на улучшение прогноза ЭКО у данной когорты пациенток. В последнем мета-анализе (2023), включавшем 16 РКИ, оценивалось влияние стратегий адъювантного лечения ДГЭА, коэнзима Q10, гормона роста и чрескожной электрической акупунктурой стимуляцией (TEAS) до программы ЭКО и переноса эмбриона для улучшения исходов беременности у пациентов с «бедным» ответом. В результате проведённого исследования выяснилось, что применение ДГЭА, коэнзима Q10 и гормона роста оказывают положительный клинический эффект у пациенток исследуемой группы, при этом применение TEAS показало неоднозначные результаты и требует дальнейшего изучения [58].

Наконец, необходимо отметить, что последние два десятилетия исследователи подчёркивали настоятельную необходимость «говорить на одном и том же языке» в отношении «бедного» ответа яичников. Одно из основных ограничений использования Болонских критериев заключается в том факте, что включённая популяция была разнородной [59]. Недавно введённые критерии POSEIDON утверждают, что первым шагом является переход от

«бедного» ответа яичников к концепции «плохого прогноза», одновременно это улучшает идентификацию и стратификацию различных подтипов пациентов с плохим прогнозом до стимуляции яичников. Непосредственным маркером успеха является способность стимуляции яичников получать то количество ооцитов, которое необходимо для развития по крайней мере одной эуплоидной бластоцисты для переноса у каждой пациентки [60].

Помимо поиска адъювантных методов для улучшения прогноза программ ЭКО в последние годы разработаны новые протоколы стимуляции овуляции [59]. Мета-анализ, оценивающий эффективность легкой стимуляции у пациенток с «бедным» ответом, в отличие от традиционных схем стимуляции, не показал достоверной разницы по количеству получаемых бластоцист, ЧНБ и живорождением между двумя группами. Однако стоит отметить несомненно важный аспект – снижение стоимости программы и снижение суммарной дозы гонадотропинов для стимуляции [59,61]. После открытия волн фолликулогенеза был создан протокол стимуляции Duostim, который позволил получать большее количество ооцитов у пациенток с «бедным» ответом [25,62].

Несмотря на появление множества методов, позволяющих получать большее количество ооцитов у пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию, несомненно остается актуальным улучшение условий культивирования, в результате которого даже из малого количества ооцитов возможно получение большего количества бластоцист хорошего качества.

1.3. Программы ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации

Повторные неудачи имплантации (ПНИ) представляют собой сложную и актуальную проблему в репродуктивной медицине, характеризующуюся многообразием этиологических факторов и патофизиологических механизмов, многие из которых остаются недостаточно изученными. [63]. До сих пор отсутствует точное определение ПНИ, однако общепринятым остаётся понятие о неспособности достичь клинической беременности после 2-3 циклов

ЭКО с переносом 1–4 качественных эмбрионов [64,65]. Этиология ПНИ может быть связана с дисфункцией двух основных участников имплантации, а именно эмбриона и эндометрия [66].

Гистероскопия является одним из наиболее широко используемых инструментов исследования женщин с ПНИ. Она считается золотым стандартом для диагностики и лечения внутриматочных нарушений, которые могут быть пропущены при трансвагинальном УЗИ, таких как миомы, полипы или спайки [75].

Повторные оперативные вмешательства могут приводить к уменьшению толщины эндометрия, что, в свою очередь, оказывает негативное влияние на процессы имплантации [67, 76]. Следует отметить, что ПЭ при наличии гидросальпинксов также может привести к ПНИ, так как воспалительная жидкость в просвете маточной трубы может влиять как на эндометрий, так и на эмбрион [68]. Хронический эндометрит (ХЭ) – это новая веха, которая оказывает негативное влияние на репродуктивные исходы в случае лечения ЭКО[66]. Этиологию ХЭ в основном связывают с микроорганизмами, ключевые звенья патогенеза до конца не установлены, хотя контраверсией выступают современные данные о том, что эта болезнь вызывает локальные иммунные изменения, приводящие к нарушению децидуализации эндометрия [69]. Считается, что ХЭ влияет на восприимчивость эндометрия путем создания дисбиотической среды эндометрия, характеризующейся плотными популяциями лимфоцитов, а также сдвигом в сторону воспалительных цитокиновых профилей (Th1/Th17) [70]. Все чаще репродуктологи сталкиваются с ПНИ неясной этиологии. В последние годы разработаны множество способов решения этой проблемы: внутриматочное введения аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC-therapy) [71], внутриматочное введение плазмы крови, натуральной или обогащённой тромбоцитами (PRP) [72], нанесение насечек на эндометрий (Endometrial scratching) [73], нормализации микробиомы эндометрия [74]. Однако стоит

отметить, что ввиду отсутствия доказательной базы, данные исследования не могут быть включены в клинические рекомендации [66].

Помимо факторов, которые оказывают негативное влияние на эндометрий, следует помнить о второй, не менее важной составляющей проблемы ПНИ, – эмбрионе. К настоящему времени весьма ограниченны исследования взаимосвязи качества переносимого эмбриона и ПНИ. В мета-анализе, проведённом китайскими учёными в октябре 2023 г., показано, что ПГТ-А достоверно увеличивает показатели имплантации, ЧНБ и уровень живорождения у пациенток с ПНИ [77]. Несомненно, важным следует считать исследования, направленные на улучшение качества эмбрионов с целью снижения ПНИ.

Таким образом, представленные сведения несомненно указывают на доказанные научные исследования повышения эффективности ЭКО путём модификации схем стимуляции овуляции, применения различных препаратов для стимуляции овуляции и разработки новых сред для культивирования эмбрионов, адьювантной терапии перед протоколом ЭКО, генетической диагностики. Однако, несмотря на имеющиеся достижения, эффективность экстракорпорального оплодотворения остается невысокой. Таким образом, разработка новых методов, направленных на повышение эффективности лечения бесплодия с использованием вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у различных категорий пациенток, сохраняет свою высокую актуальность и является приоритетным направлением исследований в репродуктивной медицине. Это обусловлено необходимостью улучшения показателей наступления беременности, снижения рисков осложнений и повышения доступности ВРТ для более широкого круга женщин, испытывающих трудности с зачатием.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование было проведено на базе отделения репродуктологии ГБУЗ МО Московского областного научно-исследовательского института акушерства и гинекологии имени академика Краснопольского В.И. в течении 3 лет – с 2021 по 2023 гг. Исследование одобрено этическим комитетом ГБУЗ МО МОНИИАГ № 9, 23.11.2021 г., протокол № 8. В соответствии с поставленной целью и задачами в исследование включено 2185 пациенток, которым проведена программа ЭКО на базе отделения репродуктологии ГБУЗ МО МОНИИАГ. Все пациентки дали письменное информированное согласие на участие в данном исследовании.

2.1. Материалы исследования

Проведено ретро- и проспективное обследование 3000 инфертильных пациенток, обратившихся в отделение репродуктологии ГБУЗ МО МОНИИАГ имени академика В.И. Краснопольского. После анализа клинико-анамнестических данных и проведённого обследования в исследование было включено 2185 пациенток, прошедших программу ЭКО, которые, в зависимости от способа культивирования эмбрионов, были разделены на две группы: у одной группы культивирование проводилось с использованием стандартного инкубатора, другую группу составили пациентки, у которых культивирование эмбрионов проходило в инкубаторе с использованием системы Time-lapse. Далее, согласно дизайну исследования, неселективная популяция была разделена на четыре когорты, в зависимости от факторов, влияющих на исходы программ ЭКО. В дальнейшем каждая когорта была подразделена на 2 группы, в зависимости от способа культивирования эмбрионов.

Когорту I представляла 671 пациентка с хорошим прогнозом программ ЭКО. Пациентки дополнительно были разделены на группы 1 и 2 в зависимости от способа культивирования:

- *в группу 1* вошла 551 пациентка, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- *группу 2* составили 120 пациенток, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием Time-lapse инкубатора

Когорту II представляли 457 пациенток с «бедным» ответом на гонадотропины в программах ЭКО, которые дополнительно были разделены на группы 3 и 4 в зависимости от способа культивирования:

- *в группу 3* вошли 374 пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- *группу 4* составили 83 пациентки у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием Time-lapse инкубатора

Когорту III представляли 399 пациенток с повторными неудачами имплантации в программах ЭКО, которые дополнительно были разделены на группы 5 и 6 в зависимости от способа культивирования:

- *в группу 5* вошли 247 пациенток, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- *группу 6* составили 152 пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием Time-lapse инкубатора

Когорту IV представляли 658 пациенток старшего репродуктивного возраста, которые дополнительно были разделены на группы 7 и 8 в зависимости от способа культивирования:

- *в группу 7* вошли 526 пациенток, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- *группу 8* составили 132 пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием Time-lapse инкубатора

Критерии включения:

I когорта – хороший прогноз предстоящей программы ЭКО:

- Репродуктивный возраст пациенток ≤ 35
- Сохранный овариальный резерв АМГ $> 1{,}2$

- 1-я или 2-я предстоящая программа ЭКО
- Отсутствие мужского фактора бесплодия
- Подписанное добровольное согласие на участие в исследовании.

II когорта – бедный ответ на гонадотропины в текущей программе ЭКО:

- При трансвагинальной пункции фолликулов получено < 3 ооцитов
- Репродуктивный возраст пациенток ≤ 42
- Подписанное добровольное согласие на участие в исследовании.

III когорта – повторные неудачи имплантации:

- В анамнезе 3 и более неудачные программы ЭКО с адекватным ответом на стимуляцию суперовуляции (при трансвагинальной пункции фолликулов получено > 3)
- Подписанное добровольное согласие на участие в исследовании.

IV когорта – старший репродуктивный возраст:

- Репродуктивный возраст пациенток ≥ 36
- При трансвагинальной пункции фолликулов получено > 3
- Подписанное добровольное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения:

I когорта – хороший прогноз программ ЭКО:

- Наличие противопоказаний к программам ВРТ, согласно приказу № 803 н
- Репродуктивный возраст пациенток ≥ 36
- При трансвагинальной пункции фолликулов получено < 3 ооцитов
- Сниженный овариальный резерв АМГ $< 1{,}2$
- Мужской фактор бесплодия
- Более 2х программ ЭКО в анамнезе
- Патология кариотипа.

II когорта – бедный ответ на гонадотропины:

- Наличие противопоказаний к программам ВРТ, согласно приказу № 803 н

- При трансвагинальной пункции фолликулов получено > 3 ооцитов
- Репродуктивный возраст пациенток ≥ 42
- Патология кариотипа.

III когорта – повторные неудачи имплантации:

- Наличие противопоказаний к программам ВРТ, согласно приказу № 803 н
- 1-я, 2-я предстоящая программы ЭКО
- Репродуктивный возраст пациенток ≥ 42
- Патология кариотипа.

IV когорта – старший репродуктивный возраст:

- Наличие противопоказаний к программам ВРТ, согласно приказу № 803 н
- Репродуктивный возраст пациенток < 36 и ≥ 42
- При трансвагинальной пункции фолликулов получено < 3 ооцитов
- В анамнезе 3 и более неудачные программы ЭКО с адекватным ответом на стимуляцию суперовуляции
- Патология кариотипа.

Дизайн исследования

На 1 этапе исследования проведен анализ программ ЭКО у 2185 пациенток в неселективной выборке пациентов, которые, в зависимости от способа культивирования эмбрионов, были разделены на 2 группы – культивирование эмбрионов в стандартном инкубаторе, культивирование эмбрионов в инкубаторе с использованием системы Time-lapse (Рисунок 1).

Рисунок 1 – Распределение пациенток в неселективной популяции

Проанализированы данные программ ЭКО у 671 пациентки с хорошим прогнозом программ ЭКО, которые были разделены на две группы: 1 группа включала 551 пациентку, культивирование эмбрионов в группе проводилось в стандартном инкубаторе, 2 группа включала 120 пациенток, для культивирования эмбрионов использовался инкубатор с системой Time-lapse. У пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию эмбриологический этап оценивался в двух группах: 3 группа – 374 пациентки, культивирование эмбрионов у которых проводилось в стандартном инкубаторе и 4 группа – 83 пациентки, для культивирования эмбрионов использовали инкубатор с системой Time-lapse. Эмбриологический этап у пациенток с повторными неудачами имплантации оценивался в двух группах: 5 группа – 247 пациенток, культивирование эмбрионов в группе проводилось в стандартном инкубаторе, 6 группа включала 152 пациентки, культивирование эмбрионов проводилось в инкубаторе с Time-lapse системой. Также данные пациенток старшего репродуктивного возраста оценивали у двух групп: 7 группа состояла из 526 пациенток, культивирование эмбрионов проводилось в стандартных инкубаторах; 8 группа включала 132 пациентки, культивирование эмбрионов проводилось в инкубаторе с Time-lapse системой (Рисунок 2).

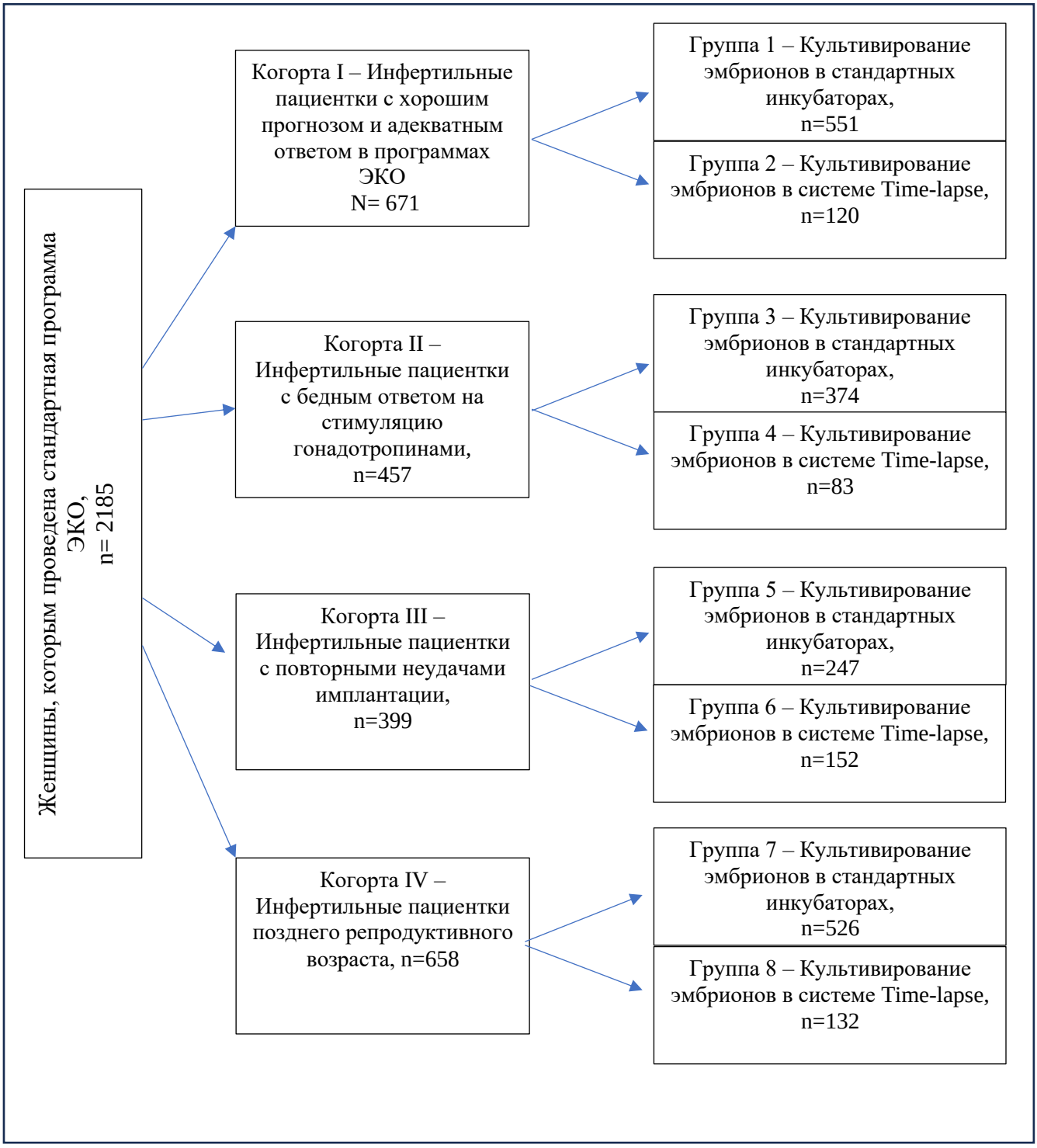


Рисунок 2 – Распределение пациенток по когортам и группам исследования

На 2 этапе исследования у пациенток с подтвержденной беременностью проведена оценка ранних репродуктивных потерь в каждой когорте, в зависимости от способа культивирования эмбрионов (Рисунок 3).

Было проведено 840 переносов эмбрионов в нативных протоколах стимуляции суперовуляции программы ЭКО. Клиническая беременность, которая оценивалась наличием плодного яйца в полости матки, наступила у 368 пациенток. Из них 63 беременности прервались на ранних сроках по следующим причинам: неразвивающиеся беременности до 12 недель, самопроизвольные выкидыши в сроке до 12 недель, внематочные беременности. Также наблюдалось 33 биохимические беременности.

Рисунок 3 – Распределение пациенток в зависимости от исхода наступившей беременности по группам

На 3 этапе, согласно поставленным задачам исследования, нами была проведена оценка корреляционной связи между плоидным статусом эмбрионов по данным ПГТ-А и оценкой морфокинетических параметров эмбрионального развития с применением шкалы KIDScore D5, в зависимости от возраста пациенток.

Всего было проведено 581 ПГТ-А, которые были разделены в зависимости от возраста пациенток и способа культивирования эмбрионов. Группу 1 составили эмбрионы, полученные у пациенток молодого репродуктивного возраста, у которых культивирование эмбрионов проводилось в стандартных инкубаторах, вторую группу представляли эмбрионы, полученные от пациенток молодого репродуктивного возраста, у которых культивирование эмбрионов проводилось в инкубаторе с использованием системы Time-lapse. Группу 3 составили эмбрионы, полученные от пациенток позднего репродуктивного возраста, у которых культивирование эмбрионов проводилось в стандартных инкубаторах, вторую группу представляли эмбрионы, полученные от пациенток позднего репродуктивного возраста, у которых культивирование эмбрионов проводилось в инкубаторе с использованием системы Time-lapse (Рисунок 4).

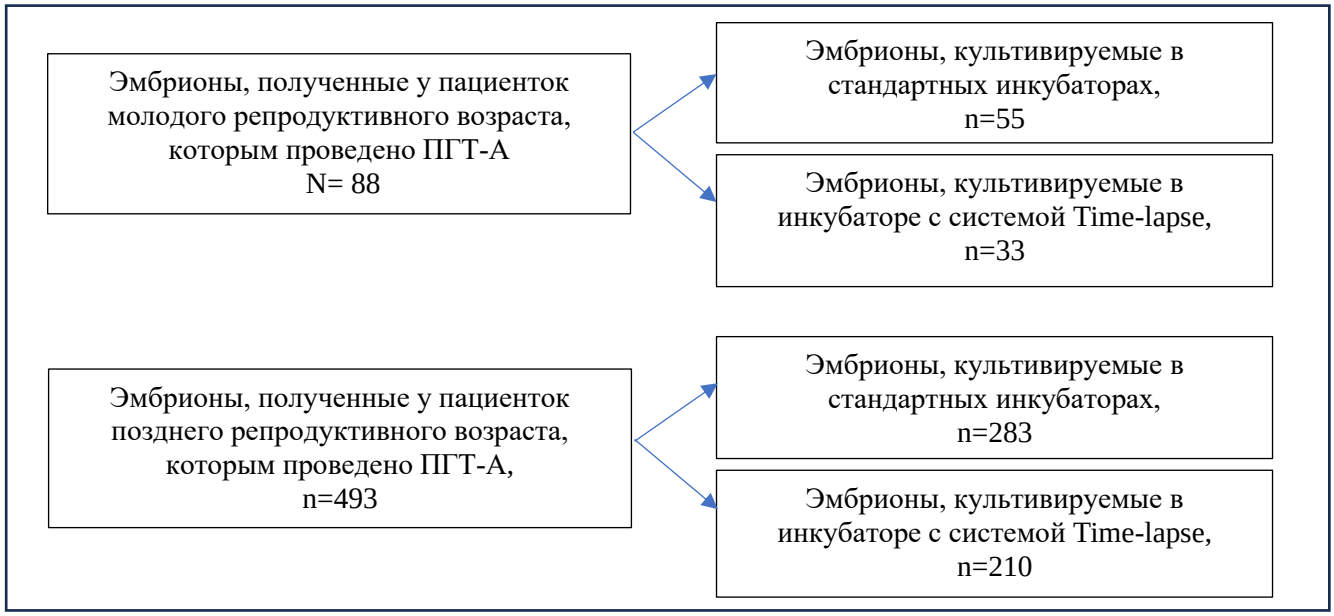


Рисунок 4 – Распределение полученных эмбрионов в зависимости от результатов ПГТ-А в разных возрастных группах

Также мы оценивали корреляционную связь между наличием анеуплоидии по данным ПГТ-А и бальной оценкой морфокинетических параметров эмбрионального развития с применением шкалы KIDScore D5 у эмбрионов, культивирование которых проводилось с применением системы Time-lapse, в зависимости от возраста пациенток (Рисунок 5).

Рисунок 5 – Распределение анеуплоидных эмбрионов в зависимости от возраста и суммы баллов по шкале KIDScore D5

2.2. Методы исследования

Пациенткам, которые были включены в исследование, проводилось клинико-лабораторное исследование, согласно положениям:

- приказа Министерства здравоохранения РФ от 1 ноября 2012 г. № 572н (ред. от 12.01.2016) «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю “Акушерство и гинекология”»;

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

Данные нормативные акты Министерства здравоохранения РФ регламентируют объем и порядок исходного клинического обследования, включающего сбор анамнеза, первичный осмотр, гинекологическое обследование, УЗИ органов малого таза, молочных желез, а также заключение терапевта о состоянии соматического здоровья пациентки и отсутствии противопоказаний к беременности, родам и ЭКО.

Сбор анамнеза включал оценку возраста, имеющиеся аллергические реакции, семейный анамнез пациентки, перенесенные или имеющиеся инфекционные и соматические заболевания, перенесенные травмы и оперативные вмешательства. Гинекологический анамнез включал оценку характеристик менструального цикла (возраст менархе, регулярность, продолжительность, объем и длительность менструаций, альгодисменорея), возраст начала половой жизни, количество половых партнеров и семейное положение.

Анализ репродуктивного анамнеза включал оценку исходов предыдущих беременностей (количество родов, самопроизвольные и индуцированные аборты, случаи неразвивающейся и эктопической беременности, осложнения гестации и родов), продолжительность бесплодия, ранее применявшиеся методы лечения бесплодия и данные о хирургических вмешательствах на органах малого таза. Собранная информация фиксировалась в медицинской документации пациентки.

Гинекологическое обследование, которое проводилось на приёме, состояло из бимануального исследования и осмотра шейки матки с применением зеркала Куско. Бимануальное исследование включало оценку длины, положения и состояния шейки матки, а также размеров, консистенции, положения, подвижности и состояния придатков матки. В зависимости от состояния шейки матки проводилось простое или расширенное (по показаниям) кольпоскопическое исследование.

Из ***стандартных лабораторных методов*** проводились:

- общий и биохимический анализ крови;

- общий анализ мочи;

-тестирование протромбинового времени, протромбина, АЧТВ, фибриногена, антитромбина-III, Д-димера;

- анализ крови на ВИЧ, гепатит В и С, RW;

- определение в крови антител к краснухе;

- определение группы крови, резус фактора;

- мазок на онкоцитологию;

- флюрографическое исследование органов грудной клетки;

- ЭКГ.

Лабораторный инфекционный скрининг состоял из взятия влагалищных мазков при помощи урогенитального зонда и цервикального материала при помощи цитощетки с целью проведения их микроскопии. Для выявления инфекций, передаваемых половым путём, проводилось ПЦР-исследование урогенитального соскоба. После получения результатов предварительного обследования решался вопрос о необходимости назначения дополнительного обследования для уточнения клинической ситуации с последующим проведением терапии при необходимости.

Гормональный профиль оценивался у всех пациенток, включённых в исследование на этапе подготовки к предстоящей попытке ЭКО. На 2-3 день менструального цикла проводилась оценка базального уровня ФСГ, ЛГ, эстрадиола (E_2), общего тестостерона, дегидроэпиандростерона-сульфата,

пролактина, ТТГ, свободной фракции тироксина (T_4), антител к тиреопероксидазе (АТ-ТПО) и антител к тиреоглобулину (АТ-ТГ).

Для мониторинга десенситизации гипофиза измеряли уровни прогестерона и эстрадиола до начала стимуляции суперовуляции. Эти данные, наряду с результатами ультразвукового мониторинга, использовались для оценки эффективности стимуляции овуляции и определения оптимального времени для введения триггерной дозы хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). В посттрансферном периоде проводился гормональный мониторинг прогестерона и эстрадиола с целью контроля эффективности мероприятий, связанных с поддержкой лютеиновой фазы.

Диагностика беременности осуществлялась в два этапа. Первоначально, на 14-16 день после переноса эмбрионов, проводилось количественное определение концентрации β-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β-ХГЧ) в сыворотке крови. Положительный результат теста на β-ХГЧ на данном этапе свидетельствовал о наступлении биохимической беременности, то есть о наличии имплантации эмбриона и начале продукции ХГЧ. Однако биохимическая беременность не всегда развивается в клиническую, поэтому для подтверждения клинической беременности, характеризующейся визуализацией плодного яйца в полости матки, на 21-28 день после переноса эмбрионов проводилось ультразвуковое исследование (УЗИ). УЗИ-мониторинг позволял подтвердить наличие внутриматочной беременности и оценить ее жизнеспособность. Таким образом, двухэтапный подход к диагностике беременности, включающий определение β-ХГЧ и УЗИ, обеспечивал более точную оценку результатов программы экстракорпорального оплодотворения.

Ультразвуковое исследование матки и яичников выполняли с помощью аппарата фирмы «Samsung» Medison SONOACE (Корея). Трансвагинальное исследование проводилось с целью оценки состояния матки и яичников с применением датчика EC4-9, при котором оценивалось состояние ОР (базальное число малых антральных фолликулов диаметром более 3 мм),

толщина и эхо-структура эндометрия. При подозрении на наличие патологии либо с целью дифференциальной диагностики образований яичников проводился экспертное УЗИ на аппарате экспертного класса SAMSUNG WS80OA с применением вагинального датчика E3-12A.

Из ***оперативных методов исследования*** у пациенток с подозрением на патологию эндометрия (полипы, гиперплазия эндометрия, синехии полости матки) и внутриматочную патологию с целью оценки состояния полости матки проводилась ***гистероскопия***.

Также у пациенток с повторными неудачными имплантациями в анамнезе проводилась ***офисная гистероскопия*** с целью оценки состояния полости матки перед программой ЭКО.

При выявлении различной патологии органов малого таза (гидросальпинкс, миома матки, кисты яичников различной этиологии) исключительно как этап обследования и подготовки к программе ЭКО выполняли ***лечебно-диагностическую лапароскопию***.

Все виды оперативных вмешательств выполняли с применением аппаратуры фирмы KARL STORZ (Германия) по общепринятым методикам.

2.3. Ведение пациенток в программах ЭКО

2.3.1. Стандартная программа ЭКО

Этапы выполнения стандартной программы ЭКО:

- стимуляция яичников;
- трансвагинальная пункция фолликулов;
- оплодотворение (методом ЭКО или ИКСИ);
- культивирование эмбрионов в течение 5-6 суток;
- перенос эмбрионов;
- поддержка посттрансферного периода.

Стимуляцию суперовуляции в контролируемых циклах ЭКО начинали:

- в протоколе с агонистом ГнРГ (аГнРГ), после достижения десенситизации гипотоламо-гипофизарной системы после инъекции агониста на 19-21 день предшествующего лечебному менструального цикла;
- в протоколе с применением антагонистов ГнРГ (антГнРГ), с 2-3 дня лечебного менструального цикла.

Стартовая дозировка рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ) и человеческого менопаузального гонадотропина (чМГ) определялась индивидуально для каждой пациентки на основе оценки гормонального профиля, конституциональных особенностей и риска развития синдрома гиперстимуляции яичников.

Ультразвуковой мониторинг роста фолликулов начинался с 5-7 дня стимулированного цикла и проводился далее каждые 2-3 дня. Дозировка гонадотропинов корректировалась индивидуально в зависимости от динамики роста фолликулов. При достижении доминантным фолликулом диаметра 17-20 мм выполнялась индукция овуляции путем введения триггерной дозы рекомбинантного ХГЧ 6500 МЕ и ХГЧ 3000-10000 МЕ. Трансвагинальная пункция всех фолликулов диаметром более 15 мм осуществлялась через 35-36 часов после введения триггера овуляции.

Пункцию фолликулов проводили под внутривенной анестезией в асептических условиях операционной трансвагинальным доступом под УЗ-контролем. Осуществляли забор всех доминантных фолликулов при помощи аспирационной иглы (17GOocyteRecoverySet 330mm). Фолликулярную жидкость собирали в пробирки с округлым дном и передавали эмбриологам для оценки качества полученных ооцитов и выполнения следующего этапа программы ЭКО.

Оплодотворение ооцитов проводилось in vitro через 38-40 часов после индукции овуляции с использованием стандартных протоколов рутинной инсеминации или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ).

Культивирование эмбрионов выполняли в условиях эмбриологической лаборатории в течение 5-6 суток после ТВП.

Использовались инкубаторы K-Systems G185 производства Kivex Biotec, Denmark. Культивирование эмбрионов с использованием хрономониторинговой технологии выполняли в инкубаторе EmbryoSkope+ ES-P1 производства Vitrolife, Denmark.

Оценка качества эмбрионов и их пригодности для переноса в полость матки или криоконсервации осуществлялась эмбриологами на 5-е сутки развития с учетом морфологических критериев стадии бластоцисты. В случае культивирования эмбрионов в стандартных условиях использовалась оценка качества эмбрионов по классификации Гарднера с оценкой на уровне 2BB-6AA. В процессе культивирования эмбрионов с использованием инкубатора, оснащенного системой покадровой съемки (time-lapse), оценка морфокинетических параметров проводилась с применением шкалы KIDScore D5, версия 4. Учитывая диапазон значений по данной шкале (от 1 до 9,9 баллов), все исследуемые бластоцисты были стратифицированы на три группы для дальнейшего анализа:

- бластоцисты с низкой суммой баллов (от 1 до 4,0);
- бластоцисты со средней суммой баллов (от 4,1 до 7,0);
- бластоцисты с высокой суммой баллов (от 7,1 до 9,9).

Преимплантационное генетическое тестирование анеуплоидий (ПГТ-А) проводилось методом секвенирования нового поколения (NGS). У бластоцист хорошего качества осуществляли биопсию 4-10 клеток трофэктодермы. Полученный биоптат помещали в индивидуальные пробирки типа Эппендорф, содержащие 2,5 мкл лизирующего буфера, и криоконсервировали для последующей транспортировки в генетическую лабораторию и проведения NGS анализа.

Оценку результатов ПГТ-А проводили в соответствии с рекомендациями PGDIS [1]. Критериями эуплоидии, определяющими пригодность эмбрионов для переноса или криоконсервации, являлись:

отсутствие аномальных клеток в исследуемом биоптате, либо наличие мозаицизма в пределах 20% среди анализируемых клеток трофэктодермы.

Перенос эмбриона в полость матки осуществлялся на 5-е сутки после трансвагинальной пункции в рамках стандартного протокола ЭКО. Процедура проводилась в условиях малой операционной под ультразвуковым контролем с использованием одноразового катетера COOK.

Поддержка лютеиновой фазы в посттрансферном периоде осуществлялась назначением препаратов прогестерона трансвагинально в дозе от 400 мг/сутки или внутримышечно в дозе от 25 мг/мл. Концентрация β-хорионического гонадотропина (β-ХГЧ) в сыворотке крови оценивалась на 14-15 сутки после переноса эмбриона. В случае подтверждения биохимической беременности (положительный результат анализа на β-ХГЧ) гормональная поддержка пролонгировалась до клинического подтверждения беременности, определяемого визуализацией плодного яйца в полости матки при ультразвуковом исследовании (УЗИ) на 21-28 сутки после переноса эмбриона. При успешной визуализации плодного яйца гормональная терапия при необходимости могла быть продолжена до 12-13 недели гестации под динамическим гормональным и ультразвуковым контролем.

Эффективность ЭКО оценивали по показателю частоты наступления беременности на общее число выполненных переносов свежих эмбрионов ($ЧНБ_{ПЭ}$). Всем участницам исследования был осуществлен перенос одного эмбриона в полость матки. Частота наступления беременности (ЧНБ) после переноса эмбрионов (ПЭ) оценивалась исключительно на основании клинически подтвержденных беременностей, диагностированных при помощи ультразвукового исследования (УЗИ) с визуализацией плодного яйца в период с 21 по 28 сутки после ПЭ. Показатель частоты ранних репродуктивных потерь (в первом триместре) рассчитывался относительно количества зарегистрированных клинических беременностей.

2.4. Методы статистического анализа

Сведения о пациентках, включая паспортную часть, жалобы, анамнез заболевания, сопутствующую патологию, результаты лабораторных и ультразвуковых исследований, были анонимизированы и внесены в базу данных, созданную с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

В рамках исследования проводился анализ как количественных, так и качественных параметров. Количественные параметры были представлены в виде числовых значений, полученных в результате измерений. Качественные показатели, такие как заключения специалистов, диагнозы и прочие описательные характеристики, были преобразованы в категориальные данные путем присвоения им условных символов для последующей обработки и статистического анализа.

Использовались методы описательной статистики. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием непараметрических методов, таких как U-критерий Манна-Уитни, критерий Краскела-Уоллиса, точный критерий Фишера и критерий хи-квадрат. Выбор непараметрических методов обусловлен их применимостью к выборкам малого объема с распределениями, отличными от нормального, что позволяет достоверно оценить различия между группами. Сравнительный анализ частот проводился с использованием аппроксимации нормального распределения. Статистически значимыми считались различия между группами при уровне значимости $p < 0,05$.

Статистическая обработка количественных данных проводилась с использованием программных пакетов Statistica 10.0 (StatSoft) и Microsoft Excel версии 11.8 (Microsoft Corporation).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включено 2185 пациенток, прошедших программу ЭКО, которые, согласно дизайну исследования, были разделены на четыре когорты в зависимости от факторов, влияющих на исходы программ ЭКО. В дальнейшем каждая когорта подразделилась на 2 группы в зависимости от способа культивирования эмбрионов.

Когорту I представляла 671 пациентка с хорошим прогнозом программ ЭКО, которые дополнительно были разделены на группы 1 и 2 в зависимости от способа культивирования:

- *в группу 1* вошла 551 пациентка, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- *группу 2* составили 120 пациенток, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием Time-lapse инкубатора

Когорту II представляли 457 пациенток с «бедным» ответом на гонадотропины в программах ЭКО, которые дополнительно были разделены на группы 3 и 4 в зависимости от способа культивирования:

- *в группу 3* вошли 374 пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- *группу 4* составили 83 пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием Time-lapse инкубатора

Когорту III представляли 399 пациенток с повторными неудачами имплантации в программах ЭКО, которые дополнительно были разделены на группы 5 и 6 в зависимости от способа культивирования:

- *в группу 5* вошли 247 пациенток, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- *группу 6* составили 152 пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием Time-lapse инкубатора

Когорту IV представляли 658 пациенток старшего репродуктивного возраста, которые дополнительно были разделены на группы 7 и 8 в зависимости от способа культивирования:

- *в группу 7* вошли 526 пациенток, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием стандартных инкубаторов;
- *группу 8* составили 132 пациентки, у которых культивирование эмбрионов проводилось с использованием Time-lapse инкубатора (Таблица 1).

Таблица 1 – Распределение пациенток по группам

Когорта	Культивирование в стандартном инкубаторе	Культивирование с применением системы Time-lapse
Когорта I (n=671)	Группа 1	Группа 2
	551	120
Когорта II (n=457)	Группа 3	Группа 4
	374	83
Когорта III (n=399)	Группа 5	Группа 6
	247	152
Когорта IV (n=658)	Группа 7	Группа 8
	526	132

3.1. Клинико-анамнестические данные и лабораторные параметры пациенток, прошедших программу ЭКО и включённых в исследование

При оценке данных клинико-анамнестического обследования группы внутри каждой когорты в целом были сопоставимы по возрасту, типу и факторам бесплодия, овариальному резерву, гормональному профилю, используемому протоколу стимуляции.

При межкогортном сравнении наименьший средний возраст отмечен у пациенток с хорошим прогнозом программ ЭКО, который в группе 1 (культивирование эмбрионов в стандартных инкубаторах) составил 31,31, во 2 группе – культивирование эмбрионов в инкубаторе с применением Time-lapse 31,35 (p=0,768). Во II когорте, у пациенток с «бедным» ответом на гонадотропины в программах ЭКО, средний возраст женщин, культивирование эмбрионов которых проводилось в стандартных условиях составил 36,07, в группе 4 (культивирование эмбрионов в инкубаторе с применением Time-lapse системой) – 37,06 (p=0,783). Возраст с повторными неудачными программами ЭКО в анамнезе в 5 группе (культивирование

эмбрионов с применением стандартных инкубаторов) составил 37,6, а в 6 группе (культивирование эмбрионов в инкубаторе с применением Time-lapse системой) – 36,96 (p=0,645). Средний возраст женщин из когорты IV – пациентки старшего репродуктивного возраста – был самым высоким среди остальных когорт и составлял 38,55 в 7 группе (культивирование эмбрионов с применением стандартных инкубаторов) и 39,05 в 8 группе (культивирование эмбрионов в инкубаторе с применением Time-lapse системой) (p=0,943).

Все пациентки, включённые в исследование, имели нормальный тип телосложения. Средние значения ИМТ соответствовали нормальным значениям и не имели статистически значимых различий при внутрикогортном межгрупповом сравнении в зависимости от способа культивирования эмбрионов: в группе 1 – 24,06 кг/м^2 и в группе 2 – 23,66 кг/м^2 (p=0,674), в 3 группе – 24,85 кг/м^2 и в 4 группе – 24,72 кг/м^2 (p=0,735), в группе 5 – 24,83 кг/м^2 и группе 6 – 24,52кг/м^2 (p=0,794), в группе 7 – 24,88 кг/м^2 и группе 8 – 24,37 кг/м^2 (p=0,874).

У пациенток с хорошим прогнозом успеха программ ЭКО и пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию было выявлено преобладание первичного бесплодия над вторичным. Так, частота первичного бесплодия у пациенток хорошим прогнозом программ ЭКО, в зависимости от способа культивирования в 1 и 2 группах, составляла 56,3% и 55,0% соответственно (p=0,638), с «бедным» ответом на стимуляцию в 3 и 4 группах 51,9% и 44,6% соответственно (p=0,732). Напротив, пациентки с повторными неудачами имплантации и пациентки старшего репродуктивного возраста чаще имели вторичное бесплодие. Процент первичного бесплодия у пациенток 5 и 6 групп составил 32,4% и 34,2% соответственно (p=0,831), у групп 7 и 8 37,6% и 36,3% соответственно (p=0,793).

При анализе факторов, явившихся причинами бесплодия в когорте I – пациентки с хорошим прогнозом успеха программы ЭКО и когорте II – пациентки с «бедным» ответом на стимуляцию суперовуляции более половины исследуемых имели трубно-перитонеальный фактор бесплодия:

56,07% и 56,67% соответственно в 1 и 2 группе исследования (p=0,845), 50,53% и 48,19% соответственно в 3 и 4 группах (p=0,734). В старшем репродуктивном возрасте, вне зависимости от условий культивирования, также наиболее часто встречался трубно-перитонеальный фактор бесплодия: в группе 7 и 8 – 29,27% и 29,54% соответственно (p=0,588). У пациенток с повторными неудачами имплантации наиболее частой причиной бесплодия явился наружно-генитальный эндометриоз, в группе с использованием стандартных инкубаторов – 41,7% и при применении культивирования в инкубаторе с системой Time-lapse – 40,07% (p=0,872) (Таблица 2).

Таблица 2 – Клинико-анамнестические данные пациенток, включённых в исследование

Изучаемые параметры	Когорта I			Когорта II			Когорта III			Когорта IV		
	Группа 1, n=551	Группа 2, n=120	p (1 vs 2)	Группа 3, n=374	Группа 4, n=83	p (3 vs 4)	Группа 5, n=247	Группа 6, n=152	p (5 vs 6)	Группа 7, n=526	Группа 8, n=132	p (7 vs 8)
Средний возраст, лет	31,31	31,53	p=0,768	36,07	37,07	p=0,783	37,6	36,96	p=0,645	38,55	39,05	p=0,943
ИМТ, кг/м^2	24,06	23,66	0,674	24,85	24,72	0,735	24,83	24,52	0,794	24,88	24,37	0,874
Первичное бесплодие, n (%)	310 (56,3%)	66 (55,0%)	0,638	194 (51,9%)	37 (44,6%)	0,732	80 (32,4%)	52 (34,2%)	0,831	198 (37,6%)	48 (36,3%)	p=0,793
Трубно-перитонеальный фактор бесплодия, n (%)	309 (56,07%)	68 (56,67%)	0,845	189 (50,53%)	40 (48,19%)	0,734	75 (30,36%)	48 (31,57%)	0,794	158 (29,27%)	39 (29,54%)	0,588
Наружный генитальный эндометриоз, n (%)	100 (18,15%)	21 (17,5%)	0,794	69 (18,45%)	16 (19,27%)	0,873	103 (41,70%)	62 (40,07%)	0,872	75 (14,25%)	21 (15,91%)	0,537
Неясный генез, n (%)	57 (10,34)	14 (11,66%)	0,695	43 (11,49%)	10 (12,04%)	0,890	11 (4,45%)	7 (4,6%)	0,946	79 (15,01%)	19 (14,39%)	0,498
Эндокринный фактор, n (%)	47 (8,5%)	9 (7,5%)	0,583	28 (7,4%)	6 (7,2%)	0,935	11 (4,45%)	8 (5,2%)	0,647	113 (21,48%)	28 (21,21%)	0,617
Сочетанный фактор, n (%)	38 (6,9%)	8 (6,7%)	0,745	45 (12,0%)	11 (13,6%)	0,748	47 (19,02%)	27 (17,76%)	0,589	101 (19,20%)	25 (18,94%)	0,745

Данные оперативных вмешательств на органах малого таза в анамнезе у исследуемых пациенток включали диагностические и лечебные лапароскопические вмешательства по поводу миом, наружно-генитального эндометриоза, кистозных образований яичников, патологии маточных труб (Таблица 3). Согласно собранным данным, наиболее часто подобные оперативные манипуляции проводились у пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию гонадотропинами (II когорта), в 56,42% у пациенток 3 группы с культивированием эмбрионов в стандартном инкубаторе, и в 54,22% случаев у пациенток с использованием инкубатора с системой Time-lapse (p=0,459). Оперативные гистероскопии в анамнезе проводились у пациенток с гиперпластическими процессами в эндометрии, а также с целью диагностики состояния эндометрия у пациенток с повторными неудачами имплантации, на что указывает наиболее высокая частота их встречаемости у III когорты пациенток, в отличие от остальных когорт. У 5 группы (пациентки с повторными неудачами имплантации с культивированием эмбрионов в стандартных условиях) процент проведённых гистероскопий в анамнезе – 51,01%, в группе 6 (культивирование эмбрионов с использованием инкубатора с системой Time-lapse) – 48,03% (p=0,638). Оперативные вмешательства на шейке матки в анамнезе включали пункционные биопсии, эксцизии и конизации шейки матки. При межкогортном сравнении частота встречаемости оперативных вмешательств на шейке матки в анамнезе оказалась низкой во всех группах исследования и не показала достоверно значимых отличий между исследуемыми группами: в 1 и 2 группах составила 3,09% и 3,33% соответственно (p=0,449), в 3 и 4 группах – 5,61% и 6,02% соответственно (p=0,598), в 5 и 6 группах – 5,26% и 5,61% соответственно (p=0,574), в группах 7 и 8 – 5,32% и 5,30% соответственно (p=0,873).

При анализе акушерского анамнеза у пациенток с вторичным бесплодием при межкогортном сравнении ранние репродуктивные потери наиболее чаще встречались в анамнезе у пациенток с повторными неудачами имплантации: при культивировании в стандартном инкубаторе (группа 5) –

34,73%, при культивировании с использованием инкубатора с системой Time-lapse (группа 6) – 34,78% (p=0,875), а также у пациенток старшего репродуктивного возраста (когорта IV): группа 7 – 36,84% и группа 8 – 38,09% соответственно (p=0,784) (Таблица 4). Внематочные беременности в анамнезе реже встречались у пациенток с хорошим прогнозом программ ЭКО, при культивировании в стандартных инкубаторах (группа 1) – 11,61% и при культивировании в инкубаторе с системой Time-lapse (группа 2) – 16,6% (p=0,364). Частота внематочных беременностей у пациенток с низким ответом на стимуляцию суперовуляции, повторными неудачами имплантации и в старшем репродуктивном возрасте не различалась статистически значимо и составляли в 3 и 4 группе 22,78% и 26,09% соответственно (p=0,458), в группе 5 и 6 – 22,75% и 22,82% соответственно (p=0,827), в 7 и 8 группах – 23,21% и 20,24% соответственно (p=0,675). Данные преждевременных и своевременных родов были сопоставимы при межкогортном и внутригрупповом исследовании и не имели статистически значимого результата.

Таблица 3 – Данные об оперативных вмешательствах в анамнезе у пациенток, включённых в исследование

Изучаемые параметры	Когорта I			Когорта II			Когорта III			Когорта IV		
	Группа 1, n=551	Группа 2, n=120	p (1 vs 2)	Группа 3, n=374	Группа 4, n=83	p (3 vs 4)	Группа 5, n=247	Группа 6, n=152	p (5 vs 6)	Группа 7, n=526	Группа 8, n=132	p (7 vs 8)
Лапароскопические вмешательства в анамнезе, n (%)	87 (15,79%)	23 (19,17%)	0,874	211 (56,42%)	45 (54,22%)	0,459	112 (45,34%)	66 (43,42%)	0,697	234 (44,49%)	59 (44,70%)	0,895
Гистероскопии в анамнезе, n (%)	56 (10,16%)	15 (12,5%)	0,676	98 (26,20%)	24 (28,91%)	0,563	126 (51,01%)	73 (48,03%)	0,638	185 (35,17%)	43 (32,58%)	0,592
Оперативные вмешательства на шейке метки, n (%)	17 (3,09%)	4 (3,33%)	0,449	21 (5,61%)	5 (6,02%)	0,598	13 (5,26%)	7 (4,61%)	0,574	28 (5,32%)	7 (5,30%)	0,873

Таблица 4 – Данные акушерского анамнеза женщин с вторичным бесплодием

Изучаемые параметры	Когорта I			Когорта II			Когорта III			Когорта IV		
	Группа 1, n=241	Группа 2, n=54	p (1 vs 2)	Группа 3, n=180	Группа 4, n=46	p (3 vs 4)	Группа 5, n=167	Группа 6, n=92	p (5 vs 6)	Группа 7, n=323	Группа 8, n=84	p (7 vs 8)
Женщины с ранними репродуктивными потерями в анамнезе, n (%)	56 (23,23%)	14 (25,92%)	0,542	34 (18,89%)	9 (19,56%)	0,658	58 (34,73%)	32 (34,78%)	0,875	119 (36,84%)	32 (38,09%)	0,784
Женщины с внематочными беременностями в анамнезе, n (%)	28 (11,61%)	9 (16,6%)	0,364	41 (22,78%)	12 (26,09%)	0,485	38 (22,75%)	21 (22,82%)	0,827	75 (23,21%)	17 (20,24%)	0,675
Женщины с преждевременными родами в анамнезе, n (%)	26 (10,79%)	6 (11,11%)	0,745	24 (16,11%)	8 (17,39%)	0,693	23 (13,77%)	11 (11,92%)	0,604	29 (8,98%)	9 (10,71%)	0,598
Женщины со своевременными родами в анамнезе, n (%)	189 (78,42%)	43 (79,62%)	0,932	113 (62,78%)	31 (67,39%)	0,546	147 (88,02%)	80 (86,69%)	0,768	221 (68,42%)	61 (72,61%)	0,394

Показатели гормонального статуса пациенток, включённых в исследование, представлены в таблице 5. Согласно данным таблицы, не выявлено статистически значимых различий при межгрупповом исследовании внутри каждой когорты. Однако при межкогортном сравнении пациентки с хорошим прогнозом программ ЭКО имели более высокие показатели овариального резерва, в отличие от остальных когорт. Так, у пациенток с хорошим прогнозом программ ЭКО при культивировании в стандартном инкубаторе (группа1) медиана уровня АМГ составила 3,5 [2,19; 5,51], а у пациенток при культивировании в инкубаторе с системой Time-lapse (группа 2) – 3,56 [2,21; 5,38] (p=0,649). Когорта пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию суперовуляции отличалась сниженным овариальным резервом: у группы 3 (культивирование эмбрионов в стандартных условиях) медиана АМГ составила 1,10 [0,65; 2,17], у пациенток 4 группы (культивирование эмбрионов в инкубаторе с системой Time-lapse) – 1,08 [0,59; 1,78] (p=0,834).

Таблица 5 – Гормональный профиль пациенток, включённых в исследование

Изучаемые параметры	Когорта I			Когорта II			Когорта III			Когорта IV		
	Группа 1, n=551	Группа 2, n=120	p (1 vs 2)	Группа 3, n=374	Группа 4, n=83	p (3 vs 4)	Группа 5, n=247	Группа 6, n=152	p (5 vs 6)	Группа 7, n=526	Группа 8, n=132	p (7 vs 8)
АМГ нг/мл, (Me [L;H])	3,5 [2,19; 5,51]	3,56 [2,21; 5,38]	0,649	1,10 [0,65; 2,17]	1,08 [0,59; 1,78]	0,834	1,85 [1,18; 3,6]	1,86 [1,20; 3,54]	0,846	1,90 [1,20; 3,19]	2,00 [1,27; 3,27]	0,857
ФСГ, мМЕ/мл	7,21 [5,48; 9;85]	7,63 [5,86; 9,34]	0,839	8,43 [6,75; 10,76]	7,97 [6,12; 9,54]	0,583	8,24 [7,23; 9,65]	8,42 [6,96; 10,32]	0,850	9,56 [7,87; 11,43]	10,13 [8,32; 11,65]	0,584
ЛГ, мМЕ/мл	5,43 [4,34; 6,98]	5,81 [4,64; 6,50]	0,642	6,33 [5,52; 8,75]	7,62 [5,12; 9,34]	0,693	7,32 [4,14; 9,35]	7,95 [4,03; 9,12]	0,694	6,70 [5,52; 11,75]	7,32 [4,87; 12,03]	0,692
Эстрадиол, мМЕ/мл	178 [102; 215]	192 [114; 198]	0,746	112 [95; 243]	121 [100; 315]	0,846	123 [85; 232]	117 [78; 195]	0,765	98 [72; 134]	89 [70; 128]	0,734

3.2. Анализ параметров циклов стимуляции суперовуляции

Всем пациенткам, вошедшим в исследование, была проведена стандартная программа ЭКО. Статистический анализ вида проводимого протокола не выявил значимых различий в группах внутри когорт. Однако стоит отметить преобладание выбора протоколов с антагонистами ГнРГ в когорте пациенток с хорошим прогнозом программ ЭКО: группа 1 (культивирование в стандартном инкубаторе) – 65,9%, группа 2 (культивирование в инкубаторе с использованием системы Time-lapse) – 65,8% (p=0,568). Такая же зависимость наблюдается у пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию, у которых в группе с использованием стандартного инкубатора процент использования протокола с антагонистами ГнРГ составил 67,1%, а при культивировании в инкубаторе с системой Time-lapse – 71,1% (p=0,683). Обратная картина наблюдается в когорте пациенток с повторными неудачами имплантации, у которых наиболее часто проводился протокол с агонистами ГнРГ, в группе пациенток с культивированием эмбрионов в стандартном инкубаторе – в 60,07% случаев, при культивировании в инкубаторе с системой Time-lapse – в 59,21% случаев (p=0,914). У пациенток старшего репродуктивного возраста не отмечено значимого различия в виде протокола вне зависимости от способа культивирования (Таблица 6).

Таблица 6 – Характеристика групп по виду протокола

Когорта	Протокол	Культивирование в стандартном инкубаторе	Культивирование с применением системы Time-lapse	p
Когорта I		Группа 1 (n=551)	Группа 2 (n=120)	
	Протокол с антГнРГ	65,9% (363)	65,8% (79)	0,568
	Протокол с аГнРГ	34,1% (188)	34,2% (41)	0,683
Когорта II		Группа 3 (n=374)	Группа 4 (n=83)	
	Протокол с антГнРГ	67,10% (251)	71,1% (59)	0,723
	Протокол с аГнРГ	32,90% (123)	28,9% (24)	0,512
Когорта III		Группа 5 (n=247)	Группа 6 (n=152)	
	Протокол с антГнРГ	39,92% (97)	40,79% (62)	0,746
	Протокол с аГнРГ	60,07% (150)	59,21% (90)	0,914
Когорта IV		Группа 7 (n=526)	Группа 8 (n=132)	
	Протокол с антГнРГ	47,72% (251)	47,73% (63)	0,748
	Протокол с аГнРГ	52,28% (275)	52,27% (69)	0,698

3.3. Анализ параметров этапа раннего эмбриогенеза в зависимости от способа культивирования

Для решения 1 задачи исследования нами были проанализированы параметры этапа раннего эмбриогенеза у пациенток, включённых в исследование. Согласно дизайну исследования, на 1 этапе нами был проведен сравнительный анализ результатов этапа раннего эмбриогенеза в зависимости от способа культивирования эмбрионов в неселективной популяции пациенток. При оценке частоты оплодотворения не наблюдается достоверно значимой разницы в способе культивирования эмбрионов между стандартным инкубатором – 65,86% и инкубатором с системой Time-lapse – 64,64% (p=0,674). Применение инкубатора с системой Time-lapse в неселективной популяции обеспечило генерацию сопоставимого процента бластоцист хорошего качества 48,32% и 49,19% соответственно (p=0,734). Также применение стандартного инкубатора и инкубатора с системой Time-lapse не сопровождалось статистически значимым различием по частоте «незавершенных» циклов, в которых не удавалось получить пригодные к переносу бластоцисты (13,36% и 10,79%, p=0,395) (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты культивирования эмбрионов при культивировании в стандартном инкубаторе и инкубаторе с системой Time-lapse в неселективной популяции

Параметры		**Культивирование в стандартном инкубаторе**	**Культивирование с применением системы Time-lapse**	**p**
Количество циклов (n=2185)		1698	487	
Количество ооцитов		11691	3554	
Показатели оплодотворения	абс	7700	2297	
	% от числа ооцитов	65,86%	64,64%	0,674
Количество полученных качественных бластоцист	абс	3875	1130	
	% от числа зигот всего	48,32%	49,19%	0,734

Циклы, не сопровождавшиеся получением качественных бластоцист	абс	518	122	
	% от числа всех циклов	13,36%	10,79%	0,395

Далее, согласно дизайну исследования, нами была проведена прицельная оценка параметров оплодотворения у инфертильных пациенток с хорошим прогнозом программы ЭКО, которая, как и в неселективной популяции, показала отсутствие статистически значимой разницы в показателях оплодотворения (65,71% против 66,02%, p=0,492). Также отсутствуют достоверные отличия в показателях генерации бластоцист хорошего качества (71,31% против 69,94%, p=0,512), и в данных по «незавершенным» циклам (8,5% против 6,7%, p=0,274) (Таблица 8).

Таблица 8 – Результаты культивирования эмбрионов при культивировании в стандартном инкубаторе и инкубаторе с системой Time-lapse в когорте инфертильных женщин с хорошим прогнозом успеха ЭКО (когорта I)

Параметры		**Культивирование в стандартном инкубаторе (группа 1)**	**Культивирование с применением системы Time-lapse (группа 2)**	**p**
Количество циклов (n=671)		551	120	
Количество ооцитов		5596	1189	
Показатели оплодотворения	абс	3677	785	
	% от числа ооцитов	65,71%	66,02%	0,492
Количество полученных качественных бластоцист	абс	2622	549	
	% от числа зигот всего	71,31%	69,94%	0,512
Циклы, не сопровождавшиеся получением качественных бластоцист	абс	47	8	
	% от числа всех циклов	8,5%	6,7%	0,274

В таблице 9 представлены данные этапа раннего эмбриогенеза инфертильных пациенток с «бедным» ответом на гонадотропины. Оценка показателей оплодотворения не показала статистически значимой разницы между способами культивирования (70,08% против 69,23%, p=0,491). При культивировании в стандартном инкубаторе выход бластоцист хорошего качества составил 40,09% против 45,52% при культивировании эмбрионов в инкубаторе с использованием системы Time-lapse, что также не показало достоверных отличий между группами (p=0,231). Аналогичная закономерность наблюдается в частоте «незавершенных» циклов (59,95% и 50,60%, p=0,198).

Таблица 9 – Результаты культивирования эмбрионов при культивировании в стандартном инкубаторе и инкубаторе с системой Time-lapse в когорте инфертильных женщин с бедным ответом на гонадотропины (когорта II)

Параметры		**Культивирование в стандартном инкубаторе (группа 3)**	**Культивирование с применением системы Time-lapse (группа 4)**	**p**
Количество циклов (n=457)		374	83	
Количество ооцитов		234	156	
Показатели оплодотворения	абс	171	108	
	% от числа ооцитов	70,08%	69,23%	0,491
Количество полученных качественных бластоцист	абс	70	47	
	% от числа зигот	40,09%	45,52%	0,231
Циклы, не сопровождавшиеся получением качественных бластоцист	абс	213	42	
	% от числа всех циклов	59,95%	50,60%	0,198

Отдельно нами была проведена оценка этапа раннего эмбриогенеза в когорте инфертильных пациенток с повторными неудачами имплантации.

Сходно с предыдущими когортами, у данной когорты пациенток отсутствует достоверно значимая разница в показателях оплодотворения (65,38% против 66,14%, p=0,325), получения качественных бластоцист (33,46% против 33,86%, p=0,481) и «незавершенных» циклов (35,63% против 28,95%, p=0,219) (Таблица 10).

Таблица 10 – Результаты культивирования эмбрионов при культивировании в стандартном инкубаторе и инкубаторе с системой Time-lapse в когорте инфертильных женщин с повторными неудачами имплантации (когорта III)

Параметры		**Культивирование в стандартном инкубаторе (группа 5)**	**Культивирование с применением системы Time-lapse (группа 6)**	**p**
Количество циклов (n=399)		247	152	
Количество ооцитов		1632	1173	
Показатели оплодотворения	абс	1067	756	
	% от числа ооцитов	65,38%	66,14%	0,325
Количество полученных качественных бластоцист	абс	357	256	
	% от числа зигот	33,46%	33,86%	0,481
Циклы, не сопровождавшиеся получением качественных бластоцист	абс	88	44	
	% от числа всех циклов	35,63%	28,95%	0,219

У инфертильных пациенток старшего репродуктивного возраста также отсутствовали достоверные различия по данным показателя оплодотворения (65,85% против 66,02%, p=0,843). Однако у пациенток группы 8 с применением культивирования в инкубаторе с системой Time-lapse число полученных бластоцист хорошего качества оказалось достоверно больше (40,64% против 29,66%, p=0,025). Также отмечалась тенденция к достоверно меньшему числу «незавершенных» циклов у пациенток при культивировании

с использованием системы Time-lapse (21,21% против 32,32%, p=0,032) (Таблица 11).

Таблица 11 – Результаты культивирования эмбрионов при культивировании в стандартном инкубаторе и инкубаторе с системой Time-lapse в когорте инфертильных женщин позднего репродуктивного возраста (IV когорта)

Параметры		**Культивирование в стандартном инкубаторе (группа 7)**	**Культивирование с применением системы Time-lapse (группа 8)**	**p**
Количество циклов (n=658)		526	132	
Количество ооцитов всего		4229	1036	
Показатели оплодотворения	абс	2785	648	
	% от числа ооцитов	65,85%	66,02%	0,743
Количество полученных качественных бластоцист	абс	826	278	
	% от числа зигот	29,66%	40,64%	0,025
Циклы, не сопровождавшиеся получением качественных бластоцист	абс	170	28	
	% от числа всех циклов	32,32%	21,21%	0,032

При проведении межкогортного анализа данных, у пациенток с «бедным» ответом на гонадотропины, пациенток с повторными неудачами имплантации и пациенток позднего репродуктивного возраста демонстрируется меньший процент генерации качественных бластоцист, в отличие от пациенток I когорты с хорошим прогнозом программ ЭКО. Также у пациенток I когорты процент «незавершенных» циклов значительно ниже по сравнению с остальными когортами.

3.4. Анализ частоты наступления беременности и ранних репродуктивных потерь в представленных когортах пациенток в зависимости от способа культивирования эмбрионов

Согласно дизайну, на 2 этапе исследования для решения 3 и 4 поставленных задач была проведена оценка ЧНБ и частоты ранних репродуктивных потерь у пациенток в зависимости от прогноза программ ЭКО.

При оценке данных параметров у когорты инфертильных пациенток с хорошим прогнозом программ ЭКО не выявлено статистически значимой разницы по ЧНБ (42,05% против 44,44%, p=0,684) и ранним репродуктивным потерям (10,76% против 10,71%, p=0,964), независимо от способа культивирования эмбрионов (Таблица 12).

Таблица 12 – Частота наступления беременности и ранние репродуктивные потери при культивировании эмбрионов в стандартном инкубаторе и инкубаторе с системой Time-lapse в когорте инфертильных женщин с хорошим прогнозом успеха ЭКО (когорта I)

Параметры		**Культивирование в стандартном инкубаторе (группа 1)**	**Культивирование с применением системы Time-lapse (группа 2)**	**p**
Перенесено эмбрионов (n=365)	абс	302	63	
Частота наступления беременности	абс	130	28	
	% от числа переносов	43,05%	44,44%	0,684
Частота ранних репродуктивных потерь (n=17)	абс	14	3	
	% от ЧНБ	10,76%	10,71%	0,964

Результаты анализа данных пациенток второй когорты (с низким ответом на стимуляцию суперовуляции), представленные в таблице 13, свидетельствуют об отсутствии статистически значимых различий в частоте наступления беременности (ЧНБ) между группами, использующими

различные способы культивирования (39,82% при стандартном культивировании против 42,11% при культивировании с Time-lapse системой, p=0,543). Аналогично, не выявлено достоверных различий в частоте ранних репродуктивных потерь между этими группами (15,56% при стандартном культивировании против 10,52% при культивировании с Time-lapse системой, p=0,375). Таким образом, способ культивирования эмбрионов не оказал существенного влияния на ЧНБ и частоту ранних репродуктивных потерь у пациенток с низким ответом на стимуляцию суперовуляции.

Таблица 13 – Частота наступления беременности и ранние репродуктивные потери при культивировании эмбрионов в стандартном инкубаторе и инкубаторе с системой Time-lapse в когорте инфертильных женщин с «бедным» ответом на гонадотропины (когорта II)

Параметры		**Культивирование в стандартном инкубаторе (группа 3)**	**Культивирование с применением системы Time-lapse (группа 4)**	**p**
Перенесено эмбрионов (n=132)	абс	113	19	
Частота наступления беременности	абс	45	8	
	% от числа переносов	39,82%	42,11%	0,543
Частота ранних репродуктивных потерь (n=7)	абс	7	2	
	% от ЧНБ	15,56%	10,52%	0,375

Анализ данных, проведённый у инфертильных пациенток с повторными неудачами имплантации аналогично предыдущим когортам, показывает отсутствие статистически значимых различий как по показателю ЧНБ у пациенток с применением стандартного способа культивирования и культивирования с Time-lapse системой (39,77% против 41,46%, p=0,592), так и по показателю ранних репродуктивных потерь (8,7% против 5,8%, p=0,489) (Таблица 14).

Таблица 14 – Частота наступления беременности и ранние репродуктивные потери при культивировании эмбрионов в стандартном инкубаторе и инкубаторе с системой Time-lapse в когорте инфертильных женщин с повторными неудачами имплантации (когорта III)

Параметры		**Культивирование в стандартном инкубаторе (группа 5)**	**Культивирование с применением системы Time-lapse (группа 6)**	**p**
Перенесено эмбрионов (n=129)	абс	88	41	
Частота наступления беременности	абс	35	17	
	% от числа переносов	39,77%	41,46%	0,593
Частота ранних репродуктивных потерь (n=7)	абс	3	1	
	% от ЧНБ	8,7%	5,8%	0,489

Данные пациенток старшего репродуктивного возраста, представленные в таблице 15, продемонстрировали отсутствие достоверных различий между используемым способом культивирования в показателях ЧНБ (24,87% против 28,57%, p=0,671) и ранних репродуктивных потерь (35,41% против 33,33%, p=0,285).

Таблица 15 – Частота наступления беременности и ранние репродуктивные потери при культивировании эмбрионов в стандартном инкубаторе и инкубаторе с системой Time-lapse в когорте инфертильных женщин позднего репродуктивного возраста (IV когорта)

Параметры		**Культивирование в стандартном инкубаторе (группа 7)**	**Культивирование с применением системы Time-lapse (группа 8)**	**p**
Перенесено эмбрионов (n=214)	абс	193	21	
Частота наступления беременности	абс	48	6	

	% от числа переносов	24,87%	28,57%	0,671
Частота ранних репродуктивных потерь (n=28)	абс	17	2	
	% от ЧНБ	35,41%	33,33%	0,285

Результаты межкогортного исследования демонстрируют, что пациентки старшего репродуктивного возраста характеризуются сниженной частотой наступления беременности и повышенным риском репродуктивных потерь. Когорта II – пациентки с «бедным» ответом на стимуляцию гонадотропинами и повторными неудачами имплантации (когорта III), независимо от используемой технологии культивирования эмбрионов, также ассоциировались с более низкими значениями показателей ЧНБ в сравнении с пациентками с хорошим прогнозом программ ЭКО.

3.5. Анализ результатов ПГТ-А в зависимости от способа культивирования эмбрионов и возраста пациентов

Согласно задачам и дизайну исследования, нами была сформирована отдельная группа пациенток, которым было проведено ПГТ-А. Данная группа была подразделена на 2 подгруппы в зависимости от возраста пациенток: на младший репродуктивный возраст (<36 лет) и старший репродуктивный возраст (≥36 лет).

Анализ результатов ПГТ-А не показал достоверного преимущества одного из способов культивирования и обеспечил сопоставимую частоту получения бластоцист как в подгруппе молодого репродуктивного возраста (70,91% и 78,88%, p=0,412), так и в подгруппе старшего репродуктивного возраста (49,82% и 46,92%, p=0,425). Анализ плоидности эмбрионов выявил, что у пациенток молодого репродуктивного возраста наблюдалось статистически значимо большее количество эуплоидных эмбрионов как при стандартном культивировании (70,91% против 49,82% у пациенток старшего

возраста, p=0,003), так и при использовании Time-lapse системы (78,88% против 46,92%, p=0,005). (Таблица 16).

Таблица 16 – Результаты ПГТ-А при культивировании эмбрионов с применением стандартной и Time-lapse технологии

Сравниваемые группы пациенток с разным прогнозом успешного использования ЭКО		**Культивирование в стандартном инкубаторе (n = 338)**	**Культивирование с применением системы Time-lapse (n = 243)**	**P**
Количество эмбрионов, которым проведено ПГТ-А (пациентки молодого репродуктивного возраста (n=88))		55	33	
Количество эмбрионов, рекомендованных к переносу (пациентки в возрасте <36 лет)	Абс	39	26	
	%	70,91%*	78,88%*	0,412
Количество эмбрионов, которым проведено ПГТ-А (пациентки старшего репродуктивного возраста (n=493))		283	210	
Количество эмбрионов, рекомендованных к переносу (пациентки старшего репродуктивного возраста ≥36 лет)	Абс	141	97	
	%	49,82%**	46,92%**	0,425
P между * vs**		0,003	0,005	

Далее, для решения задачи 5, нами была проведена оценка корреляционной связи между морфокинетическими параметрами эмбрионов, культивируемых в инкубаторе с системой Time-lapse с учётом их бальной характеристики по шкале KS5 и возрастом исследуемых пациенток. Бластоцисты хорошего качества, полученные на 5 сутки культивирования, были разделены на 2 группы, в зависимости от возраста пациентки.

У пациенток старше 36 лет, по сравнению с пациентками молодого репродуктивного возраста, частота эмбрионов с низкой суммой баллов была в два раза выше (24,0% против 12,16%, p=0,003), а частота эмбрионов с высокой

оценкой морфокинетических параметров — в два раза ниже (20,21% против 42,08%, p=0,007). Доли полученных бластоцист, имеющих среднюю сумму баллов достоверно не отличались и составляли 45,75% и 55,78%, (p=0,493) (Таблица 17).

Таблица 17 – Распределение полученных бластоцист с учётом бальной оценки их морфокинетических параметров по шкале KIDScore D5 и возраста обследованных женщин

Сумма баллов по шкале KIDScore D5		**Бластоцисты, полученные у пациенток молодого репродуктивного возраста (n=518)**	**Бластоцисты, полученные у пациенток старшего репродуктивного возраста (n=475)**	**p**
Низкая сумма баллов (от 1 до 4,0)	Абс.	63	114	
	%	12,16%	24,00%	0,003
Средняя сумма баллов (от 4,1 до 7,0)	Абс.	237	265	
	%	45,75%	55,78%	0,493
Высокая сумма баллов (от 7,1 до 9,9)	Абс.	218	96	
	%	42,08%	20,21%	0,007

С целью оценки корреляционной связи между частотой анеуплоидии эмбрионов, культивируемых в инкубаторе с системой Time-lapse, их бальной характеристики по шкале KS5 и возрастом исследуемых пациенток, анеуплоидные эмбрионы, по данным ПГТ-А, были разделены на 2 группы, в зависимости от возраста пациенток. Количество эмбрионов составило 146 и 289 в молодом и старшем репродуктивном возрасте соответственно. Число эмбрионов с низкой суммой баллов у пациенток молодого репродуктивного возраста – 32, средней суммой баллов – 58, высокой суммой баллов – 56. В старшем репродуктивном возрасте данные подгруппы составили 91 эмбрион, 74 эмбриона, 43 эмбриона соответственно.

Частота анеуплоидных эмбрионов с низкой, средней и высокой оценкой в зависимости от молодого и старшего репродуктивного возраста составила соответственно 71,87% против 81,25% (p=0,009); 51,72% против 64,35%

(p=0,004) и 37,5% против 69,35% (p=0,001). Из полученных результатов следует, что частота эмбриональной анеуплоидии нарастает при ухудшении морфокинетических параметров развивающихся эмбрионов во всех возрастных группах, однако у женщин старше 36 лет это явление проявляет себя более контрастно (Рисунок 6)

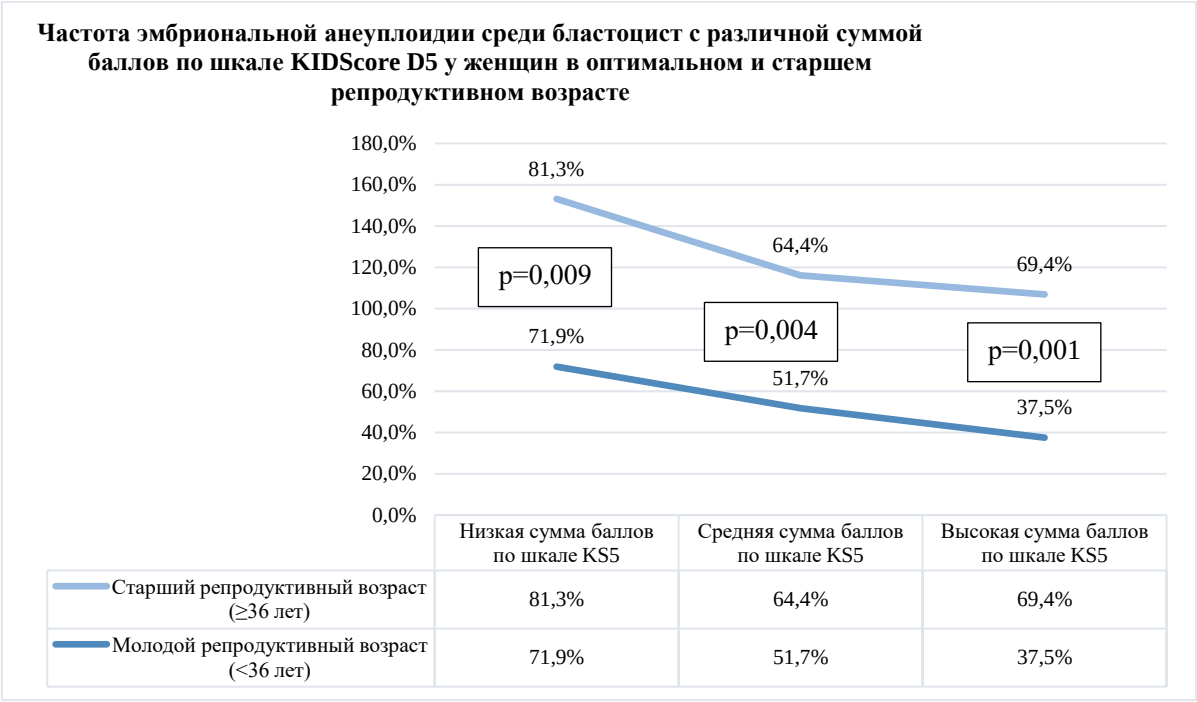


Рисунок 6 – Частота эмбриональной анеуплоидии среди бластоцист с различной суммой баллов по шкале KIDScore D5 у женщин в зависимости от возраста

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование продемонстрировало, что применение Time-lapse технологии культивирования эмбрионов не обеспечивает достоверного увеличения ЧНБ при переносе эмбрионов и не сопровождается сокращением частоты ранних репродуктивных потерь по сравнению с культивированием в стандартном инкубаторе. Таким образом, подтверждены данные предыдущих исследований. Причем это было показано применительно к селективно выбранным когортам, которые имели разный прогноз результативности ЭКО. Различия были связаны с возрастом пациенток (моложе или старше 36 лет), результатами проведенных программ ЭКО в анамнезе (наличие/отсутствие сведений на три и более выполненных безуспешных попытки ЭКО), а также с характером ответа на стимуляцию (наличие/отсутствие бедного ответа).

Применение time-lapse технологии культивирования эмбрионов способствует повышению выхода бластоцист высокого качества и снижению частоты «незавершенных» циклов ЭКО, связанных с отсутствием эмбрионов, пригодных для переноса. При этом в когорте пациенток старшего репродуктивного возраста достоверно ($p < 0,05$) различие между группами, где использовалось культивирование эмбрионов в стандартном инкубаторе и инкубаторе с применением системы Time-lapse, по показателям числа полученных качественных бластоцист и по частоте «незавершенных» циклов. Таким образом, было показано, что применение инкубатора с системой Time-lapse способствует возрастанию кумулятивной ЧНБ на каждый стимулированный цикл, хотя и не обеспечивает увеличения показателя ЧНБпэ при переносе эмбрионов в нативном цикле стимуляции. Это позволяет сократить частоту «незавершенных» циклов и получить большее число эмбрионов хорошего качества и осуществлять больше переносов в пересчете на один стимулированный цикл, поскольку выполняется за счет криоконсервации оставшихся эмбрионов и их последующего использования. Эта закономерность наиболее заметна у пациенток старшего репродуктивного возраста, что обосновывает целесообразность применения Time-lapse

инкубатора в первую очередь у женщин старше 36 лет вместо традиционного инкубатора.

Интеграция Time-lapse систем в инновационные инкубаторы оптимизирует эмбриологический рабочий процесс и лабораторную логистику. Непрерывный видеомониторинг обеспечивает динамическую оценку эмбрионального развития без нарушения условий культивирования, исключая необходимость извлечения эмбрионов из среды для наблюдения. [92,93,94]. Предполагается, что использование Time-lapse систем в инкубаторах, минимизируя воздействие на эмбрионы и оптимизируя отбор бластоцист на основе комплексной оценки (морфокинетической и по шкале Гарднера), способствует повышению частоты наступления клинической беременности в циклах ЭКО. Но до настоящего времени убедительных данных, подтверждающих это предположение, так и не было получено. Метаанализ девяти рандомизированных контролируемых исследований, проведенный S. Armstrong и коллегами, не выявил статистически значимой разницы в частоте наступления клинической беременности при культивировании эмбрионов в стандартных инкубаторах и инкубаторах, оснащенных Time-lapse системой. [95]. Аналогичные результаты получили Ahlström A. и соавторы в своем двойном слепом рандомизированном контролируемом исследовании. Они продемонстрировали, что частота наступления клинической беременности и частота преждевременных потерь беременности были практически идентичны в группах, где эмбрионы культивировались в стандартных инкубаторах и в инкубаторах с TLT [96].

Изучение клинической пользы Time-lapse технологии, по нашему мнению, во многом зависит от правильного формирования групп для сравнения. При оценке результатов применения стандартных инкубаторов и инкубаторов с системой Time-lapse обычно исследователи включают всех пациенток, которые проходят лечение в клиниках. Следует учитывать, что индивидуальные особенности клинического статуса пациенток могут оказывать независимое негативное влияние на результативность программ

экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), внося вариабельность в исходы и затрудняя интерпретацию эффективности специфических методик, таких как TLT. Исходя из этого обстоятельства, в нашем исследовании сравнение двух технологий культивирования – в стандартных инкубаторах и инкубаторах с системой Time-lapse – на показатели эмбриогенеза проводились не только в общей (неселективной) популяции пациенток с бесплодием, но и у пациенток, которые были распределены по когортам в зависимости наличия у них таких факторов, как поздний репродуктивный возраст, бедный ответ на стимуляцию суперовуляции и неудачные имплантации в анамнезе при предыдущих попытках ЭКО (причем неудачные имплантации могли быть повторными). Пациентки с хорошим прогнозом ЭКО по показателю частоты наступления беременности, которые не имели указанных факторов, составляли контрольную группу.

В нашем исследовании было показано, что у женщин с хорошим прогнозом результатов ЭКО применение различных типов инкубаторов действительно практически не оказывает влияния на результаты эмбриогенеза. Это наблюдение позволяет предположить, что отсутствие различий в частоте наступления клинической беременности между традиционным культивированием и применением Time-lapse технологии, выявленное в некоторых исследованиях, может быть обусловлено неоднородностью исследуемых групп по прогностическим факторам. Возможно, преобладание пациенток с благоприятным прогнозом на успех ЭКО в этих исследованиях нивелировало потенциальные преимущества Time-lapse технологии, которые могли бы быть более выражены в группах с исходно сниженным репродуктивным потенциалом. Отсутствие стратификации пациенток затрудняет интерпретацию полученных результатов и оценку реального вклада Time-lapse технологии в повышение эффективности ЭКО.

В том случае, если пациенток изначально делили на когорты с учетом наличия потенциально негативных факторов для реализации терапевтического потенциала ЭКО, полученные результаты существенно

различались. Наше исследование выявило статистически значимое снижение эффективности эмбриогенеза у женщин позднего репродуктивного возраста, с «бедным» ответом на стимуляцию яичников и повторными неудачами имплантации. В частности, у этих пациенток наблюдалось снижение частоты формирования качественных бластоцист и увеличение количества циклов ЭКО, прерванных из-за отсутствия эмбрионов, пригодных для переноса, по сравнению с контрольной группой. Эти различия выявлялись при использовании как стандартных, так и инкубаторов с системой Time-lapse. Однако негативное влияние на эмбриогенез указанных факторов несколько нивелировалось при применении инкубатора с системой Time-lapse, по сравнению с культивированием в стандартном планшетном инкубаторе. Особенно статистически значимым оказался «смягчающий» эффект у женщин старшего репродуктивного возраста при культивировании с использованием технологии Time-lapse инкубатора.

Таким образом, в нашем исследовании было показано что наибольшая клиническая польза от применения Time-lapse технологии возможна при применении её у пациенток старшего репродуктивного возраста (старше 36 лет). Многочисленные исследования свидетельствуют о возраст-ассоциированных изменениях метаболических процессов в репродуктивной системе, коррелирующих со снижением качества ооцитов и уменьшением резистентности эмбрионов к стрессовым факторам. Это, безусловно, может влиять на правильное развитие эмбрионов в обычных планшетных инкубаторах при осуществлении оценки их активности. При применении Time-lapse-инкубаторов отсутствует необходимость частого извлечения эмбрионов из рабочей камеры для оценки их активности на протяжении всего периода культивирования. Именно поэтому значительно нивелируются стрессовые факторы, что и является объяснением получения лучших результатов культивирования с использованием Time-lapse технологии.

Лучшие показатели эмбриогенеза были получены при культивировании в TLT-инкубаторе также в когортах пациенток с бедным ответом на

гонадотропины и повторными неудачами имплантации, хотя эти изменения были и не столь существенны, как у женщин в возрасте старше 36 лет. Для повышения эффективности ЭКО у пациенток данных категорий представляется перспективным применение инкубаторов, оснащенных системой Time-lapse мониторинга эмбрионального развития.

В нашем исследовании мы подтвердили, что для пациенток с хорошим прогнозом ЭКО (женщин в возрасте до 36 лет, женщин с хорошим ответом на стимуляцию гонадотропинами и отсутствием в анамнезе повторных неудач имплантации) в программе лечения не имеет значения, в каком инкубаторе осуществляется культивирование эмбрионов (в стандартном планшетном или с технологией Time-lapse). Данный вывод вытекает из результатов собственных исследований, в которых было показано, что при сравнении технологий культивирования не выявлено достоверных различий в оцениваемых показателях эмбриогенеза.

В настоящее время одним из определяющих факторов результативности ЭКО многими авторами признается важность эмбриологического этапа. При этом ведущее значение имеет оценка переносимых эмбрионов [97]. В традиционных CO2-инкубаторах оценка готовности эмбрионов к переносу базируется на морфологических критериях, определяемых в дискретные временные точки на протяжении всего периода культивирования. Анализ морфологии включает оценку пронуклеусов и ядрышек, количества, размера и формы бластомеров, степени фрагментации, наличия мультинуклеации, экспансии бластоцисты, а также характеристик внутренней клеточной массы и трофэктодермы на соответствующих стадиях развития. На завершающем этапе культивирования эмбрионов до стадии бластоцисты проводится окончательная морфологическая оценка. Оценка пригодности бластоцисты к переносу или криоконсервации осуществляется на основе интегральной оценки морфологических параметров по шкале Д. Гарднера [98]. Данная классификация учитывает стадию развития бластоцисты и статус хетчинга (цифровой индекс от 1 до 6), а также характеристики внутренней клеточной

массы и трофэктодермы (буквенный индекс: A, B, C). К 5-6 дню культивирования in vitro, при условии нормального развития, приблизительно 50% эмбрионов достигают стадии бластоцисты. Оптимальными для переноса или криоконсервации считаются бластоцисты, соответствующие морфологическим критериям 2BB-6AA.

После появления Time-lapse системы к гарднеровским критериям оценки качества эмбрионов добавилась возможность оценки морфокинетических параметров [7,12,43]. Это стало возможным, поскольку наблюдение за развитием эмбрионов в Time-lapse инкубаторах происходит круглосуточно в режиме реального времени. Непрерывный мониторинг эмбрионального развития позволяет регистрировать динамические параметры, которые могут быть упущены при традиционной дискретной оценке, проводимой в фиксированные временные точки. К таким параметрам относятся аномалии клеточного деления, включая прямое и обратное дробление бластомеров [99], нарушения динамики пронуклеусов, такие как беспорядочное движение и замедленное разрушение ядерных оболочек [100], а также отклонения от нормальных сроков начала кавитации [101]. Эти данные предоставляют дополнительную информацию о качестве эмбрионов и могут быть использованы для более точного прогнозирования их имплантационного потенциала. Возможно, что отсутствие этой информации при традиционном культивировании может приводить к нарушениям в ранжировании эмбрионов по качеству. Именно этим и объясняется важность применения Time-lapse системы. Более того, очевидным преимуществом инкубаторов с системой Time-lapse перед традиционными аналогами является их большее удобство для работы эмбриологов, поскольку можно не извлекать развивающиеся эмбрионы из инкубаторов для мониторинга их развития и оценки их качества [4,5,6].

Значимым преимуществом Time-lapse систем является возможность генерирования видеодокументации эмбрионального развития. Эта документация формируется путем последовательной цифровой регистрации

изображений эмбрионов в различных плоскостях фокусировки с заданным временным интервалом. Полученные серии изображений компилируются в видеофайл, предоставляющий непрерывную визуализацию динамики развития. Это позволяет документировать происходящие события и затем проводить углубленный анализ видеоизображений в любое время с возможным привлечением дополнительных экспертов. Безусловно, это повышает качество эмбриологической диагностики. Архивные данные Time-lapse наблюдений могут быть эффективно использованы для образовательных целей в подготовке специалистов-эмбриологов, а также для межлабораторного обмена информацией и формирования общих баз данных [102,103]. Несмотря на перспективность использования морфокинетических параметров для оценки качества эмбрионов, в настоящее время отсутствуют стандартизированные критерии интерпретации данных Time-lapse мониторинга. Вследствие этого, оценка патологической значимости наблюдаемых отклонений в динамике эмбрионального развития представляет собой сложную задачу [46]. Для разработки надежных прогностических моделей, основанных на морфокинетических параметрах, необходимы дальнейшие исследования, направленные на систематизацию и стандартизацию критериев оценки динамики эмбрионального развития.

В работах разных авторов было показано, что именно исключение стресса, который связан с извлечением эмбрионов из рабочей камеры инкубатора, может служить улучшением условий для эмбриогенеза, а, следовательно, повышению качества получаемых для переноса эмбрионов [5,46]. Предполагается, что минимизация воздействия флуктуаций атмосферных условий на метаболизм клеток в условиях непрерывного культивирования положительно влияет на морфологические характеристики развивающихся эмбрионов. Однако до выполнения нашего исследования не было четкого представления о влиянии Time-lapse технологии клеточного культивирования за счет исключения метаболического стресса при

извлечении эмбрионов из камеры инкубатора на возможность уменьшения частоты анеуплоидии среди отбираемых для переноса бластоцист.

Настоящее исследование продемонстрировало снижение количества бластоцист, пригодных для переноса, у женщин позднего репродуктивного возраста. Это обусловлено повышенной частотой выявления анеуплоидии при применении преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А). А количество анеуплоидных эмбрионов в этой возрастной группе возрастает практически вдвое. Причем это проявлялось независимо от применяемой технологии культивирования – в традиционно планшетном инкубаторе или в инкубаторе time-lapse.

Статистически значимых различий в количестве эуплоидных эмбрионов, пригодных для переноса, между возрастными группами (до 36 лет и старше 36 лет) не выявлено, независимо от применяемой технологии культивирования.

Полученные данные свидетельствуют о значительном увеличении частоты анеуплоидии у женщин старше 36 лет, независимо от использования Time-lapse технологии. Это приводит к существенному снижению доли бластоцист, пригодных для переноса или криоконсервации. Кроме того, у пациенток старшей возрастной группы наблюдается уменьшение доли эуплоидных эмбрионов по сравнению с женщинами до 36 лет, что также не коррелирует с типом используемого инкубатора.

Результаты исследования демонстрируют, что применение Time-lapse технологии не приводит к увеличению частоты образования эуплоидных эмбрионов по сравнению с традиционными методами культивирования. Это позволяет предположить, что частота эмбриональной анеуплоидии не связана с наличием или отсутствием метаболического стресса, индуцированного воздействием атмосферных условий при извлечении эмбрионов из инкубатора, что доказывает отсутствие влияния использованных инкубаторов на плоидный статус выращиваемых эмбрионов.

Данные результаты позволяют утверждать, что ПГТ-А необходимо выполнять, независимо от применяемой технологии культивирования, т.е. открытого или закрытого типа. Это особенно должно быть рекомендовано для пациенток старшего возраста, у которых значительно возрастает доля анеуплоидных эмбрионов.

При оценке эмбрионов по шкале KS5 было показано, что в старшем репродуктивном возрасте значительно ухудшаются морфокинетические параметры эмбриогенеза. Наблюдается двукратное увеличение доли эмбрионов с низкими значениями суммы баллов по шкале KS5 (1-4), сопровождающееся значительным снижением доли эмбрионов с высокими показателями по данной шкале (7.1-9.9).

Полученные нами результаты демонстрируют, что исследованные бластоцисты, которые различались по сумме баллов по шкале KS5, по гарднеровским критериям характеризовались «хорошим» качеством, т.е. обладали параметрами на уровне 2BB-6AA. Данные результаты согласуются с полученными данными многих авторов [43,87,104], которые утверждают, что необходимо оценивать переносимые эмбрионы не только по традиционным гарднеровским критериям, но и принимать во внимание морфокинетические параметры. Полученные данные позволяют предположить, что снижение эффективности программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) у женщин старшего репродуктивного возраста может быть обусловлено отбором для переноса эмбрионов с субоптимальными морфокинетическими характеристиками. Это связано с тем, что в данной группе пациенток возрастает вероятность формирования эмбрионов с отклонениями в морфокинетических параметрах, которые, несмотря на потенциальную жизнеспособность, могут иметь сниженный имплантационный потенциал. Таким образом, необходима дальнейшая оптимизация критериев отбора эмбрионов для переноса с учетом морфокинетических параметров, что позволит повысить эффективность ЭКО у женщин старшего репродуктивного возраста. В связи с этим, для

культивирования эмбрионов рекомендуется использовать инкубаторы закрытого типа с интегрированной системой Time-lapse. Это позволяет проводить непрерывный мониторинг развития эмбрионов и осуществлять их ранжирование на основе морфокинетических характеристик, оцениваемых с помощью балльной системы, аналогичной шкале KS5. В многочисленных исследованиях [105-107] было показано, что для повышения эффективности ЭКО, которое оценивалось по частоте имплантации и по частоте наступления беременности, для переноса необходимо использовать эмбрионы с более высокой морфокинетической оценкой.

В то же время многими исследователями [53,77] было показано, что репродуктивный потенциал эмбрионов, кроме морфокинетических характеристик, зависит и от плоидного статуса. А среди факторов, которые ответственны за неудачи ЭКО, значительная доля приходится именно на эмбриональную анеуплоидию. Решение этой проблемы возможно при более широком применении ПГТ-А, при которой будут отбираться эуплоидные эмбрионы. Однако использование молекулярно-генетической диагностики ограничено из-за её высокой стоимости, и это диктует поиск менее затратных и более удобных методов, коррелирующих с результатами ПГТ-А. В ряде исследований [108-109] авторы выдвинули гипотезу о том, что применение Time-lapse инкубаторов с функцией видеорегистрации эмбриогенеза, в сочетании с анализом морфокинетических параметров развития эмбрионов, позволяет с высокой степенью точности прогнозировать плоидный статус эмбрионов. Таким образом, данный подход потенциально может исключить необходимость проведения преимплантационного генетического тестирования анеуплоидий (ПГТ-А), которое является дорогостоящей процедурой. Проведенные исследования в нашей работе подтвердили предположение, что между морфокинетикой и плоидным статусом эмбрионов корреляция действительно существует. Это подтверждается более высокой частотой эмбриональной анеуплодии среди бластоцист с низкой оценкой по шкале KS5. Данная закономерность проявлялась в одинаковой степени в

когортах женщин как до 36, так и старше 36 лет. В то же время, необходимо признать, что среди бластоцист с высокой суммой баллов по шкале KS5 всё же встречались в достаточном количестве анеуплоидные эмбрионы. При этом особенно много их было в когорте бластоцист, полученных от женщин старшего репродуктивного возраста.

В ходе нашего исследования было выявлено значительное количество анеуплоидных эмбрионов среди бластоцист, получивших высокую оценку морфокинетических параметров по шкале KIDScore версии 5 (KS5). Это свидетельствует о том, что заключения об эуплоидии эмбрионов, основанные исключительно на морфокинетическом анализе без проведения преимплантационного генетического тестирования анеуплоидий (ПГТ-А), могут быть ошибочными в большом количестве случаев. Данный факт подтверждает нецелесообразность использования оценки морфокинетики по шкале KS5 в качестве самостоятельного метода определения плоидного статуса эмбрионов и замены ПГТ-А, особенно у пациенток старшего репродуктивного возраста, для которых риск анеуплоидии повышен. Таким образом, для достоверной оценки плоидного статуса эмбрионов ПГТ-А остается необходимым методом.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что, несмотря на наличие корреляции между результатами морфокинетического анализа и преимплантационного генетического тестирования анеуплоидий (ПГТ-А), наблюдается существенное расхождение в оценке плоидного статуса эмбрионов. Эти данные согласуются с выводами других исследователей [110], которые также обнаружили высокую частоту анеуплоидии среди бластоцист с хорошими морфокинетическими показателями, особенно у пациенток старшего репродуктивного возраста. Следовательно, использование морфокинетической оценки по шкале KS5 не может служить надежной заменой ПГТ-А для выявления анеуплоидных эмбрионов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование Time-lapse (TLT) инкубаторов вместо традиционных планшетных инкубаторов, с целью повышения ключевых показателей эмбриогенеза, таких как доля качественных бластоцист и снижение частоты отмененных переносов эмбрионов, наиболее обосновано у пациенток старшего репродуктивного возраста (старше 36 лет). Применение TLT-инкубаторов также может быть оправдано для пациенток со сниженным овариальным резервом и повторными неудачами имплантации, хотя и в меньшей степени. Для пациенток без указанных особенностей репродуктивного статуса, связанных с возрастом, чувствительностью к гонадотропинам и рецептивностью переносимых эмбрионов (и имеющих по этой причине хороший прогноз успеха ЭКО по показателю ЧНБ) тип применяемого инкубатора (т.е. использующего или нет технологию time-lapse) не имеет практического значения, оцениваемого по влиянию на важнейшие показатели эмбриогенеза.

У женщин с разным прогнозом успеха ЭКО применение при выращивании эмбрионов TLT-инкубатора вместо традиционного планшетного аналога не сопровождается при переносе свежеполученных бластоцист достоверным увеличением показателя ЧНБпэ и снижением частоты ранних репродуктивных потерь. Однако возможность получения в TLT-инкубаторе большего числа качественных бластоцист обеспечивает возможность выполнения большего числа переносов эмбрионов на один стимулированный цикл, что потенциально способствует возрастанию показателя кумулятивной ЧНБ.

Проведенное исследование демонстрирует, что назначение преимплантационного генетического тестирования анеуплоидий (ПГТ-А) не должно зависеть от типа используемого инкубатора (традиционного или time-lapse), так как частота встречаемости анеуплоидных эмбрионов статистически не различается при применении этих технологий. Учитывая значительное снижение количества эмбрионов, пригодных для переноса, у пациенток

старшего репродуктивного возраста, обусловленное возраст-зависимым повышением частоты анеуплоидий, целесообразно приоритетное проведение ПГТ-А именно этой группе пациенток, вне зависимости от используемого типа инкубатора.

Результаты преимплантационного генетического тестирования анеуплоидий (ПГТ-А) и морфокинетической оценки эмбрионов по шкале KS5 демонстрируют определенную корреляцию в отношении характеристики плоидного статуса бластоцист. Тем не менее, наблюдается значительное несовпадение в оценках, особенно при анализе качества эмбрионов у пациенток старшей репродуктивной группы (старше 36 лет). Это означает, что оценка, основанная исключительно на морфокинетических параметрах, не всегда соответствует результатам генетического анализа, и вероятность расхождения возрастает с возрастом пациентки. Таким образом, морфокинетическая оценка не может служить полноценной заменой ПГТ-А, особенно у пациенток старше 36 лет.

Для пациенток старшего репродуктивного возраста рекомендуется приоритетное проведение преимплантационного генетического тестирования анеуплоидий (ПГТ-А) с целью выявления и исключения анеуплоидных эмбрионов, независимо от результатов морфокинетической оценки. Это означает, что даже бластоцисты с высокими морфокинетическими показателями должны подвергаться ПГТ-А для достоверной оценки их хромосомного статуса.

Если проведение ПГТ-А невозможно, у пациенток младше 36 лет оценка морфокинетических параметров эмбрионов может быть использована для предварительной оценки их плоидного статуса. Однако следует учитывать, что этот метод не обеспечивает такой же точности в выявлении анеуплоидий, как ПГТ-А. В случаях, когда ПГТ-А проводится, решение о переносе или криоконсервации эмбриона должно приниматься прежде всего на основании результатов генетического анализа, а морфокинетические данные следует рассматривать как дополнительную информацию.

ВЫВОДЫ

1. Использование системы ИИ в рутинной практике ВРТ требует персонализированного подхода для отбора пациенток, которым возможно повысить эффективность программ ЭКО применением инкубатора с системой Time-lapse.

2. Time-lapse технология обеспечивает достоверное улучшение показателей эмбриогенеза (проявляемое в увеличении частоты получаемых бластоцист и снижении частоты «незавершенных» циклов) в когорте пациенток старше 36 лет и оказывает менее выраженный аналогичный эффект в когортах женщин с бедным ответом и повторными неудачами имплантации.

3. Использование технологии Time-lapse при хорошем прогнозе программ ЭКО у пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию, с повторными неудачами имплантации, старшего репродуктивного возраста не обеспечивает достоверного улучшения показателей ЧНБ и снижения частоты ранних репродуктивных потерь, за исключением пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию, у которых уменьшается частота ранних репродуктивных потерь при культивировании в инкубаторе Time-lapse. Из-за возможности получения в таких инкубаторах большего числа качественных бластоцист есть возможность увеличить число переносов эмбрионов на один стимулированный цикл и тем самым увеличить кумулятивную частоту наступления беременности.

4. Частота эмбриональной анеуплоидии в старшем репродуктивном возрасте увеличивается до 55%, независимо от условий культивирования.

5. Использование Time-lapse-технологии клеточного культивирования, в сравнении с традиционной методологией, не обеспечивает снижения частоты эмбриональной анеуплоидии. Оправданно приоритетное назначение ПГТ-А женщинам старшего репродуктивного возраста, поскольку у них отмечается существенное возрастание доли анеуплоидных эмбрионов, независимо от условий культивирования.

6. У пациенток старшего репродуктивного возраста происходит достоверное ухудшение морфокинетических параметров эмбрионов, на что указывает большее число анеуплоидных эмбрионов с низкой суммой баллов при оценке по шкале KIDScore D5.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

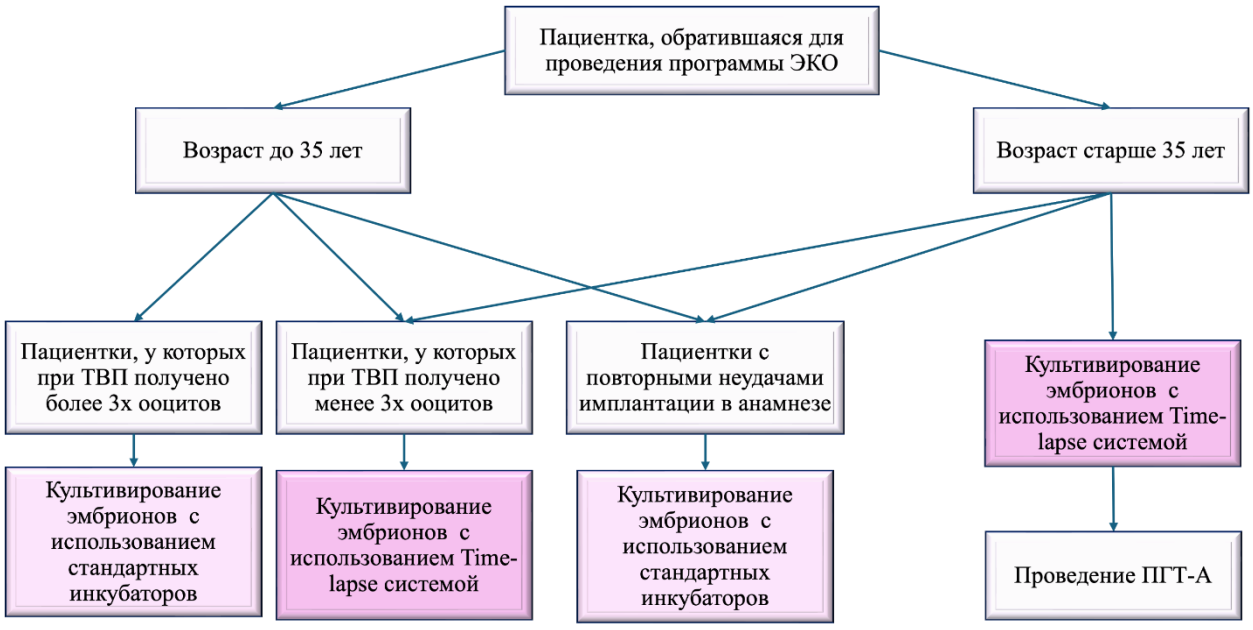
1. Применение культивирования эмбрионов в инкубаторе с системой Time-lapse достоверно снижает долю «незавершенных» циклов, что повышает количество эмбрионов, пригодных для криоконсервации, а, следовательно, повышает кумулятивную частоту наступления беременности

2. Применение культивирования эмбрионов в инкубаторе с системой Time-lapse наиболее оправдано у пациенток с «бедным» ответом на стимуляцию, пациенток старшего репродуктивного возраста

3. Проведение ПГТ-А при культивировании эмбрионов в инкубаторе с системой Time-lapse наиболее оправдано при низкой сумме баллов согласно шкале KIDScore D5

4. Высокая оценка баллов согласно шкале KIDScore D5 у пациенток старшего репродуктивного возраста не обеспечивает достоверного снижения числа эмбрионов с анеуплоидией, следовательно, представляется оправданным назначение ПГТ-А, независимо от результатов оценки их морфокинетических параметров.

5. Алгоритм выбора способа культивирования эмбрионов в программе ЭКО следующий:



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корсак, В.С. Регистр ВРТ Общероссийской общественной организации «Российская Ассоциация Репродукции Человека». Отчет за 2021 год / В.С. Корсак, А.А. Смирнова, О.В. Шурыгина // Проблемы репродукции. – 2023. – № 29 (6). – С. 25-40. doi: 10.17116/repro20232906125.

2. Chen, M. Wu. Y. Embryo incubation by time-lapse systems versus conventional incubators in Chinese women with diminished ovarian reserve undergoing IVF/ICSI: a study protocol for a randomised controlled trial / M. Wu. Y. Chen, X. Huang [et al.] // BMJ Open. – 2020;10(11):e038657. Published 2020 Nov 14. doi:10.1136/bmjopen-2020-038657.

3. Minasi, M.G. The clinical use of time-lapse in human-assisted reproduction / M.G. Minasi, P. Greco, M.T. Varricchio [et al.] // Ther Adv Reprod Health. – 2020;14:2633494120976921. doi:10.1177/2633494120976921.

4. Sciorio, R. Focus on time-lapse analysis: blastocyst collapse and morphometric assessment as new features of embryo viability / R. Sciorio, M. Meseguer // Reprod Biomed Online. – 2021 Nov;43(5):821-832. doi: 10.1016/j.rbmo.2021.08.008. Epub 2021 Aug 16. PMID: 34593324.

5. Meseguer, M. Time-lapse: the remaining questions to be answered / M. Meseguer // Fertil Steril. – 2016;105(2):295–296. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.12.126.

6. Wang, S.X.Y. The past, present, and future of embryo selection in in vitro fertilization: Frontiers in Reproduction Conference / S.X.Y. Wang // Yale J Biol Med. – 2011;84(4):487–490. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3238312.

7. Parvanov, D. Time-lapse variability of human embryos is associated with ivf outcome / D. Parvanov [et al.] // Fertility and Sterility. – 2021; 116(3):e136. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.07.378.

8. Harrison, R.G. Observations of the living developing nerve fiber / R.G. Harrison, M.J. Greenman, F.P. Mall, C.M. Jackson // The Anatomical Record. – 1907 June 1: 116-128. doi:10.1002/AR.1090010503.

9. Heape, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother / W. Heape // Proc R Soc Lond. – 1890;48:457–458. doi: 10.1098/rspl.1890.0053.
10. Développement in vitro de blastodermes et de jeunes embryons de Mammifères. Brachet A C R Acad Sci Paris, 1912:155:1191–1193.
11. Lewis, W.H. Early cleav-age stages of the egg of the monkey (Macacus rhesus) / W.H. Lewis, C.G. Hartmann // Contrib Embryol (Carnegie Inst Wash). – 1933;24:187–201.
12. Alexandre, H. A history of mammalian embryological research / H. Alexandre // Int J Dev Biol. – 2001:45:457–467.
13. Pincus, G. The Eggs of Mammals / G. Pincus. – The Macmillan Company, New York, 1936.
14. Hammond, J.Jr. Recovery and culture of tubal mouse ova / J.Jr. Hammond // Nature. – 1949;163(4131):28. doi:10.1038/163028b0.
15. Whitten, W.K. Culture of tubal ova / W.K. Whitten // Nature. – 1957;179(4569):1081-1082. doi:10.1038/1791081a0.
16. Schini SA, Bavister BD. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. Biol Reprod. 1988;39:1183–1192. doi: 10.1095/biolreprod39.5.1183.
17. Steptoe, P.C. Human blastocysts grown in culture / P.C. Steptoe, R.G. Edwards, J.M. Purdy // Nature. – 1971;229(5280):132-133. doi:10.1038/229132a0.
18. Niederberger, C. Introduction: IVF's 40th world birthday / C. Niederberger, A. Pellicer // Fertil Steril. – 2018 Jul 1;110(1):4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.017. PMID: 29980260.
19. Ubaldi, F.M. Advanced Maternal Age in IVF: Still a Challenge? The Present and the Future of Its Treatment / F.M. Ubaldi, D. Cimadomo, A. Vaiarelli, [et al.] // Front Endocrinol (Lausanne). – 2019 Feb 20;10:94. doi: 10.3389/fendo.2019.00094. PMID: 30842755; PMCID: PMC6391863.
20. Kucherov, A. PGT-A is associated with reduced cumulative live birth rate in first reported IVF stimulation cycles age ≤ 40: an analysis of 133,494 autologous

cycles reported to SART CORS / A. Kucherov, M. Fazzari, H. Lieman [et al.] // J Assist Reprod Genet. – 2023 Jan;40(1):137-149. doi: 10.1007/s10815-022-02667-x. Epub 2022 Dec 1. PMID: 36454362; PMCID: PMC9840738.

21. Ribeiro, S. In Vitro Fertilisation and Intracytoplasmic Sperm Injection predictive factors: A review of the effect of female age, ovarian reserve, male age, and male factor on IVF/ICSI treatment outcomes / S. Ribeiro, M. Sousa // JBRA Assist Reprod. – 2023 Mar 30;27(1):97-111. doi: 10.5935/1518-0557.20220000. PMID: 35916467; PMCID: PMC10065784.

22. Sheikhansari, G. Etiology and management of recurrent implantation failure: A focus on intra-uterine PBMC-therapy for RIF / G. Sheikhansari, Z. Pourmoghadam, S. Danaii [et al.] // J Reprod Immunol. – 2020 Jun;139:103121. doi: 10.1016/j.jri.2020.103121. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32240947.

23. Choi, S.K.Y. Population-wide contribution of medically assisted reproductive technologies to overall births in Australia: temporal trends and parental characteristics / S.K.Y. Choi, C. Venetis, W. Ledger [et al.] // Hum Reprod. – 2022 May 3;37(5):1047-1058. doi: 10.1093/humrep/deac032. PMID: 35220435.

24. Massin, N. The BISTIM study: a randomized controlled trial comparing dual ovarian stimulation (duostim) with two conventional ovarian stimulations in poor ovarian responders undergoing IVF / N. Massin, I. Abdennebi, G. Porcu-Buisson [et al.] // Hum Reprod. – 2023 May 2;38(5):927-937. doi: 10.1093/humrep/dead038. PMID: 36864699; PMCID: PMC10152167.

25. Massin, N. New stimulation regimens: endogenous and exogenous progesterone use to block the LH surge during ovarian stimulation for IVF / N. Massin // Hum Reprod Update. – 2017 Mar 1;23(2):211-220. doi: 10.1093/humupd/dmw047. PMID: 28062551.

26. Simi, G. Different stimulation protocols for oocyte cryropreservation in oncological patients: a retrospective analysis of single university centre / G. Simi, M.E. Obino, E. Casarosa [et al.] // Gynecol Endocrinol. – 2015;31(12):966-70. doi: 10.3109/09513590.2015.1080237. Epub 2015 Sep 15. PMID: 26370262.

27. Glujovsky, D. How effective are the non-conventional ovarian stimulation protocols in ART? A systematic review and meta-analysis / D. Glujovsky, R. Pesce, M. Miguens [et al.] // J Assist Reprod Genet. – 2020 Dec;37(12):2913-2928. doi: 10.1007/s10815-020-01966-5. Epub 2020 Nov 21. PMID: 33219862; PMCID: PMC7714798.

28. Шостенко, Л.В., Использование протоколов random-start и протоколов с двойной стимуляцией яичников, основанное на теории множественных волн фолликулогенеза / Л.В. Шостенко, К.В. Краснопольская, А.В. Шишкина [и др.] // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2022. – № 22(2). С. – 57-64.

29. Muteshi, C. Ovarian response and follow-up outcomes in women diagnosed with cancer having fertility preservation: Comparison of random start and early follicular phase stimulation – cohort study / C .Muteshi, T .Child, E. Ohuma, M. Fatum // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. – 2018 Nov;230:10-14. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.09.007. Epub 2018 Sep 11. PMID: 30227359.

30. ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators // Reprod Biomed Online. – 2017;35(5):494-510. doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.015.

31. Tao, P. Effect of sequential versus single-step culture medium on IVF treatments, including embryo and clinical outcomes: a prospective randomized study / P. Tao, W. Zhou, X. Yan [et al.] // Arch Gynecol Obstet. – 2022 Mar;305(3):757-765. doi: 10.1007/s00404-021-06219-z. Epub 2021 Sep 12. PMID: 34510243.

32. Bastias, M.C. In vitro deleterious effect of hypoxanthine in Ham's Nutrient Mixture F-10 culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development / M.C. Bastias, S.T. McGee-Belser, S.H. Bryan., J.M. Vasquez // Fertil Steril. – 1993 Nov;60(5):876-80. doi: 10.1016/s0015-0282(16)56290-6. PMID: 8224274.

33. Roussev, R.G. Validation of an embryotoxicity assay / R.G. Roussev, J.J. Stern, L.P. Thorsell, E.J. Thomason, C.B. Coulam // Am J Reprod Immunol. – 1995 Feb;33(2):171-5. doi: 10.1111/j.1600-0897.1995.tb00881.x. PMID: 7646768.

34. Fleming, T.P. The embryo and its future / T.P. Fleming, W.Y. Kwong, R. Porter [et al.] // Biol Reprod. – 2004 Oct;71(4):1046-54. doi: 10.1095/biolreprod.104.030957. Epub 2004 Jun 23. PMID: 15215194.

35. FitzGerald, L. An improved medium for long-term culture of human embryos overcomes the in vitro developmental block and increases blastocyst formation / L. FitzGerald, M. DiMattina // Fertil Steril. – 1992 Mar;57(3):641-7. doi: 10.1016/s0015-0282(16)54914-0. PMID: 1740212.

36. Lawitts, J.A. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods / J.A. Lawitts, J.D. Biggers // J Reprod Fertil. – 1991 Mar;91(2):543-56. doi: 10.1530/jrf.0.0910543. PMID: 2013878.

37. Lawitts, J.A. Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media / J.A. Lawitts, J.D. Biggers // Mol Reprod Dev. – 1992 Mar;31(3):189-94. doi: 10.1002/mrd.1080310305. PMID: 1554503.

38. Erbach, G.T. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media / G.T. Erbach, J.A. Lawitts, V.E. Papaioannou, J.D. Biggers // Biol Reprod. – 1994 May;50(5):1027-33. doi: 10.1095/biolreprod50.5.1027. Erratum in: Biol Reprod 1994 Aug;51(2):345. PMID: 8025158.

39. McKiernan, S.H. Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos in vitro / S.H. McKiernan, M.K. Clayton, B.D. Bavister // Mol Reprod Dev. – 1995 Oct;42(2):188-99. doi: 10.1002/mrd.1080420208. PMID: 8562064.

40. Summers, M.C. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues / M.C. Summers, J.D. Biggers // Human Reproduction Update. 2003 Nov;9(6):557–582. doi: 10.1093/humupd/dmg039.

41. Gardner, D.K. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells / D.K. Gardner, M. Lane, I. Calderon, J. Leeton Fertil Steril. – 1996 Feb;65(2):349-53. doi: 10.1016/s0015-0282(16)58097-2. PMID: 8566260.

42. Mantikou, E. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review / E. Mantikou, M.A. Youssef, M. van Wely, [et al.] // Hum Reprod Update. – 2013;19(3):210-220. doi:10.1093/humupd/dms061.

43. Reignier, A.Time-lapse technology improves total cumulative live birth rate and shortens time to live birth as compared to conventional incubation system in couples undergoing ICSI / A. Reignier, T. Lefebvre, S. Loubersac [et al.] // J Assist Reprod Genet. – 2021 Apr;38(4):917-923. doi: 10.1007/s10815-021-02099-z. Epub 2021 Feb 12. PMID: 33576935; PMCID: PMC8079526.

44. Lundin, K. Time-lapse technology for embryo culture and selection / K. Lundin, H. Park // Ups J Med Sci. – 2020 May;125(2):77-84. doi: 10.1080/03009734.2020.1728444. Epub 2020 Feb 25. PMID: 32096675; PMCID: PMC7720962.

45. Nobrega, N.G. Sibling oocytes cultured in a time-lapse versus benchtop incubator: how time-lapse incubators improve blastocyst development and euploid rate / N.G. Nobrega, A. Abdala, A. El-Damen [et al.] // Zygote. – 2023 Aug;31(4):402-409. doi: 10.1017/S0967199423000242. Epub 2023 May 25. PMID: 37226769.

46. Rajendran, S. Automatic Ploidy Prediction and Quality Assessment of Human Blastocyst Using Time-Lapse Imaging / S. Rajendran, M. Brendel, J. Barnes [et al.] // bioRxiv [Preprint]. – 2023 Sep 2:2023.08.31.555741. doi: 10.1101/2023.08.31.555741. PMID: 37693566; PMCID: PMC10491146.

47. Jiang, Y. The effect of embryo selection using time-lapse monitoring on IVF/ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis / Y. Jiang, L. Wang, S. Wang [et al.] // J Obstet Gynaecol Res. – 2023 Dec;49(12):2792-2803. doi: 10.1111/jog.15797. Epub 2023 Oct 1. PMID: 37778750.

48. Meng, Q. Noninvasive embryo evaluation and selection by time-lapse monitoring vs. conventional morphologic assessment in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a single-center randomized controlled study / Q. Meng, Y. Xu, A. Zheng [et al.] // Fertil Steril. – 2022 Jun;117(6):1203-1212. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.02.015. Epub 2022 Mar 30. PMID: 35367059.

49. Magdi, Y. Effect of embryo selection based morphokinetics on IVF/ICSI outcomes: evidence from a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / Y. Magdi, A. Samy, A.M. Abbas [et al.] // Arch Gynecol Obstet. – 2019 Dec;300(6):1479-1490. doi: 10.1007/s00404-019-05335-1. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31667608.

50. Moghadam, A.R.E., Oocyte quality and aging / A.R.E. Moghadam, M.T. Moghadam, M. Hemadi, G. Saki // JBRA Assist Reprod. – 2022 Jan 17;26(1):105-122. doi: 10.5935/1518-0557.20210026. PMID: 34338482; PMCID: PMC8769179.

51. Seshadri, S. Assisted conception in women of advanced maternal age / S. Seshadri, G. Morris, P. Serhal, W. Saab // Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. – 2021 Jan;70:10-20. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2020.06.012. Epub 2020 Aug 7. PMID: 32921559.

52. Demko, Z.P. Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening / Z.P. Demko, A.L. Simon, R.C. McCoy, D.A. Petrov, M Rabinowitz // Fertil Steril. – 2016 May;105(5):1307-1313. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.01.025. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26868992.

53. Cheng, X. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy With Comprehensive Chromosome Screening in Patients Undergoing In Vitro Fertilization: A Systematic Review and Meta-analysis / X. Cheng, Y. Zhang, H. Deng [et al.] // Obstet Gynecol. – 2022 Nov 1;140(5):769-777. doi: 10.1097/AOG.0000000000004962. Epub 2022 Oct 5. PMID: 36201787.

54. Shi, W.H. Different Strategies of Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies in Women of Advanced Maternal Age: A Systematic Review and Meta-Analysis / WH Shi, ZR Jiang, ZY Zhou [et al.] // J Clin Med. – 2021 Aug 30;10(17):3895. doi: 10.3390/jcm10173895. PMID: 34501345; PMCID: PMC8432243.

55. Yurchuk, T. State of the art in assisted reproductive technologies for patients with advanced maternal age / T. Yurchuk, M. Petrushko, B. Fuller // Zygote. – 2023

Apr;31(2):149-156. doi: 10.1017/S0967199422000624. Epub 2023 Feb 22. PMID: 36810125.

56. Drakopoulos, P. Update on the management of poor ovarian response in IVF: the shift from Bologna criteria to the Poseidon concept / P. Drakopoulos, E. Bardhi, L. Boudry [et al.] // Ther Adv Reprod Health. – 2020 Jul 31;14:2633494120941480. doi: 10.1177/2633494120941480. PMID: 32844159; PMCID: PMC7416136.

57. Ferraretti, A.P. ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria / A.P. Ferraretti AP, A. La Marca, B.C. Fauser [et al.] // Hum Reprod. – 2011 Jul;26(7):1616-24. doi: 10.1093/humrep/der092. Epub 2011 Apr 19. PMID: 21505041.

58. Zhu, F. TEAS, DHEA, CoQ10, and GH for poor ovarian response undergoing IVF-ET: a systematic review and network meta-analysis / F. Zhu, S. Yin, B. Yang [et al.] // Reprod Biol Endocrinol. – 2023 Jul 18;21(1):64. doi: 10.1186/s12958-023-01119-0. PMID: 37464357; PMCID: PMC10355041.

59. Di Guardo, F. Poor ovarian response and the possible role of natural and modified natural cycles / F. Di Guardo, C. Blockeel, M. De Vos [et al.] // Ther Adv Reprod Health. – 2022 Jan 14;16:26334941211062026. doi: 10.1177/26334941211062026. PMID: 35072076; PMCID: PMC8771731.

60. Roque, M. The POSEIDON stratification – moving from poor ovarian response to low prognosis / M. Roque, T. Haahr, S.C. Esteves, P. Humaidan // JBRA Assist Reprod. – 2021 Apr 27;25(2):282-292. doi: 10.5935/1518-0557.20200100. PMID: 33565297; PMCID: PMC8083858.

61. Datta, A.K. Mild versus conventional ovarian stimulation for IVF in poor responders: a systematic review and meta-analysis / A.K. Datta, A. Maheshwari, N. Felix, S. Campbell, G. Nargund // Reprod Biomed Online. – 2020 Aug;41(2):225-238. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.03.005. Epub 2020 Mar 14. PMID: 32546333.

62. Polat, M. Double or dual stimulation in poor ovarian responders: where do we stand? / M. Polat, S. Mumusoglu, Ozbek I. Yarali, G. Bozdag, H. Yarali // Ther Adv

Reprod Health. – 2021 Jun 30;15:26334941211024172. doi: 10.1177/26334941211024172. PMID: 34263172; PMCID: PMC8252377.

63. Оразов, М.Р. Тайны патогенеза повторных неудач имплантации / М.Р. Оразов, Р.Е. Орехов, Д.П. Камиллова [и др.] // Трудный пациент. – 2020. – № 18(4). – С. 43-48. doi:10.24411/2074-1995-2020-10030.

64. Cakiroglu, Y. Determining diagnostic criteria and cause of recurrent implantation failure / Y. Cakiroglu, B. Tiras // Curr Opin Obstet Gynecol. – 2020 Jun;32(3):198-204. doi: 10.1097/GCO.0000000000000620. PMID: 32251092.

65. Cimadomo D. Definition, diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure: an international survey of clinicians and embryologists / D. Cimadomo, L. Craciunas, N. Vermeulen, K. Vomstein, B. Toth // Hum Reprod. – 2021 Jan 25;36(2):305-317. doi: 10.1093/humrep/deaa317. PMID: 33313697.

66. Makrigiannakis, A. Approaches to Improve Endometrial Receptivity in Case of Repeated Implantation Failures / A. Makrigiannakis, F. Makrygiannakis, T. Vrekoussis // Front Cell Dev Biol. 2021 Mar 16;9:613277. doi: 10.3389/fcell.2021.613277. PMID: 33796523; PMCID: PMC8007915.

67. Wang, Y. Reproductive Outcomes of In Vitro Fertilization-Intracytoplasmic Sperm Injection after Transcervical Resection of Adhesions: A Retrospective Cohort Study / Y. Wang, Z. Yao, H. Zhao [et al.] // J Minim Invasive Gynecol. – 2021 Jul;28(7):1367-1374. doi: 10.1016/j.jmig.2020.10.029. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33188921.

68. Volodarsky-Perel, A. Treatment of hydrosalpinx in relation to IVF outcome: a systematic review and meta-analysis / A. Volodarsky-Perel, W. Buckett, T. Tulandi // Reprod Biomed Online. – 2019 Sep;39(3):413-432. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.04.012. Epub 2019 Apr 25. PMID: 31324437.

69. Радзинский, В.Е. Вклад хронического эндометрита в нарушения репродуктивной системы у пациенток с повторными неудачами имплантации / В.Е. Радзинский, М.Р. Оразов, Л.Р. Токтар [и др.] // Гинекология. – 2021. – Т. 23. – №1. – С. 102-106. doi: 10.26442/20795696.2021.1.200671.

70. Al-Nasiry, S. The Interplay Between Reproductive Tract Microbiota and Immunological System in Human Reproduction / S. Al-Nasiry, E. Ambrosino, M. Schlaepfer [et al.] // Front Immunol. – 2020 Mar 16;11:378. doi: 10.3389/fimmu.2020.00378. PMID: 32231664; PMCID: PMC7087453.

71. Pourmoghadam, Z. Efficacy of intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells on the pregnancy outcomes in patients with recurrent implantation failure: A systematic review and meta-analysis / Z. Pourmoghadam, S. Abdolmohammadi-Vahid, F. Pashazadeh [et al.] // J Reprod Immunol. – 2020 Feb;137:103077. doi: 10.1016/j.jri.2019.103077. Epub 2019 Dec 24. PMID: 31893538.

72. Maleki-Hajiagha, A. Intrauterine infusion of autologous platelet-rich plasma in women undergoing assisted reproduction: A systematic review and meta-analysis / A. Maleki-Hajiagha, M. Razavi, S. Rouholamin [et al.] // J Reprod Immunol. – 2020 Feb;137:103078. doi: 10.1016/j.jri.2019.103078. Epub 2019 Dec 31. PMID: 32006776.

73. Aghajanpour, S. Differential expression of innate/adaptive immunity genes induced by endometrial scratching as a hopeful approach for implantation boosting in unexplained, repeated implantation failure: An RCT / S. Aghajanpour, E. Hosseini, E. Amirchaghmaghi [et al.] // J Reprod Immunol. – 2021 Nov;148:103426. doi: 10.1016/j.jri.2021.103426. Epub 2021 Oct 6. PMID: 34653814.

74. Molina, N.M. New Opportunities for Endometrial Health by Modifying Uterine Microbial Composition: Present or Future? / N.M. Molina, A. Sola-Leyva, M.J. Saez-Lara [et al.] // Biomolecules. – 2020 Apr 11;10(4):593. doi: 10.3390/biom10040593. PMID: 32290428; PMCID: PMC7226034.

75. Soares, S.R. Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity diseases / S.R. Soares, M.M. Barbosa dos Reis, A.F. Camargos // Fertil Steril. – 2000 Feb;73(2):406-11. doi: 10.1016/s0015-0282(99)00532-4. PMID: 10685551.

76. Оразов, М.Р. Повторные неудачи имплантации: этиология и возможности физиотерапии / М.Р. Оразов, Е.С. Силантьева, Р.Е. Орехов, Д.П. Камиллова,

Л.М. Михалёва // Трудный пациент. – 2020. – № 8-9 (18). – С. 20-24. doi:10.24411/2074-1995-2020-10055.

77. Liang, Z. A systematic review and meta-analysis: clinical outcomes of recurrent pregnancy failure resulting from preimplantation genetic testing for aneuploidy / Z. Liang, Q. Wen, J. Li [et al.] // Front Endocrinol (Lausanne). – 2023 Oct 2;14:1178294. doi: 10.3389/fendo.2023.1178294. PMID: 37850092; PMCID: PMC10577404.

78. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Международная классификация болезней, 11-й пересмотр (МКБ-11), Женева, ВОЗ, 2018 г.

79. Тлиашинова, И.А. Глобальные социальные вызовы в проблемах бесплодия / И.А. Тлиашинова, Р.Н. Мингазов // Менеджер здравоохранения. – 2022. – № 3. – С. 49-58. – URL: https://cyberleninka.ru/article/n/globalnye-sotsialnye-vyzovy-v-problemah-besplodiya-menedzher-zdravoohraneniya.

80. Carson, S.A. Diagnosis and Management of Infertility: A Review / S.A. Carson, A.N. Kallen // JAMA. – 2021 Jul 6;326(1):65-76. doi: 10.1001/jama.2021.4788. PMID: 34228062; PMCID: PMC9302705.

81. Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация. Клинические рекомендации РОАГ. – М., 2019. – 119 с.

82. Бесплодный брак: версии и контраверсии. Под ред. В.Е. Радзинского. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 404 с.

83. Приказ Минздрава России от 13.10.2017 № 804н «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг» (ред. от 24.09.2020, с изм. от 26.10.2022).

84. Torky, H. Comparing sequential vs day 3 vs day 5 embryo transfers in cases with recurrent implantation failure: randomized controlled trial / H. Torky, A. Ahmad, A. Hussein [et al.] // JBRA Assist Reprod. 2021;25(2):185-192. doi:10.5935/1518-0557.20200083.

85. Prapas, Y. Day-5 fresh embryo transfer is associated with superior clinical outcomes in oocyte donation cycles compared with day-3 embryo transfer / Y. Prapas, K. Ravanos, S. Petousis [et al.] // J Matern Fetal Neonatal Med. – 2022

Dec;35(24):4723-4727. doi: 10.1080/14767058.2020.1863360. Epub 2020 Dec 15. PMID: 33323000.

86. Swain, J.E. Decisions for the IVF laboratory: comparative analysis of embryo culture incubators / J.E. Swain // Reprod Biomed Online. – 2014;28(5):535-547. doi:10.1016/j.rbmo.2014.01.004.

87. Good practice recommendations for the use of time-lapse technology. ESHRE Working Group on Time-Lapse Technology. Apter S., Ebner T., Freour T. [et al.] // Human Reproduction Open. – 2020 Mar 19;2020(2):hoaa008. doi: 10.1093/hropen/hoaa008.

88. Marek, D. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program / D. Marek, M. Langley, D.K. Gardner [et al.] // Fertil Steril. – 1999;72:1035–1040. doi: 10.1016/S0015-0282(99)00409-4

89. Tarahomi, M. The composition of human preimplantation embryo culture media and their stability during storage and culture / M. Tarahomi, F.M. Vaz, J.P. van Straalen [et al.] // Hum Reprod. – 2019 Aug 1;34(8):1450-1461. doi: 10.1093/humrep/dez102. PMID: 31348827.

90. Радзинский, В.Е. «Русский крест»: медицинские аспекты демографии и репродукции / В.Е. Радзинский // Opinion Leader. – 2020. – № 3(32). – С. 12-17. – EDN XSYJHN.

91. Cedars, M.I. Evaluation of Female Fertility-AMH and Ovarian Reserve Testing / M.I. Cedars // J Clin Endocrinol Metab. – 2022 May 17;107(6):1510-1519. doi: 10.1210/clinem/dgac039. PMID: 35100616.

92. Kirkegaard, K. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment / K. Kirkegaard, I.E. Agerholm, H.J. Ingerslev // Human Reproduction. – 2012; 27(5): 1277-1285. doi: 10.1093/humrep/des079.

93. Sciorio, R. Use of time-lapse monitoring in medically assisted reproduction treatments: a mini-review / R. Sciorio // Zygote. – 2021; 29(2); 93-101. doi: 10.1017/s0967199420000623.

94. Boueilh, T. Time-lapse imaging systems in IVF laboratories: a French national survey / T. Boueilh, A. Reignier, P. Barriere, T. Freour // Journal of Assisted

Reproduction and Genetics. – 2018; 35(12): 2181-2186. doi: 10.1007/s10815-018-1302-6.

95. Armstrong, A. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction / A. Armstrong, P. Bhide, V. Jordan, A. Pacey, A. // Cochrane Database of Systematic Reviews. 2019; 5(5):CD011320. doi: 10.1002/14651858.cd011320.pub4.

96. Ahlström, A. A double-blind randomized controlled trial investigating a time-lapse algorithm for selecting Day 5 blastocysts for transfer / A. Ahlström, K. Lundin, A-K. Lind [et al.] // Human Reproduction. – 2022; 37(4): 708-717. doi: 10.1093/humrep/deac020.

97. Hollands, P. The Fertility Promise: The Facts Behind in vitro Fertilisation (IVF) / P. Hollands // Bentham Science Publichers, 2021. doi: 10.2174/9789815040289121010013.

98. Gardner, D. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in IVF / D. Gardner, W. Schoolcraft, L. Wagley [et al.] // Human Reproduction. – 1998; 13(12): 3434-3440. doi: 10.1093/humrep/13.12.3434.

99. Lei, Jin. Incidence, dynamics and recurrences of reverse cleavage in aneuploid, mosaic and euploid blastocysts, and its relationship with embryo quality / Lei Jin, Xiyuan Dong, Wei Tan, Bo Huang // Journal of Ovarian Research. – 2022; 15(1):91. doi: 10.1186/s13048-022-01026-9.

100. Athayde Wirka, K. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development / K. Athayde Wirka, A.A. Chen, J. Conaghan [et al.] // Fertility and Sterility. – 2014; 101(6): 1637-1648. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.050.

101. Soukhov, E., Prediction of embryo implantation rate using a sole parameter of timing of starting blastulation / E. Soukhov, G. Karavani, I. Szaingurten-Solodkin [et al.] // Zigote. – 2022; 30(4): 501-508. doi: 10.1017/S0967199421000952.

102. Ciray, H.N. Time-Lapse User Group. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group /

H.N. Ciray, A. Campbell, I.E. Agerholm // Human Reproduction. – 2014; 29(12): 2650-2660. doi:10.1093/humper/deu278.

103. Rubio, I. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope / I. Rubio, A. Galan, Z. Larreategui // Fertility and Sterility. – 2014; 102(5): 1287-1294.e5/. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.07.738.

104. Yang, Q. Analysis of maturation dynamics and developmental competence of in vitro matured oocytes under time-lapse monitoring / Q. Yang, L. Zhu, M. Wang [et al.] // Reproductive Biology and Endocrinology. – 2021; 19:183. doi: 10.1186/s12958-021-00868-0.

105. Reignier, A. Performance of Day 5 KIDScore™ morphokinetic prediction models of implantation and live birth after single blastocyst transfer / A. Reignier, J-M. Girard, J. Lammers, [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2019; 36(11): 2279–2285. doi:10.1007/s10815-019-01567-x.

106. Kato, K. Comparing prediction of ongoing pregnancy and live birth outcomes in patients with advanced and younger maternal age patients using KIDScore day 5: a large-cohort retrospective study with single vitrified-warmed blastocyst transfer / K. Kato, S. Ueno, J. Berntsen [et al.] // Reproductive Biology and Endocrinology. – 2021 Jul 2;19(1):98. doi: 10.1186/s12958-021-00767-4.

107. Bori, L. The higher the score, the better the clinical outcome: retrospective evaluation of automatic embryo grading as a support tool for embryo selection in IVF laboratories / L. Bori, F. Meseguer, V. Angeles [et al.] // Human Reproduction. – 2022; 37(6): 1148–1160. doi: 10.1093/humrep/deac066.

108. Lee, C.I. Embryo morphokinetics is potentially associated with clinical outcomes of single-embryo transfers in preimplantation genetic testing for aneuploidy cycles / C.I. Lee, C.H. Chen, C.C. Huang [et al.] // Reproductive BioMedicine Online. – 2019;39(4): 569–579. doi:10.1016/j.rbmo.2019.05.020.

109. Gazzo, E. The kidscore(TM) D5 algorithm as an additional tool to morphological assessment and PGT-A in embryo selection: a time-lapse study / E.

Gazzo, F. Pena, F.Valdez [et al.] // JBRA Assisted Reproduction. 2020; 24(1):55–60. doi:10.5935/1518-0557.20190054.
110. Azambuja, R. KIDscore and PGT-A: Is the relationship between the findings? / R. Azambuja, F. Wingert, L.A. Proenca [et al.] // Human Reproduction. – 2022; 37: Issue Suppl 1: P-289. doi:10.1093/humrep/deac107.277.