МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения

Московской области

«МОСКОВСКИЙ ОБЛАСТНОЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ АКУШЕРСТВА И ГИНЕКОЛОГИИ»

На правах рукописи

АЛЕКСАНДРОВА Виктория Романовна

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ООЦИТОВ ДОНОРА ПРИ ЛЕЧЕНИИ БЕСПЛОДИЯ В ПОЗДНЕМ РЕПРОДУКТИВНОМ ВОЗРАСТЕ

14.01.01 –Акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН,

доктор медицинских наук,

профессор Краснопольская К.В.

МОСКВА – 2018 год

ОГЛАВЛЕНИЕ **стр.**

Введение……..……4

Глава 1 Бесплодие у пациенток старшего репродуктивного возраста (обзор литературы)…….……11

1.1. Основные проблемы снижения фертильности в старшей возрастной группе……..……11

1.2. Криоконсервация как метод сохранения генетического материала в программах ВРТ. …….21

1.3. Донорские программы как метод преодоления бесплодия в старшем репродуктивном возрасте ……..……..24

Глава 2 Материал и методы исследования……29

2.1. Критерии включения в исследование, общее количество наблюдений……29

2.2. Клинически-лабораторные методы исследования……..……33

2.3. Методы лечения …….……...36

2.3.1. Программа стандартного ЭКО……..36

2.3.2. Программа ЭКО с использованием ооцитов донора……..39

2.3.3. Получение донорских ооцитов……..40

2.4. Методы статистического анализа……46

Глава 3 Клиническая характеристика обследованных больных……..…48

Глава 4 Клинические исходы программ ЭКО у пациенток старшей возрастной группы с получением собственного генетического материала…….……..54

4.1. Сравнительная оценка ЧНБ у пациенток с сохраненным и сниженным

овариальным резервом (Группа А)……54

4.2. Зависимость результатов ЭКО у пациенток группы А от количества полученных ооцитов ……..56

4.3. Структура отмены переносов у пациенток старшей возрастной группы……62

4.4. Структура репродуктивных потерь при выполнении ЭКО у пациенток старшего возраста с разным состоянием овариального резерва…….....68

4.5. Заключение……70

Глава 5 Клинические исходы программ ЭКО с использованием ооцитов донора у пациенток старшего репродуктивного возраста……72

5.1. Зависимость клинических исходов программ ЭКО-ОД от особенностей получения переносимых эмбрионов……..72

5.2. Зависимость клинических исходов программ ЭКО-ОД от количества переносимых эмбрионов……..75

5.3. Характеристика эмбриологического этапа при выполнении программ ЭКО-ОД с использованием витрифицированных и нативных ооцитов….77

5.4. Заключение…….80

Обсуждение результатов исследования…….....82

Выводы…….91

Практические рекомендации…….92

Список сокращений……..……..93

Список литературы……..…94

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время во всём мире бесплодие является чрезвычайно актуальной медико-социальной проблемой, а современные тенденции к увеличению возраста женщин, решившихся на материнство, диктуют необходимость дальнейших исследований в области оказания помощи в реализации репродуктивной функции у женщин позднего репродуктивного возраста [70, 101, 122]. Эффективность лечения таких пациенток с применением вспомогательных репродуктивных технологий крайне низка [91, 129, 143]. Причинами снижения способности к зачатию у женщин старшего репродуктивного возраста являются низкий овариальный резерв (ОВР), ухудшение качества яйцеклеток, нарушение рецептивной способности эндометрия, наличие сопутствующей гинекологической и соматической патологии [8, 120, 138, 144]. Тесты, позволяющие определять ОВР, имеют ценность в прогнозировании ответа яичников на стимуляцию, однако до сих пор отсутствует единое мнение о пороговых значениях данных показателей [64, 69, 101]. Не вызывает сомнения, что ОВР является важнейшим показателем репродуктивного потенциала, а его снижение у женщин старшей возрастной категории ставит под сомнение возможность получения у них беременности с использованием собственных яйцеклеток [32, 68, 87]. У пациенток старшего репродуктивного возраста наблюдается не только снижение частоты подтверждаемых зачатий, но и при наступлении беременности значительно возрастает процент ранних репродуктивных потерь, которые в свою очередь связаны с возрастанием количества анеуплоидий при наступлении беременности [122, 129, 140]. Возрастание среди инфертильных женщин доли пациенток старшего репродуктивного возраста, у которых отмечается крайне низкая эффективность стандартных (с использованием собственного генетического материала) программ ЭКО, делает для таких лиц более востребованными программы ЭКО с применением донорских ооцитов. На территории Российской

Федерации программы ЭКО с использованием ооцитов донора не запрещены, т.е. возможны при юридически подтвержденной договоренности между донором и реципиентом [41]. Все доноры перед проведением программы обследуются, согласно приказу 107н МЗ РФ от 30 августа 2013г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Получение ооцитов у донора требует проведение стандартной программы ЭКО, при которой, ооциты используются в программах у пациенток-реципиентов. В связи с развитием криотехнологий, появилась возможность криоконсервации ооцитов с последующим их применением в программах ЭКО-ОД [61, 65, 107].

Степень разработанности исследования

В настоящее время, существуют разноречивые данные об эффективности использования ооцитов, подвергнутых криоконсервации, об определении количества ооцитов, которого будет достаточно для получения эмбрионов хорошего качества, а также об эффективности и преимуществах программ ЭКО с нативными и витрифицированными ооцитами донора. Важнейшей задачей репродуктологии на сегодняшний день является не только достижение беременности у женщины, решившейся на позднее материнство, но и что особенно важно, рождение здорового ребенка. Недостаточная освещенность проблемы применения донорских яйцеклеток, как в нативном, так и в витрифицированном состоянии у женщин старшего репродуктивного возраста позволяет считать настоящее исследование актуальным.

Цель исследования: повысить эффективность лечения бесплодия у пациенток старшего репродуктивного возраста с использованием донорских ооцитов.

Задачи исследования:

1. Оценить эффективность проведения программы ЭКО у пациенток старшего репродуктивного возраста с собственным генетическим материалом в зависимости от количественного и качественного характера ответа яичников.
2. Определить эффективность программ ЭКО с использованием нативных и витрифицированных ооцитов донора по критериям раннего эмбриогенеза и показателя ЧНБ.
3. Сравнить частоту наступления беременности при использовании эмбрионов, полученных из нативных и витрифицированных ооцитов донора в программах ЭКО.
4. Сравнить частоту ранних репродуктивных потерь у пациенток старшего репродуктивного возраста при использовании в программах ЭКО собственного и донорского генетического материала.
5. Сравнить частоту отмен переносов эмбрионов у пациенток старшего репродуктивного возраста при использовании собственного и донорского генетического материала.

Научная новизна исследования

Впервые проведено достаточно крупное сравнительное исследование частоты наступления беременности и ранних репродуктивных потерь в программах стандартного ЭКО и ЭКО-ОД (с использованием витрифицированных и нативных ооцитов донора) с учетом параметров, характеризующих процент выживаемости выделяемых женских гамет, частоты их оплодотворения и последующей генерации эмбрионов хорошего морфологического качества.

Собран статистически значимый материал, характеризующий частоту отмен переносов эмбрионов из-за их неудовлетворительной морфологии при выполнении ЭКО с собственными и донорскими ооцитами у женщин старшего репродуктивного возраста.

Теоретическая и практическая значимость

Оценена возможность использования витрифицированных ооцитов донора в программах ЭКО-ОД у пациенток старшего репродуктивного возраста.

Определено оптимальное количество ооцитов для витрификации с целью получения эмбрионов хорошего качества на перенос.

Полученные результаты предоставляют убедительные аргументы в пользу более активного использования программ ЭКО-ОД с применением нативных или криоэмбрионов, генерированных из нативных ооцитов донора.

Методология и методы исследования

Настоящая работа была выполнена на базе отделения репродуктологии МОНИИАГ в 2013-2018 годах. Для решения поставленных задач в работе ретроспективно обработаны 628 циклов стандартного ЭКО у 418 пациенток и проспективно отслежены клинические исходы 222 лечебных циклов ЭКО-ОД. Результаты лечения характеризовали по показателям $ЧНБ_{СЦ,}$ $ЧНБ_{ПЭ}$, частоты отмен переноса эмбрионов, частоты ранних (в I триместре) репродуктивных потерь. Согласно заранее заданным критериям включения в исследование возраст пациенток в программе как стандартного ЭКО, так и в программе ЭКО-ОД превышал 38 лет. При этом возраст женщин-доноров ооцитов во всех случаях был ограничен 35 годами.

Стандартное ЭКО назначали пациенткам как с нормальным, так и со сниженным овариальным резервом, согласно общепринятым показаниям к использованию ЭКО. Показанием к назначению ЭКО-ОД явилось резкое снижение овариального резерва, обусловленное чаще всего возрастными изменениями, реже – хирургической менопаузой, преждевременным истощением яичников.

В исследование не включали пациенток с признаками некомпенсированных эндокринопатий, патологией матки (миома с деформацией полости матки, аденомиоз III-IV стадии распространения по данным УЗИ, врожденные аномалии

развития) и любыми заболеваниями и отклонениями в соматическом статусе, являющимися противопоказанием для вынашивания беременности.

При исходном обследовании больных использовали общепринятые клинико-диагностические методы, включавшие стандартный опрос, объективное гинекологическое и терапевтическое обследование, инфекционный скрининг, анализ спермограммы партнёра.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эффективность программы ЭКО в старшем репродуктивном возрасте зависит не только от возрастного фактора и овариального резерва, но также и от ответа яичников на стимуляцию суперовуляции, при этом бедный ответ снижает ЧНБ на перенос эмбрионов у пациенток в возрасте 38-40 лет в 2 раза (с 38,8% до 19,3%), а в возрасте 41-43 лет - в 3,5 раза (с 18,8% до 5,3%).
2. Частота отмен переноса эмбрионов из-за их морфологических дефектов увеличивается у пациенток 41-43 лет до 27%, то есть у 1/3 пациенток старшей возрастной группы приходится прерывать попытку ЭКО именно по указанной причине.
3. Среди наступивших беременностей у пациенток 41-43 лет со сниженным овариальным резервом репродуктивные потери в первом триместре достигают 25%, что является показанием к использованию ооцитов донора.
4. У пациенток старшего репродуктивного возраста при использовании ооцитов донора в программе ЭКО-ОД показатель ЧНБ выше почти в 2 раза, чем при проведении стимуляции суперовуляции (40,5% в ОД и 23,4% в ЭКО); при этом частота репродуктивных потерь в первом триместре наступившей беременности в программе ЭКО-ОД ниже в 1,5 раза, чем при ЭКО с собственными клетками у пациенток со сниженным овариальным резервом (10% против 15%).

Личный вклад автора в проведении исследования

Личный вклад автора состоит в выборе направления исследования, постановке задач, в сборе анамнестических данных, самостоятельном проведении всех

исследований, динамическом клиническом обследовании и лечении, а также в анализе эффективности проводимого лечения. Автором самостоятельно проводились систематизация, статистическая обработка, анализ полученных результатов. Лично автором были подготовлены к публикации 5 печатных работ по теме диссертации, из них 4 – в изданиях, рекомендуемых перечнем ВАК РФ.

Степень достоверности полученных результатов

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы «Statistica-6», включающей все необходимые методы описательной и вариационной статистики (Халафян А.А., 2011). Для оценки достоверности различий между сопоставляемыми группами по качественным признакам использовали непараметрический критерий Пирсона (χ2-тест). Сравнение частот выполняли с аппроксимацией нормального распределения. Различия между сравнивавшимися группами по анализируемым признакам во всех случаях расценивали как достоверные при уровне значимости $p<0,05$.

Апробация и внедрение результатов исследования в практику

Разработанная тактика ведения инфертильных пациенток позднего репродуктивного возраста с УЗ-признаками снижения овариального резерва, апробирована в клинической практике отделения репродуктологии ГБУЗ МО МОНИИАГ. Обсуждение диссертации состоялось на заседании Ученого совета ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» Минздрава Московской области 5 июня 2018 г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, 4 — в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК МО и науки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация написана на русском языке, изложена на 132 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследования», двух глав результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Текст работы иллюстрирован 20 таблицами и 5 рисунками. Библиография включает 145 литературный источник, в том числе 59 на русском и 86 на английском языках.

ГЛАВА 1.
БЕСПЛОДИЕ У ПАЦИЕНТОК СТАРШЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА (обзор литературы)

1.1. Основные проблемы снижения фертильности в старшей возрастной группе.

На сегодняшний день проблема бесплодия является чрезвычайно актуальной во всех развитых странах мира, включая РФ [43, 121, 133, 140]. Частота бесплодия в разных регионах Российской Федерации составляет от 8 до 19% супружеских пар фертильного возраста [29, 30, 40, 51]. В Российской Федерации ежегодно регистрируется около 6,5 миллионов женщин и около 4 миллионов мужчин с бесплодием и эти показатели не имеют тенденции к снижению [63].

В Европе до 6% беременностей наступает в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий, в нашей стране доля таких беременностей значительно ниже и составляет всего 0,3-0,7%. За последние три десятка лет благодаря внедрению в практику данных методов во всем мире родилось более 5 миллионов детей [13, 102, 103, 133]. Развитие методов вспомогательной репродукции, в том числе экстракорпорального оплодотворения, представляется одним из актуальных на сегодняшний день направлений в лечении бесплодия во всём мире [1, 43, 85, 114, 115]. Средняя частота наступления беременности в европейских центрах в программе экстракорпорального оплодотворения составляет 32,5% [85, 103, 107].

Основными причинами женского бесплодия в 40-50% случаях становится трубно-перитонеальный фактор, в 15-30% - различные эндокринные нарушения и в 20-30% - эндометриоз [34].

В европейских странах тенденция позднего материнства стала себя заметно проявлять в последней трети прошлого века [54]. В России в начале XXI века количество детей, рожденных женщинами в возрасте старше 35 лет, не превышало 7%. Однако уже в 2008 году количество родов у женщин в возрасте

после 30 лет в г. Москве возросло на 44%. Для женщин старше 40 лет прирост родов составил 3,3% в сравнении с показателями 2004 года [7, 32, 102]. Очевидно, что проблема старения рожениц имеет все более возрастающую социальную значимость, так как в настоящее время наблюдается рост числа женщин позднего репродуктивного возраста, обращающихся в клиники с целью лечения бесплодия [114, 118, 131, 139, 140].

Реализовать функцию деторождения женщинам старшего репродуктивного возраста достаточно затруднительно, учитывая физиологическое снижение фертильности. При этом у ряда пациенток успешное лечение бесплодия возможно только с применение методов вспомогательной репродукции [51, 122, 131, 132, 141].

Многие медицинские отрасли вовлечены в решение проблемы бесплодия, создаются ассоциации специалистов во всем мире. Известно, что идея использования метода экстракорпорального оплодотворения с целью лечения женского бесплодия у ученых возникла еще в конце XVIII века [2]. Великому успеху ученых R. Edwards и P. Steptoe предшествовал тяжелый труд и огромное количество неудачных попыток переноса эмбрионов. После рождения первого «ребенка из пробирки» началось становление, развитие и совершенствование методов вспомогательных репродуктивных технологий во всем мире [1, 8, 142].

Метод ЭКО подразумевает использование генетического материала обоих родителей. Однако у определенной категории пациенток невозможно получить собственный генетический материал для последующего оплодотворения. К этому могут привести такие состояния, как врожденное отсутствие яичников, синдром хирургической менопаузы, истощение яичников, а также поздний репродуктивный возраст. Указанные ситуации ставят вопрос об использовании донорского материала, полученного от молодой женщины, оплодотворение ооцитов спермой мужа с дальнейшим переносом генерированных эмбрионов в полость матки пациентки [11, 13, 35, 109, 111]. Впервые беременность после ЭКО была достигнута в 1978 году в Англии. Первая попытка ЭКО с применением донорских ооцитов была выполнена в Австралии в 1984 году, но она закончилась

неудачно. С тех пор проводилось множество попыток с использованием донорского генетического материала, но лишь в 1986 году в Южной Африке после проведения программы ЭКО с ооцитами донора у пациентки старшего репродуктивного возраста, после переноса двух эмбрионов, наступила беременность, в результате которой родились две здоровые девочки.

С возрастом репродуктивная система претерпевает определенные изменения, как у женщин, так и у мужчин. Но при этом имеются существенные различия в процессах угасания женской и мужской репродуктивной функции [18, 95, 127]. Фертильность женщин с возрастом значительно снижается [59, 63, 113, 115, 130]. Согласно данным Z. Rosenwaks, фертильность 35 летней женщины составляет не более 50 % от потенциальной фертильности 25 летней женщины. В возрасте 38 лет фертильность снижается до 25 %, а у женщин 40 лет составляет менее 5 % [26, 35, 38, 115, 126]. По данным литературы с 35 лет у женщин отмечается постепенное угасание генеративной функции, а в возрасте 45-50 лет – менструальной и гормональной функции [26, 31, 52, 53, 115]. Таким образом, необратимое выключение репродуктивной функции опережает по времени прекращение менструальной функции, причем эта закономерность проявляется одинаково у представителей разных стран и мало зависит от условий жизни [11, 113, 117].

Из всех пациенток, обращающихся в центры экстракорпорального оплодотворения, около 40% составляют женщины старшего репродуктивного возраста, причем их количество увеличивается с каждым годом [5, 33, 39, 63, 73]. Процент пациенток в возрасте 35 лет и старше, получающих лечение бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения, за последние два десятиления увеличился с 33,1% до 43,3% [13]. Данную тенденцию объясняет изменение социальных ориентиров женщин, способствующих откладыванию материнства на более поздний репродуктивный период. Кроме того, причинами обращения женщин старшего репродуктивного возраста в центры экстракорпорального оплодотворения являются желание иметь ребенка в повторном браке или несвоевременное оказание специализированной медицинской помощи [11, 33, 36,

66]. Некоторые женщины откладывают материнство, т.к. считают, что возможности вспомогательных репродуктивных технологий неограниченны и их применение является эффективным независимо от возраста женщины [46, 67, 110]. Эти обстоятельства являются причиной низкого процента наступления беременности и количества родов у данной категории женщин и обусловливают низкую эффективность программ экстракорпорального оплодотворения [13, 22, 27]. Физиологическое возрастное снижение репродуктивных возможностей указывает на необходимость точной оценки репродуктивного потенциала женщины с целью выбора тактики и прогнозирования успеха лечения бесплодия [58, 63, 88].

У женщин старшего репродуктивного возраста (≥ 40 лет) частота наступления беременности по данным РАРЧ (Российской Ассоциации репродукции человека) за 2013 г. составляла 16%, в то время как у молодых женщин (до 35 лет) – 38% [33, 36, 53,102].

Угасание репродуктивной системы существенно снижает результаты при лечении бесплодия, а эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у женщин позднего репродуктивного возраста определяется состоянием овариального резерва и не зависит от применяемых схем стимуляции функции яичников и эмбриологических пособий. Таким образом, при крайне низком овариальном резерве лечение бесплодия с использованием собственных ооцитов в программах вспомогательных репродуктивных технологий не эффективно [33, 81, 82].

По мнению многих специалистов [133, 137, 145], одним из важнейших параметров, влияющих на рецептивность эндометрия, является его толщина в преовуляторном периоде, определяемая по данным трансвагинального УЗИ. Ряд авторов указывает на снижение восприимчивости эндометрия у женщин старшей возрастной категории, что связано с ухудшением маточного кровотока, сниженной чувствительностью к прогестерону или наличием внутриматочной патологии [117, 145]. Распространенность маточной патологии (фибромы, полипы эндометрия) увеличивается с возрастом, однако отсутствуют доказательства, что

данные факторы оказывают значительное влияние на снижение частоты наступления беременности. Однако другие авторы показали, что возраст не оказывает существенного влияния на рост эндометрия в дотрансферном периоде [71, 84, 123]. Как правило, женщины старшего репродуктивного возраста довольно часто имеют в анамнезе более двух попыток процедур экстракорпорального оплодотворения [26].

Беременность женщин позднего репродуктивного возраста может сопровождаться большим числом осложнений и репродуктивных потерь. Согласно данным экспертов [33, 137], спектр и частота встречаемости осложнений, за исключением первого триместра, не различаются между индуцированными и спонтанно наступившими беременностями. Причинами ранних эмбриологических потерь являются нарушение имплантации плодного яйца и низкое качество эмбрионов [18, 125]. Известно, что имплантация представляет собой не односторонний процесс активной инвазии, а является результатом сложного «энзиматического» взаимодействия между бластоцистой и эндометрием, для которого необходима гормональная стимуляция и определенная зрелость эндометрия [50, 57, 77]. Высказывается лишь предположение о том, что при слишком тонком эндометрии бластоциста в процессе имплантации очень близко соприкасается со спиральными артериями и находится в области высокой концентрации кислорода, что негативно отражается на ее способности к нидации [78, 143, 144].

Ученые относят беременность у женщин старшего репродуктивного возраста к группе высокого риска, такие пациентки требует тщательного наблюдения, а также проведения необходимых лечебных процедур и генетического обследования, в том числе иногда с применением инвазивных методов при подозрении на анеуплоидии у плода. У данной категории пациенток рекомендуется применять оперативное родоразрешение в плановом порядке с целью снижения неонатальных осложнений [33, 129].

Очень серьезным и важным является вопрос о полноценности беременностей, наступивших в результате применения вспомогательных

репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста. Согласно данным авторов, репродуктивные потери у женщин старшего репродуктивного возраста, забеременевших с помощью методов экстракорпорального оплодотворения, достигают 30% [48, 54, 129]. Но, при донашивании беременности частота неонатальных осложнений и пороков развития рожденных детей не превышает популяционной нормы [96].

Учитывая тенденцию откладывания деторождения на более поздний возраст по социально-экономическим причинам, как в европейских странах, так и на территории Российской Федерации, особенно среди городского населения, в клиниках репродуктивного здоровья наблюдается тенденция увеличения количества пациенток старшего возраста. В свою очередь надо отметить, что в старшем возрасте, учитывая физиологическое изменение репродуктивной системы, снижается частота наступления беременности, а частота хромосомной патологии резко возрастает.

В современной концепции угасания репродуктивной системы у женщин ведущая роль принадлежит истощению фолликулярного аппарата яичников [11, 31, 63, 100]. Истощение фолликулярного аппарата яичников – физиологический процесс, который происходит постоянно. К концу репродуктивного периода он усиливается. Известно, что у женщин старше 37 лет насчитывается около 25 тысяч фолликулов, а к перименопаузальному периоду остается около 1 тысячи фолликулов [10, 52, 112]. Менопауза наступает при уменьшении в гонадах числа фолликулов до значений менее одной тысячи [120, 123, 135].

Фертильность женщин начинает снижаться за много лет до наступления менопаузы, несмотря на продолжение регулярных овуляторных циклов [63]. Голландский ученый E. Te Velde обнаружил четкую зависимость между временем окончания способности к зачатию, средним возрастом начала нерегулярных менструаций (в среднем в 45-46 лет) и средним возрастом наступления менопаузы. Согласно данным авторов [11, 23, 64], утрачивание репродуктивной функции происходит за 7-8 лет до менопаузы и за 3-4 года до начала возрастных нарушений цикла. Кроме того, с возрастом прогрессивное снижение

фертильности происходит не только из-за уменьшения количества яйцеклеток [4, 137, 138, 139], но также и ухудшения их качества, увеличения числа дегенеративных ооцитов, анеуплоидии и снижения частоты оплодотворения [60, 79, 103]. Впервые этот феномен привлек внимание исследователей в 30-х годах прошлого века, когда было выявлено, что вероятность рождения ребенка с трисомией по 21 хромосоме (синдром Дауна) имеет явную зависимость от возраста матери [11]. Наиболее высокий риск рождения ребенка с врожденной патологией имеют женщины старше 40 лет. Согласно данным зарубежных авторов у женщин в возрасте до 25 лет риск рождения больного ребенка равен 1/1400, в 35 лет он возрастает до 1/350 и с каждым годом прогрессивно увеличивается, достигая значений 1/60 к 42 годам и 1/12 к 49 годам [60, 101, 132, 135, 142]. Развитие цитогенетики позволило выявить взаимосвязь многих анеуплоидий по всем хромосомам с возрастом матери. Одновременно было доказано, что возрастное увеличение вероятности анеуплоидии определяет высокую вероятность самопроизвольного прерывания беременности у женщин старшего репродуктивного возраста. Анеуплоидия в яйцеклетках играет существенную роль в уменьшении эффективности репродукции у женщины и может служить основным фактором в снижении ее репродуктивной функции в пременопаузальный период [11, 116, 117].

В исследовании К.С. Ермоленко показано, что у женщин, находящихся в старшем репродуктивном возрасте наблюдается резкое снижение секреции мелатонина, приводящее к нарушению менструальной функция и овуляции, развитию атрезии фолликулов, нарушению функции желтого тела, возникновению первичной овариальной недостаточности [22]. Возрастное снижение выработки мелатонина свидетельствует о расстройстве эпифизарного и гипофизарного контроля над яичниковой цикличностью и указывает на прогрессивное угасание репродуктивной функции женщины [22, 119]. Прогрессивное снижение ночных пиков мелатонина свидетельствует о десинхронизации циркадной периодичности эпифиза, и по данным автора может быть связано с началом и развитием менопаузы [95, 136].

В настоящее время интерес ученых растет к определению овариального резерва как маркера индивидуального биологического возраста яичников. Многочисленные исследования доказывают, что состояние овариального резерва коррелирует с возрастом женщины [58, 59, 69, 131] и имеет важнейшее значение для прогноза лечения бесплодия с применением экстракорпорального оплодотворения [16, 68, 81, 113].

Овариальный резерв (ОВР) – это функциональный запас женских гамет в яичниках, определяющий их способность обеспечивать развитие здорового фолликула с полноценной яйцеклеткой [33, 59, 66]. ОВР отражает количество находящихся в яичниках как примордиальных, так и растущих фолликулов, и зависит от многих системных (гормональных) и локальных тканевых факторов, регулирующих гомеостаз в женских гонадах [10, 37, 58, 97]. Исследования отечественных и зарубежных ученых показали, что начиная с периода, когда количество фолликулов я яичнике сокращается до 25000, а это, как правило, приходится на возраст 37,5 лет, частота атрезии фолликулов удваивается [31, 63, 115]. Именно этот возраст считается критическим [9, 33, 115, 136].

У женщин в возрасте 38 лет отмечается прогрессирующее уменьшение количества малых антральных фолликулов, чувствительных к стимулирующему эффекту фолликулостимулирующего гормона, что является одной из основных причин слабого ответа яичников на их стимуляцию гонадотропинами в циклах экстракорпорального оплодотворения [36, 107, 108].

Кроме возраста женщины, маркерами состояния овариального резерва являются характер менструального цикла, уровни ФСГ, АМГ, эстрадиола , ингибина В, объем яичников, число антральных фолликулов в них.

Для оценки состояния овариального резерва в гормоночувствительной стадии фолликулогенеза особое значение имеет определение сывороточой концентрации антимюллерового гормона, выделяемого клетками гранулёзы фолликула [64, 139]. Уровень АМГ отражает величину пула примордиальных фолликулов и может рассматриваться как наиболее точный маркер ОВР [14, 33, 111]. Продукция АМГ у новорожденной девочки минимальна, но начинает

возрастать в пубертатном периоде и достигает максимальных значений в возрасте 20-30 лет. Далее уровень АМГ остается стабильным на протяжении всего репродуктивного периода. У женщин старше 35 лет отмечается постепенное снижение продукции АМГ и к моменту менопаузы его концентрация в крови приближается к нулевому значению [14, 30, 138].

Впервые определение уровня АМГ для оценки состояния ОВР было предложено в 2002 году [9]. Позже зарубежные авторы обнаружили, что уровень АМГ может быть маркером, демонстрирующим не только количество яйцеклеток, полученных в программе ЭКО, но также и их качество [86, 90]. В литературе отсутствует однозначное мнение о значении содержания АМГ в крови женщин, как четкого критерия низкого овариального резерва. Так, одни авторы считают, что снижение уровня АМГ ниже 1 нг/мл, должно расцениваться как признак редукции овариального резерва, который ассоциирован с высоким риском бедного ответа яичников на стимуляцию в циклах ЭКО. Другие же указывают, что вероятность ослабленного ответа достоверно возрастает при более низких значения АМГ (<0,5нг/мл) [11, 27].

Ингибин В играет существенную роль в регуляции синтеза ФСГ, поэтому определение его уровня с целью оценки ОВР также применяют в клинической практике [86, 131]. В репродуктивном периоде во время фолликулярной фазы уровни ингибина В и ФСГ обратно пропорциональны [27]. Увеличение уровня ингибина В отмечается при преобладании в яичниках малых антральных фолликулов перед вступлением их в стадию созревания. Значительное снижение уровня ингибина В (менее 40-45пг/мл) является показателем сниженного ОВР [86]. В программах ЭКО у пациенток с низкими значениями ингибина В специалисты отмечают высокую частоту отмены лечебных циклов и низкую частоту наступления беременности [27, 37, 38].

Слабый ответ яичников на стимуляцию оказывает негативное влияние на результаты ЭКО в связи с высоким риском неполучения эмбрионов хорошего качества для проведения этапа переноса эмбрионов. Известно, что только получение большого количества фолликулов (от 8 до 12) позволяет получить

достаточное количество эмбрионов (5-8) и выбрать из них самые лучшие по качеству в достаточном количестве (оптимальным считается получение хотя бы 3-4 эмбрионов высокого качества) [62].

Пациентки старшего репродуктивного возраста являются одной из самых сложных групп для выбора оптимального протокола стимуляции контролируемой суперовуляции [26]. Для этой группы пациенток, характеризующихся очень низким овариальным резервом, типично получение незначительного количества яйцеклеток в программах ЭКО [22]. У пациенток 40 лет и старше часто отмечается гипоергический (бедный) ответ на овариальную стимуляцию в программах ЭКО. Это проявляется либо полным отсутствием роста фолликулов, либо получением небольшого количества фолликулов и яйцеклеток (обычно менее 3-4) в ответ на назначение адекватных доз ФСГ [137].

В ситуации, когда количество полученных фолликулов не превышает четырех и удается получить не более 3-х ооцитов, проблема последующего отбора качественных эмбрионов, генерированных из столь незначительного числа яйцеклеток, становится практически неразрешимой. Следовательно, при недостаточном ответе яичников на стимуляцию, выбор эмбрионов для переноса базируется не на показателях качества, а на характеристике жизнеспособности, что значительно снижает эффективность лечения. В группе пациенток старшего репродуктивного возраста типично сочетание бедного ответа на стимуляцию гонадотропинами с низким качеством созревающих яйцеклеток, в конечном итоге приводящее к неэффективности процедуры ЭКО [53, 116, 118].

Несомненно, что у пациенток старшего репродуктивного возраста сочетание ослабленной реакции яичников на стимуляцию с увеличением доли дефектных яйцеклеток (снижающих качество генерируемых из них эмбрионов) усугубляет неблагоприятные последствия бедного ответа [103, 139, 141, 142]. Это хорошо объясняет более выраженное негативное влияние ослабленного ответа на результаты ЭКО у женщин старшей возрастной категории в сравнении с более молодыми пациентками, качество яйцеклеток которых существенно лучше [39, 56]. У женщин позднего репродуктивного возраста с бедным ответом на

стимуляцию суперовуляции удается достичь беременности только в 10% случаев [6, 92]. В этом контингенте бедный ответ яичников на стимуляцию в 24% становится причиной прекращения циклов экстракорпорального оплодотворения. Проведение повторных циклов у женщин с низким овариальным резервом характеризуется высокой частотой эмбриональных потерь (не менее 45%). Если же удается достичь этапа эмбриотрансфера, то частота наступления беременности оказывается очень незначительной и составляет не более 3-5% [58, 72, 88].

1.2. Криоконсервация как метод сохранения генетического материала в программах ВРТ.

Методы криоконсервации ооцитов и эмбрионов позволили значительно расширить клинические возможности в лечении бесплодия [44]. На данный момент криотехнологии получили очень широкое распространение и вполне обоснованно рассматриваются как безопасные и экономически целесообразные методы повышения эффективности программ ВРТ [17]. Криоконсервации сегодня подвергают сперматозоиды, эмбрионы, неоплодотворенные яйцеклетки, а также ткань яичников [5]. В различных странах частота криопереносов по отношению к общему количеству циклов экстракорпорального оплодотворения по данным разных авторов варьирует от 15 до 35% [3, 57, 102]. В нашей стране данный показатель составляет 18% [17].

В мировой практике накоплен небольшой опыт успешного достижения беременности после размораживания и оплодотворения зрелых яйцеклеток [15, 129, 130]. На сегодняшний день известны различные методы криоконсервации ооцитов. Долгое время специалисты для криоконсервации ооцитов применяли протокол медленного замораживания. При этом жизнеспособность сохраняли только 50-60% яйцеклеток, что было связано с образованием кристаллов льда в процессе замораживания [15, 20]. К настоящему времени удалось нивелировать данный негативный эффект замораживания путем использования метода витрификации. Согласно данным различных исследований, применение витрификации позволило получить такую же эффективность оплодотворения

криоконсервированных ооцитов после их размораживания как и у нативных яйцеклеток [83, 127]. При витрификации жизнеспособность сохраняют более 80% ооцитов, а частота наступления беременности в результате оплодотворения витрифицированных яйцеклеток составляет около 30% на перенос эмбрионов [61, 80, 107, 108].

Важнейшим фактором, определяющим успех эмбрионального развития, является возраст яйцеклеток. Заморозка ооцитов позволяет остановить возраст яйцеклеток [76]. Длительное хранение в жидком азоте не оказывает влияния на качество ооцитов. В мировой практике описаны случаи успешного наступления беременности и родов после переноса эмбрионов, хранящихся в криобанке более 10 лет [65, 124].

Замораживанию можно подвергать все оставшиеся эмбрионы хорошего качества после проведения экстракорпорального оплодотворения с целью их применения в случае неудачной попытки свежего переноса [15]. Здесь следует указать, что при проведении ЭКО как правило остаются эмбрионы, пригодные для криоконсервации [57]. Согласно многим сообщениям жизнеспособность эмбрионов при криоконсервации зависит от их морфологии и физических факторов. К физическим (техногенным) факторам относят скорость замораживания/оттаивания и используемые химические криопротекторы [44]. Однако ряд авторов отрицает влияние способа криоконсервации эмбрионов на их качество и жизнеспособность [5, 108, 134].

По данным литературы 80-92% эмбрионов после криоконсервации сохраняют жизнеспособность [3, 57, 107]. Заслуживает внимания, что на стадии пронуклеусов определить качество эмбрионов не представляется возможным. При криоконсервации эмбрионов на данной стадии эмбриологи отмечают наличие высокой вероятности хаотического рассеивания хромосом и гибели зигот. Пригодными для криоконсервации считаются эмбрионы высокого качества, находящиеся на ранних стадий дробления (6-8 бластомеров) и стадии бластоцисты [3, 130].

В работах отечественных авторов, посвященных изучению влияния различных нетехногенных факторов на эффективность криопереносов эмбрионов, показано, что различия по частоте наступления беременности у пациенток до 35 лет и старше 36 лет отсутствуют [24, 25, 44]. То есть, возраст женщин не оказывает влияние на вероятность наступления беременности при переносе размороженных эмбрионов, а ведущая роль принадлежит качеству переносимых после разморозки эмбрионов [25, 81, 103].

Частота наступления беременности вероятно зависит от сроков развития эмбриона в момент заморозки. Так, одни источники отмечают лучшие результаты при переносе 3-х дневных криоэмбрионов [44]. Однако, другие авторы считают, что криоконсервация эмбрионов на 5-й день культивирования дает наилучший прогноз наступления беременности в связи с более качественной селекцией эмбрионов [15, 21, 133].

Также немаловажным фактором, обеспечивающим успешный результат ЭКО, является количество перенесенных эмбрионов. Однако при увеличении числа переносимых эмбрионов возрастает частота многоплодных беременностей, имеющих довольно много осложнений, как со стороны матери, так и со стороны плодов. Проблема многоплодия при проведении ЭКО чрезвычайна актуальна. В настоящее время рекомендуется переносить не более 2-х эмбрионов. Однако пациенткам старшего репродуктивного возраста, при многократных неудачных попытках ЭКО, получении эмбрионов низкого качества допустим перенос 3-х эмбрионов [57]. Это способствует достижению беременности несколько чаще, чем при переносе 1-2 эмбрионов [41, 44].

По данным литературы, частота наступления беременности при переносе размороженных после криоконсервации эмбрионов составляет от 28 до 35,5%, что не отличается от результатов, получаемых при использовании свежих эмбрионов [17, 57, 93, 102]. Некоторые авторы считают, что у пациенток с мужским фактором бесплодия вероятность наступления беременности снижается в два раза при использовании размороженных эмбрионов вместо свежих [44, 59, 83, 124].

После разморозки эмбрионы могут быть в тот же день перенесены в полость матки пациентки [15]. Доказано, что эффективность циклов с криоконсервацией эмбрионов напрямую зависит от возраста матери на момент забора яйцеклеток. В меньшей степени на результаты программ ЭКО-крио влияет возраст женщины, которой производится перенос размороженных эмбрионов [65, 110, 125].

Метод криоконсервации эмбрионов в настоящее время достаточно хорошо отработан технически и поэтому широко используется на практике. В отличие от него, метод криоконсервации ооцитов все еще дорабатывается с целью дальнейшего повышения его эффективности. При этом очевидно, что возможность длительного низкотемпературного сохранения ооцитов обеспечивает условия как для их использования у пациенток-доноров в более позднем возрасте, так и для создания криобанка ооцитов для пациенток-реципиентов, включаемых в программу ЭКО-ОД [28, 74, 75].

1.3. Донорские программы как метод преодоления бесплодия в старшем репродуктивном возрасте.

Ученые разных стран, изучая проблемы бесплодия женщин позднего репродуктивного периода, сделали выводы, что возраст 38-42 года позволяет достичь беременности в результате ЭКО, однако, эффективность лечения оказывается довольно низкой. Вероятность наступления беременности с собственным генетическим материалом у женщин в возрасте 43-45 лет еще более сомнительна, а в возрасте 46 лет фактически равна нулю. Цитогенетические исследования яйцеклеток, полученных от женщин различного возраста, выявили увеличение количества дегенеративных форм ооцитов у большинства женщин позднего репродуктивного возраста. Кроме того, у пациенток старшей возрастной группы (38-43 года), наблюдается снижение оплодотворяемости яйцеклеток на 30-40% по сравнению с женщинами более молодого возраста (до 35 лет). Нередко наличие хромосомных аномалий не отражается на визуально определяемом фенотипе ооцитов и полученных из них эмбрионов [52, 90, 106]. На практике это приводит к тому, что часть переносимых эмбрионов может иметь скрытые

дефекты, которые невозможно распознать зрительно. Как правило, результатом переноса таких эмбрионов становится либо их неспособность к имплантации, либо нарушение развития, провоцирующее репродуктивные потери, в особенности на ранних сроках беременности [12, 116, 117, 121]. Многие исследователи отмечают, что у пациенток старшего репродуктивного возраста в программе ЭКО чаще наблюдаются неудачи на этапе имплантации переносимых эмбрионов, а при наступлении беременности у них оказывается значительно более высокой частота ранних репродуктивных потерь, чем у молодых женщин [99, 104, 124]. Это свидетельствует об увеличение с возрастом в женских половых клетках разного рода скрытых генетических аномалий, которые не выявляются ни визуально, ни с помощью существующих на сегодняшний день методов преимплантационной генетической диагностики [6, 19, 112, 140].

Анеуплоидия является основной причиной выкидышей и снижения живорождаемости у женщин позднего фертильного возраста [63, 70, 122, 126]. Риск рождения ребенка с синдромом Дауна и другими хромосомными аномалиями увеличивается с возрастом матери в результате снижения качества яйцеклеток [47, 117, 126, 140].

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о крайне низком уровне фертильности у женщин старшего репродуктивного возраста, обуславливающим низкую эффективность лечения бесплодия у данной категории пациенток даже с помощью программ ВРТ с использованием собственного генетического материала. Данный факт следует принимать во внимание при прогнозирования результатов лечения бесплодия методом ЭКО с применением собственных ооцитов у женщин в возрасте 40 лет и старше. Именно по этой причине при лечении бесплодия у пациенток позднего репродуктивного возраста часто приходится прибегать к использованию ЭКО с применением донорских яйцеклеток [45, 94, 100, 106, 139].

Следует отметить, что, несмотря на высокую востребованность программ ЭКО-ОД у пациенток старшего репродуктивного возраста, во многих развитых странах Европы (например, в Германии, Норвегии и Швеции) такие программы

запрещены. При этом в Испании, Португалии, Греции, Бельгии, Финляндии и Российской Федерации таких запретов нет, но данные программы не финансируются государством и поэтому возможны к исполнению либо в альтруистическом варианте, либо и на коммерческой основе [42, 91, 128, 134].

У женщин, имеющих тяжелые или некурабельные заболевания яичников, при которых функция яичников отсутствует вообще или сохранена лишь частично, получение беременности является крайне сложной задачей [20, 87]. У них фактически невозможно применение классического варианта ЭКО, предусматривающего использование собственных ооцитов [20, 55]. Поэтому такие женщины представляют основную когорту пациенток, нуждающихся при лечении бесплодия в использовании программы донации ооцитов [1, 88]. Назначение ЭКО с ооцитами донора показано также при лечении бесплодия у женщин фертильного возраста с преждевременной менопаузой, дисгенезией гонад, синдромом резистентных яичников, с наследственными генетическими заболеваниями, у женщин с хирургической, радиационной или медикаментозной кастрацией [1, 20, 21]. Как уже сообщалось выше, вероятность рождения ребенка у женщины после 40 лет в результате ЭКО с использованием собственных яйцеклеток очень низка, что обуславливает целесообразность использования яйцеклеток донора и у данной категории пациенток [37, 63, 100, 119].

В исследовании К.Ю. Боярского получены данные, свидетельствующие о том, что при использовании донорских ооцитов у пациенток в возрасте 45 и даже 55 лет, их акушерские показатели, не отличаются от таковых у пациенток более молодого возраста, проходивших лечение бесплодия по аналогичной программе [11]. Применение донорских ооцитов у женщин позднего репродуктивного возраста способно значительно повысить эффективность лечения бесплодия не только потому, что у них очень низкий овариальный резерв, но и вследствие того, что яйцеклетки этих женщин зачастую имеют неудовлетворительное качество [63, 103, 142]. По данным ряда авторов было показано, что проведение ЭКО у пациенток старшего репродуктивного возраста в программе с применением донорских ооцитов, сопровождается повышением эффективности лечения

бесплодия. Отмечается увеличение частоты имплантации и уменьшение риска ранних репродуктивных потерь по сравнению с женщинами этой же возрастной категории, у которых в процедуре ЭКО используются собственные яйцеклетки [35, 98, 105]. По многим причинам использование метода предимплантационной генетической диагностики становится особенно актуальным у пациенток старшего репродуктивного возраста, а также в программах ЭКО с применением ооцитов донора для исключения рисков переноса эмбрионов с генетическими отклонениями.

Очень важным и обязательным компонентом программы донации ооцитов является отбор доноров яйцеклеток. Донорами яйцеклеток могут стать молодые женщины с момента достижения ими совершеннолетия до 35 лет, имеющие здоровых детей [42]. Донорам ооцитов проводится контролируемая стимуляция яичников, как в программах рутинного ЭКО, и осуществляется процедура забора яйцеклеток. Одновременно с этим женщина–реципиент проходит подготовку эндометрия к переносу эмбрионов. Самой важной задачей, требующей решения в реализации данной программы, является синхронизация циклов между донором и пациенткой для возможности проведения переноса свежих эмбрионов в одном цикле. В случае наступления беременности нужно поддерживать ее развитие экзогенными стероидными гормонами до срока 7–12 недель [1].

Тем не менее, несмотря на возможности, которые дает женщинам позднего репродуктивного возраста метод ЭКО с применением донорских ооцитов, существует большое количество проблем, требующих решения, одной из которых является обоснованность выбора нативных или витривицированных донорских яйцеклеток для генерации эмбрионов [11, 120, 121, 122]. Так, по мнению ряда авторов, очевидным преимуществом использования в программе ЭКО-ОД витрифицированных ооцитов является то, что они уже находятся в криохранилище и не требуется длительное время на поиск и стимуляцию донора. По этой причине их применение возможно у пациенток, у которых не было получено ооцитов в программе стандартного ЭКО. При этом яйцеклетки донора оплодотворяются спермой мужа пациентки и сохраняются условия для

проведения переноса генерированных из них эмбрионов в том же цикле, в котором не удалось получить собственные ооциты пациентки, т.е. представляется возможность не «терять» лечебный цикл ЭКО.

Другие исследователи акцентируют внимание на том, что использование нативных ооцитов донора освобождает от необходимости использования криотехнологий, чреватых потерями ооцитов на этапах замораживания/оттаивания. Кроме того, использование нативных ооцитов обеспечивает получение достаточно большого количества эмбрионов, что обеспечивает условия как для выполнения предимплантационной генетической диагностики на дотрансферном этапе, так и для криоконсервации эмбрионов, которые являются более устойчивыми к криотравме в сравнении с ооцитами [74, 107].

Таким образом, все еще недостаточно представленный в литературе фактический материал о преимуществах и недостатках применениня в программах ЭКО-ОД нативных и витрифицированных ооцитов донора и, соответственно, отсутствие четких рекомендаций к использованию свежеполученных и криоконсервированных донорских яйцеклеток в программах ВРТ у пациенток старшего репродуктивного возраста послужило побудительным мотивом для проведения собственного исследования.

ГЛАВА 2.
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Критерии включения в исследование, общее количество наблюдений.

Настоящая работа, выполнявшаяся на базе отделения репродуктологии МОНИИАГ в 2013-2017 годах, предусматривала оценку зависимости клинических исходов программ ЭКО у пациенток старшего репродуктивного возраста при использовании:

- собственных ооцитов (стандартная программа ЭКО);

- донорских нативных ооцитов (программа ЭКО-ОД с переносом эмбрионов, получаемых из нативных донорских ооцитов);

- донорских витрифицированных ооцитов (программа ЭКО-ОД с переносом эмбрионов, получаемых из размороженных криоконсервированных ооцитов донора);

- криоконсервированных эмбрионов (программа ЭКО-ОД с переносом размороженных эмбрионов, предварительно полученных из нативных донорских ооцитов).

Клинические исходы характеризовали по показателям $ЧНБ_{ПЭ}$, $ЧНБ_{СЦ}$ и частоты ранних (в I триместре) репродуктивных потерь.

При решении поставленных в работе задач для аналитической обработки использовали фактический материал, собранный у пациенток старшего возраста только в циклах стандартного ЭКО и ЭКО-ОД, в которых удавалось перенести не менее 1-2 эмбрионов хорошего качества.

Стандартное ЭКО назначали пациенткам с сохранной менструальной функцией. В исследование включали в основном пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием, а также женщин с миомой матки небольших размеров (которая, как известно, не влияет на эффективность ЭКО), эндометриозом 1-2 степени и с мужским фактором бесплодия, не

сопровождаемым выраженными отклонениями морфологических характеристик мужских гамет.

Критерием к включению в программу ЭКО с использованием ооцитов донора, являлось резкое снижение овариального резерва, обусловленное возрастным фактором или оперативными вмешательствами на яичниках. Процедуру ЭКО-ОД назначали также женщинам с преждевременным истощением яичников, а также пациенткам с множественными неудачными попытками стандартного ЭКО, при выполнении которых имело место получение малого количества эмбрионов и/или происходила генерация эмбрионов низкого качества, что делало их непригодными к переносу.

Критериями исключения для всех включаемых в исследование групп пациенток являлись некомпенсированные эндокринопатии, патология матки и эндометрия (миома с деформацией полости матки, аденомиоз III-IV степени распространения по данным УЗИ) и любые заболеваниями и отклонения в соматическом статусе, являющиеся противопоказанием для беременности. Также в исследование не включали пары с тяжелой патозооспермией у мужа/партнёра.

Для участия в программе доноры ооцитов проходили полное обследование, регламентированное приказом 107н МЗ РФ от 30 августа 2013 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Согласно этому приказу, стать донором ооцитов может женщина в возрасте от 18 до 35 лет, физически и психически здоровая, не имеющая ярких фенотипических признаков или сильно выраженных внешних особенностей. Важным моментом являлось наличие у донора ооцитов как минимум одного здорового ребенка в возрасте старше 1-го года и отсутствие наследственных заболеваний.

На первом этапе был проведен ретроспективный анализ 628 циклов ЭКО у 418 пациенток в возрасте 38-43 лет, которым проводили стимуляцию яичников для получения собственного генетического материала. Все эти пациентки были включены в группу А (рис. 1). В зависимости от возраста, пациентки группы А были дополнительно распределены в группы AI и AII:

Группу AI представляли 336 пациентки в возрасте 38-40 лет, которые дополнительно были разделены на подгруппы AI-α и AI-β с учетом состояния их овариального резерва:

- в подгруппу AI-α вошли 204 пациентки с сохраненным овариальным резервом (более 6 антральных фолликулов в каждом яичнике, базальный ФСГ не более 12 МЕ/л, АМГ ≥ 1,0 нг/мл);
- подгруппу AI-β составили 132 пациентки со сниженным овариальным резервом (менее 6 антральных фолликулов в каждом яичнике, базальный ФСГ > 12 МЕ/л, АМГ ≤ 1,0 нг/мл).

В группу AII были включены 82 пациентки в возрасте 41-43 лет, которые также дополнительно были разделены на подгруппы AII-α и AII-β по состоянию овариального резерва:

- подгруппу AII-α составили 52 пациентки с сохраненным овариальным резервом резервом (более 6 антральных фолликулов в каждом яичнике, базальный ФСГ не более 12 МЕ/л, АМГ ≥ 1,0 нг/мл);
- подгруппу AII-β составили 30 пациенток со сниженным овариальным резервом резервом (менее 6 антральных фолликулов в каждом яичнике, базальный ФСГ > 12 МЕ/л, АМГ ≤ 1,0 нг/мл).

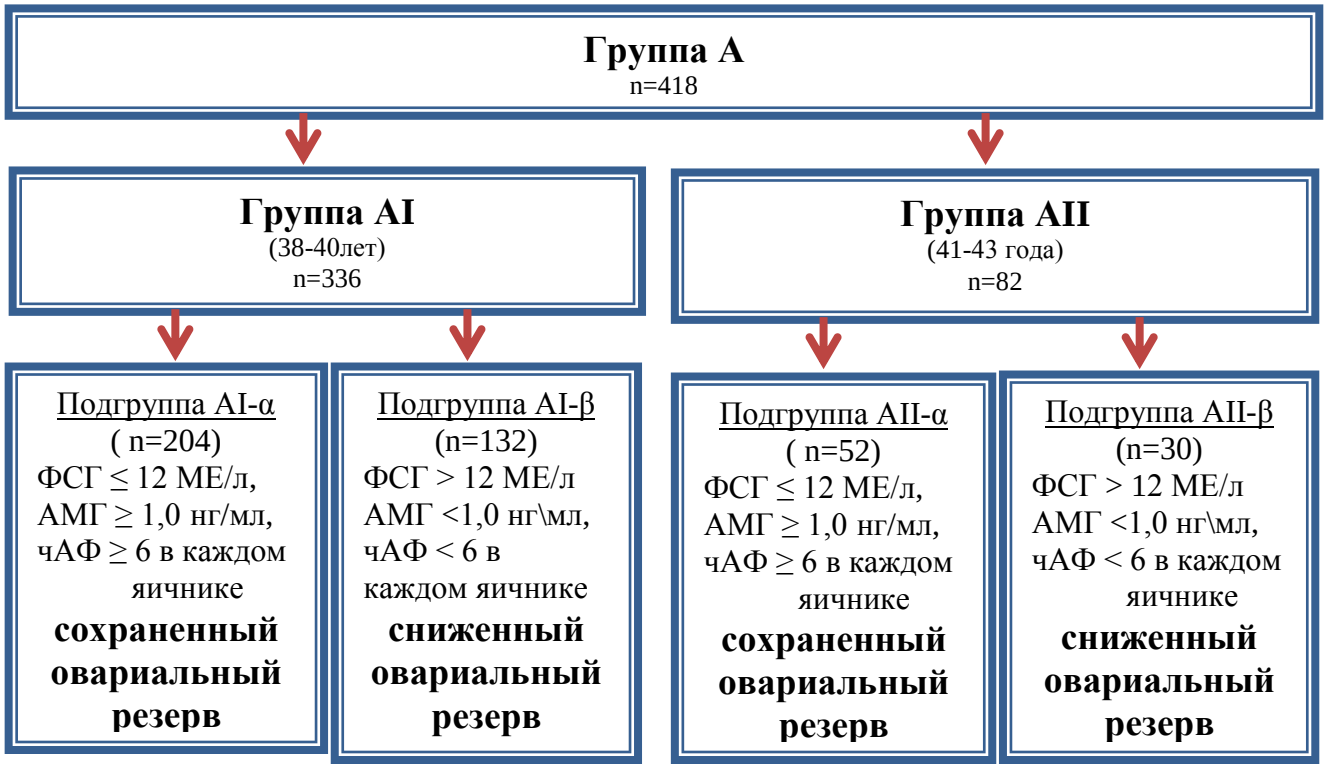

Рисунок 1
Распределение пациенток при ретроспективном анализе эффективности ЭКО с использованием собственных ооцитов

На втором этапе был проведен проспективный анализ исходов программ ЭКО с применением донорских ооцитов (рис. 2). В группу В были включены 222 пациентки в возрасте 38-50 лет. Учитывая разное «происхождение» донорских ооцитов, пациентки группы В были разделены на следующие подгруппы:

- подгруппа BI (115 женщин) - использована программа ЭКО с нативными ооцитами донора, предусматривающая синхронизацию циклов донор-реципиент, в которой пациентке осуществлялся перенос нативных эмбрионов;
- подгруппа BII (56 женщин) - использована программа ЭКО с переносом размороженных (ранее криоконсервированных) эмбрионов, полученных в результате оплодотворения нативных ооцитов донора.

- подгруппа BIII (51 женщина) – использована программа ЭКО с применением размороженных (ранее витрифицировпнных) ооцитов донора, в которой пациентке осуществлялся перенос эмбрионов на 5 сутки после оплодотворения.

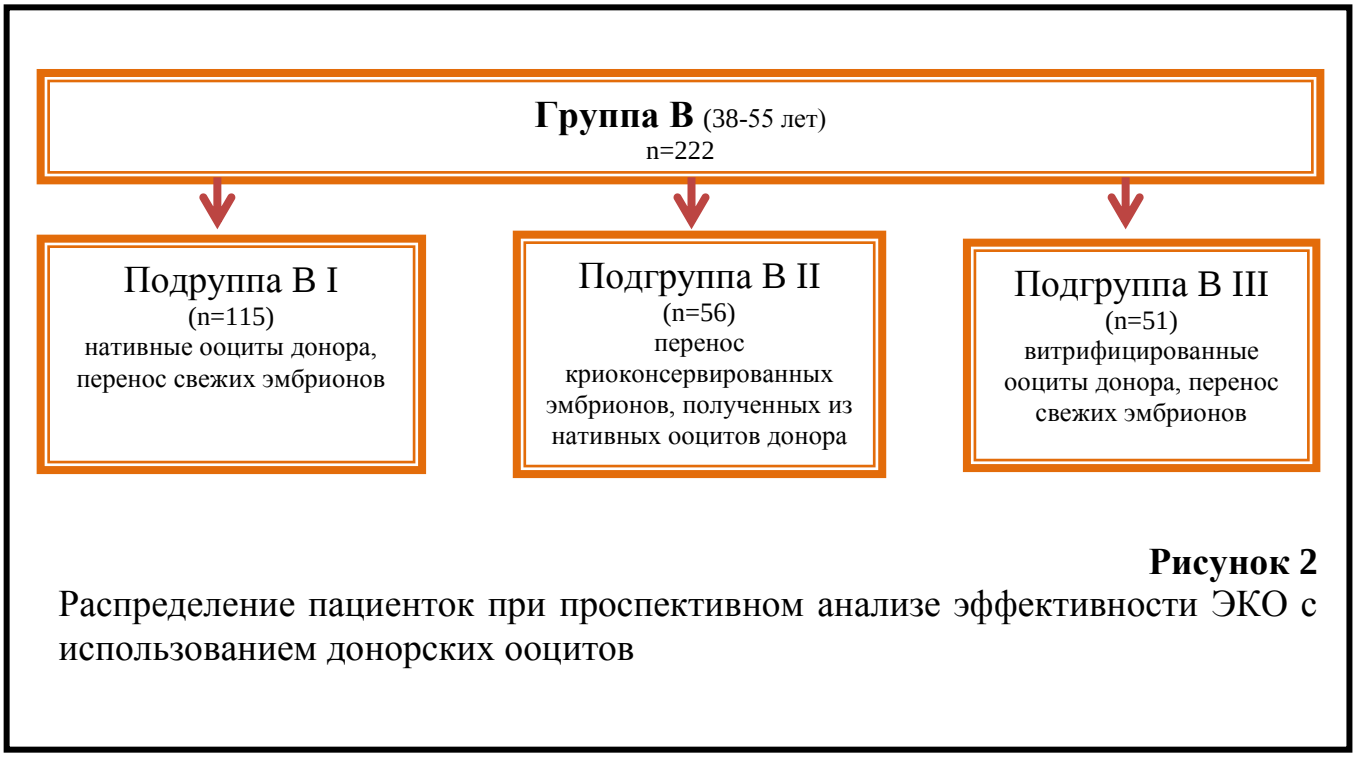

Рисунок 2
Распределение пациенток при проспективном анализе эффективности ЭКО с использованием донорских ооцитов

2.2. Клинико-лабораторные методы исследования.

Клиническое обследование пациенток и доноров ооцитов проводили согласно приказу Министерства здравоохранения РФ от 30 августа 2012 г. № 107н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению" для пациенток с бесплодием. Оценка состояния пациентки включало сбор анамнеза, первичный осмотр, гинекологическое обследование, УЗИ органов малого таза, а также заключение терапевта о состоянии соматического здоровья пациентки и отсутствии противопоказаний к беременности и родам. У женщин-доноров обязательным исследованием было определение кариотипа и получение справки от психиатра о не состоянии на учёте в нарко- и психдиспансере, а также наличие рожденного минимум одного здорового ребенка. Возраст доноров ооцитов вошедших в исследование колебался от 22 до 33 лет.

При первичном визуальном осмотре пациенток и доноров оценивали рост, вес, особенности телосложения, и возможное присутствие признаков эндокринно-обменных расстройств. Обязательно учитывали национальность, цвет и структуру волос, разрез и цвет глаз, овал лица и форму носа.

Для оценки состояния молочных желез использовали визуальный осмотр и пальпацию, при выполнении которых уточняли наличие в них объемных образований и выделений из сосков. Донорам проводилось УЗИ молочных желез, а всем пациенткам - маммография.

У доноров дополнительно уточняли образование, профессию, интересы и хобби, а также каждый донор предоставлял своё личное фото для участия в программе.

При гинекологическом обследовании у пациенток и доноров выполняли бимануальное исследование матки, яичников и осмотр шейки матки в зеркалах. Всем женщинам проводили простую или расширенную (по показаниям) кольпоскопию.

Эндоскопические методы обследования.

Всем пациенткам на этапе обследования и подготовки к программе ЭКО (перед циклом переноса эмбрионов) была проведена стандартная гистероскопия с РДВ или офисная гистероскопия с биопсией эндометрия для исключения внутриматочной патологии. Лапароскопия применялась исключительно при выявлении различной патологии (гидросальпинкс, миома, кисты яичников различной этиологии), как этап обследования и подготовки к программе ЭКО.

Лапароскопию и гистероскопию выполняли с применением аппаратуры фирмы KARL STORZ (Германия) по общепринятым методикам [15].

Ультразвуковое исследование матки и яичников выполняли с помощью аппарата фирмы “Samsung” Medison SONOACE (Корея). Для оценки состояния матки и яичников применяли трансвагинальный метод с использованием датчика EC4-9, при котором определялась толщина и эхо-структура эндометрия, состояние фолликулярного аппарата. При подозрении на наличие патологии

проводился экспертный УЗИ на аппарате экспертного класса SAMSUNG WS80OA с применением вагинального датчика E3-12A.

У пациенток, которым назначалась стимуляция яичников в программе ЭКО, а также у доноров ооцитов выполняли УЗ-мониторинг роста фолликулов. Пациенткам – реципиенткам в программе ЭКО-ОД проводили УЗ-мониторинг состояния толщины эндометрия.

УЗ-оценку толщины эндометрия при применении монотерапии препаратами эстрогенов (в программе ЭКО-ОД) выполняли на 8-9-й день контролируемого цикла и в день назначения препаратов прогестерона, при достижении эндометрия более 8мм. Пациентки, у которых эндометрий не достигал к этому времени толщины 7-8мм, не были включены в проводимое исследование.

Лабораторные методы исследования включали:

- общий и биохимический анализ крови, определение уровня глюкозы натощак;

- расширенную коагулограмму, Д-димер, волчаночный антикоагулянт;

- анализ крови на ВИЧ, австралийский антиген, RW;

- группу крови и резус–фактор;

- определение в крови антител к инфекции, входящей в TORCH-комплекс (токсоплазмоз, краснуха, цитомегаловирус, герпес 1 и 2 типы).

- общий анализ мочи.

Инфекционный скрининг предусматривал микроскопию влагалищных мазков и цервикального материала, а также ПЦР исследование для выявления хламидиоза, микоплазмоза, уреаплазмоза, трихомоноза.

Гормональный скрининг. Гормональное обследование проводили на этапе подготовки к стандартной программе ЭКО и донорам. Оно включало определение базального уровня ФСГ, ЛГ, E_2 и АМГ, общего тестостерона (общ.Т), дегидроэпиандростерона-сульфата (ДЭА-С), пролактина, ингибина В. Всем пациенткам проводилиь обследование на тиреоидную патологию дополнительно тестировали уровни трийодтиронина (Т3), тироксина (Т4) и тиреотропного гормона (ТТГ).

Определение уровней прогестерона и эстрадиола выполняли для гормонального мониторинга процесса проводимой десенситизации гипофиза, а также (наряду с данными ультразвукового мониторинга) для контроля эффективности используемых стимуляторов овуляции и расчета момента введения триггерной овуляторной дозы чХГ. У пациенток- реципиентов определение уровней прогестерона и эстрадиола использовали для мониторинга состояния эндометрия .

***Диагностика беременности*:** в крови определяли концентрацию уровня β-ХГЧ на 14 день после ПЭ (подтверждение «биохимической» беременности) и выполняли УЗИ матки на 21-23 день после ПЭ (подтверждение «клинической» беременности).

Все гормональные и биохимические исследования проводили в лаборатории перинатальной диагностики МОНИИАГ.

Обследование мужчины включало 2-кратный (с интервалом в 2 недели) анализ спермограммы с оценкой ее фертильности по критериям ВОЗ от 2010 года, а также инфекционный скрининг, группу крови и резус - фактор [15].

2.3. Методы лечения:

2.3.1 Программа стандартного ЭКО.

Этапы выполнения стандартной программы ЭКО:

- стимуляция яичников;
- трансвагинальная пункция фолликулов;
- оплодотворение (ЭКО или ИКСИ);
- культивирование эмбрионов;
- перенос эмбрионов;
- поддержка посттрансферного периода.

Стимуляцию яичников в контролируемых циклах ЭКО проводили:

- в длинном протоколе с агонистом ГнРГ, назначаемым с 19-21 дня предшествующего лечебному менструального цикла (у 69% пациенток);

- в коротком в протоколе с применением антагониста ГнРГ, назначаемого в лечебном цикле после достижения лидирующим фолликулом диаметра 14 мм (у 31% пациенток).

В подгруппах А I-α и А II-α, т.е. у пациенток с сохраненным овариальным резервом, при стимуляции суперовуляции яичников стартовая доза ФСГ в составе препаратов рФСГ или ЧМГ составляла 150-225 МЕ/сут. УЗ-мониторинг оценки роста фолликулов проводили начиная с 6-8 дня стимулированного цикла, далее каждые 2-3 дня с целью оценки роста фолликулов. При необходимости доза гонадотропинов корректировалась.

В подгруппах А I-β и А II-β, т.е. у пациенток со сниженным овариальном резервом, при проведении стимуляции яичников стартовая доза ФСГ в составе препаратов рФСГ или ЧМГ составляла от 300-350 МЕ/сут. Контроль за стимулированным фолликулогенезом проводили путем УЗ–мониторинга, как это было описано выше.

При достижении лидирующим фолликулом диаметра 17-20 мм вводили 10 тыс. МЕ триггера овуляции человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) и через 34-36 часов выполняли трансвагинальную пункцию всех фолликулов диаметром более 15 мм.

Пункция фолликулов:

Пункцию фолликулов проводили под внутривенным наркозом в асептических условиях операционной трансвагинальным доступом под УЗ-контролем. Осуществляли забор всех зрелых (диаметром более 15 мм) фолликулов при помощи аспирационной иглы (17G Oocyte Recovery Set 330mm). Фолликулярную жидкость собирали в круглодонные пробирки и далее пробирки передавали эмбриологам для выполения следующего этапа программы ЭКО.

Оплодотворение.

Оплодотворение осуществляли согласно стандартной методике, описанной в разделе 2.4. путем рутинной инсеминации или ИКСИ (см. ниже).

В данной работе у пациенток в группе А при получении более 5 ооцитов оплодотворение проводили с применением рутинной инсеминации, а при бедном

ответе (менее 5 ооцитов) у пациенток в группе А и у всех пациенток группы В (ооциты донора) выполняли оплодотворение методом ИКСИ Оплодотворение проводили через 38-40 часов после введения триггера овуляции.

Культивирование эмбрионов.

Культивирование эмбрионов выполняли в эмбриологической лаборатории в течение 5-6 суток после ТВП (глава 2.4).

Оценку морфологии эмбрионов проводили на следующих стадиях развития:

1) стадия зиготы (1-й день после оплодотворения);

2) стадия дробления (3-й день после оплодотворения);

3) стадия бластоцисты (5-й день после оплодотворения).

На 5-е сутки эмбриологи оценивали эмбрионы на наличие бластоцист, пригодных для переноса в полость матки или/ и криоконсервации.

Перенос эмбрионов.

Пациенткам всех групп перенос эмбрионов выполняли на 5-е сутки после трансвагинальной пункции в рамках стандартной программы ЭКО, а при проведении крио-программы - на 6-й день после назначения препарата прогестерона (5-е сутки культивирования эмбрионов). Перенос эмбрионов у всех пациенток проводили в операционной в асептических под УЗ-контролем с помощью одноразового катетера (Rocket Genesis (Рокет Генезис)).

Поддержка посттрансферного периода.

Поддержку посттрансферного периода проводили препаратами прогестерона, назначаемыми трансвагинально в дозе от 400-600мг/сутки. На 14-16 день после переноса эмбрионов оценивали уровень β-ХГЧ в венозной крови. У пациенток с подтвержденной биохимической беременностью гормональную поддержку продолжали до клинического (по данным УЗИ) подтверждения беременности (21-28-й день после ПЭ), а при визуализации плодного яйца в полости матки– продолжали до 10-12 недели беременности.

2.3.2. Программа ЭКО с использованием ооцитов донора.

При использовании в группе В ооцитов донора у всех пациенток были исключены этапы стимуляции и трансвагинальной пункции яичников.

Всем пациенткам, включенных в программу ЭКО-ОД проводили подготовку эндометрия с использованием монотерапии эстрадиолом (прогинова per os в дозе от 4 до 12 мг/сут). Терапию назначали со 2-3-4 дня менструального цикла. У пациенток с аменореей, назначение эстрогенов в свежей программе переноса эмбрионов совпадало с назначением препаратов для стимуляции суперовуляции у донора.

Контроль толщины эндометрия осуществляли с 7-8 дня терапии и далее каждые 2-3 дня. При достижении эндометрием толщины 8 мм и более по данным УЗИ для трансформации эндометрия в программах ЭКО у пациенток подгрупп и В II (n=56) и В III (n=51) (без синхронизации циклов с донором), добавляли препараты прогестерона, сохраняя прежнюю дозировку используемых эстрогенов.

У пациенток-реципиентов с сохранной функцией яичников при проведении программы ЭКО со свежими эмбрионами - подгруппа BI (n=115), предварительно проводили синхронизацию циклов донора и реципиента с помощью оральных контрацептивов монофазного состава, либо назначением агониста ГнРГ со 2-3 дня цикла, либо с 21-го дня предшествующего цикла. Препараты донору и реципиенту назначали так, чтобы после их отмены день начала цикла у донора и реципиентки совпадал.

У пациенток подгруппы BI (синхронизированных с донором) препараты прогестерона назначали в день пункции донора на фоне продолжающейся терапии эстрогенами.

Перенос эмбрионов осуществляли как и в программе стандартного ЭКО (см. выше).

Диангостика беременности выполняли на 14-16 день после переноса эмбрионов путём исследования венозной крови на β-ХГЧ.

Получение донорских ооцитов.

С целью получения ооцитов у доноров выполняли стандартную программу стимуляции яичников, предусматривающую использование либо длинного протокола down-регуляции с назначением агониста ГнРГ со 2-3, или 19-21 дня менструального цикла, либо с применением короткого протокола с антагонистом ГнРГ, назначаемым после достижения лидирующим фолликулом диаметра 14 мм. Собственно саму стимуляцию фолликулогенеза осуществляли с помощью препаратов ФСГ, применяемых со 2-3 дня лечебного цикла ЭКО. Учитывая сохраненный овариальный резерв у доноров, доза гонадотропинов не превышала 150МЕ/сут.

УЗ-мониторинг роста фолликулов проводили ежедневно, начиная с 6-7 дня стимуляции суперовуляции яичников. При достижении фолликулом диаметра 17-20 мм вводили триггер овуляции (в коротком протоколе с ант-ГнРГ для этого использовали диферелин 0.1мг, а в длинном протоколе с а-ГнРГ – препараты чХГ). Через 35 часов после введения триггера овуляции выполняли трансвагинальную пункцию всех фолликулов диаметром более 15 мм. Далее полученные ооциты у донора подвергали оплодотворению методом ИКСИ либо витрифицировали.

Выделение ооцитов, их оплодотворение спермой мужа/партнёра пациентки, культивирование и криоконсервацию эмбрионов, выполняли в соответствии с существующими эмбриологическими стандартами эмбриологии.

Эмбриологический этап.

Согласно поставленным задачам, в нашей работе были использованы следующие варианты подготовки переносимых эмбрионов с учетом применения или неприменения витрификации донорских ооцитов и полученных из них эмбрионов на дотрансферном этапе (Рис. 3):

*Оплодотворение ооцитов***.**

После получения фолликулярной жидкости во время трансвагинальной пункции яичников перемещали её в чашки Петри (NUNC) и инспектировали под

бинокулярным микроскопом (NICON 1000) на предмет обнаружения ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК). ОКК собирали в чашку Петри с

с предварительно нагретой до 37^{0}□С средой Gamete buffer (COOK), содержащей HEPES (буфер, позволяющий работать с половыми клетками и эмбрионами в условиях воздушной среды).

Клетки отмывали от фолликулярной жидкости и эритроцитов в Gamete buffer методом пипетирования. Сразу после этого ОКК перемещали в чашку Петри с центральной лункой, содержащую 1 мл среды Fertilization medium (COOK), покрытую слоем жидкого парафинового масла Parafin oil (ORIGIO). Среда была предварительно эквилибрирована при температуре 37□С и концентрации CO_2 6.0% в течении не менее чем 4х часов. ОКК культивировали под маслом в течении 2-х часов при температуре 37^{0}□С и концентрации CO_2 6.0%.

Затем в центральную лунку, содержащую ОКК, добавляли 200 мкл фермента Gyaluronidase (Sage), сразу после этого интенсивно пипетируя и освобождая ооциты от клеток кумулюса. Далее ооциты переводили в 4х луночную чашку Петри (NUNC). К каждой лунке была сформирована капля в объеме 60-80 мкл среды Fertilization medium (COOK), покрытая слоем парафинового масла, так же предварительно эквилибрированная (37□С, 6.0% CO_2).

- в первую каплю помещали все ооциты;
- в следующую каплю переносили все ооциты кроме ооцитов на стадии GV;
- в каплю №3 переносили все ооциты на стадии MII;
- далее зрелые ооциты промывали в капле №3 и переносили в каплю №4, где культивировали ооциты:

- 1 час, если в дальнейшем планировали криоконсервацию;

- 2 часа, если планировали процедуру оплодотворения.

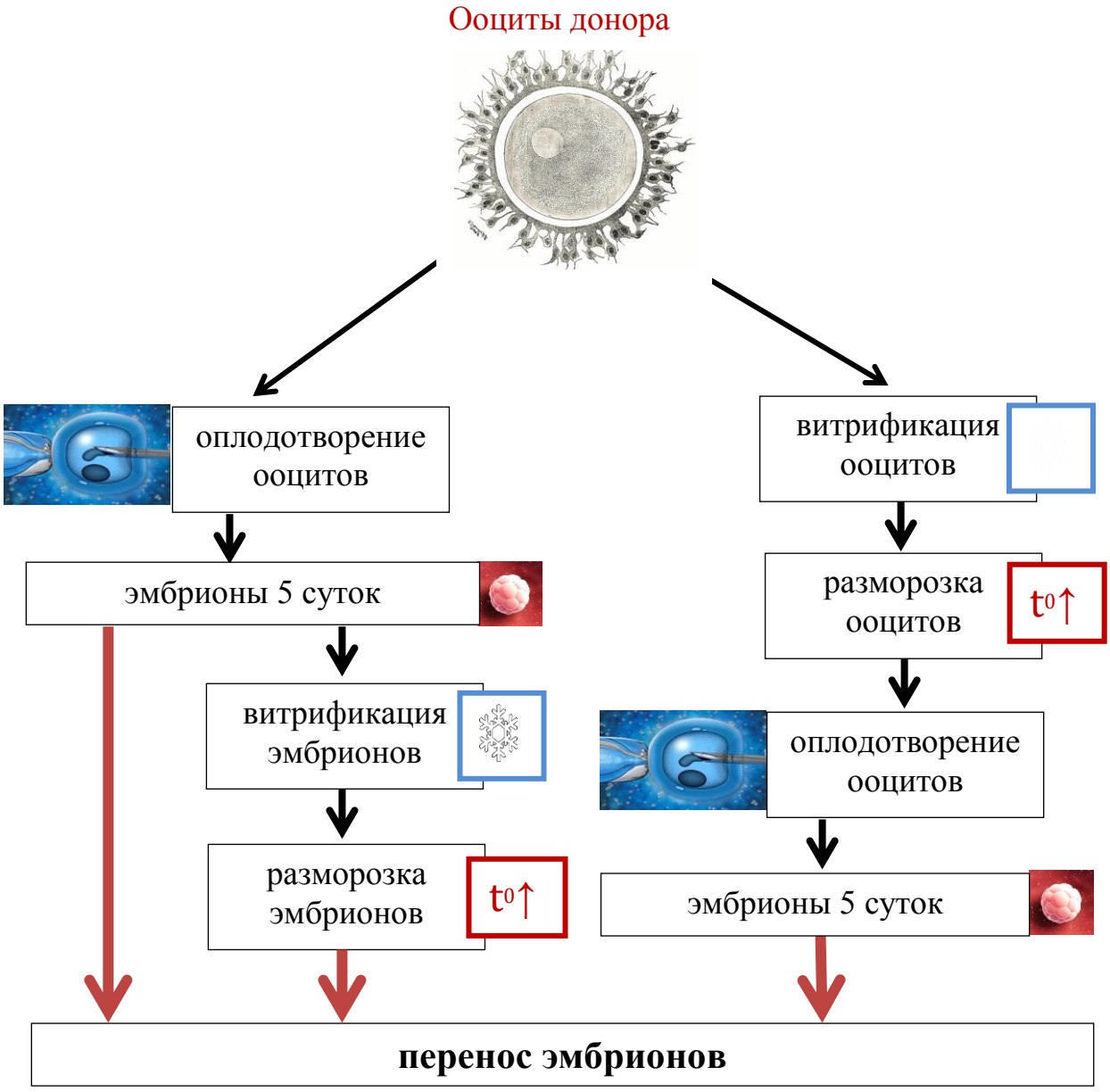

Рисунок 3

Варианты подготовки эмбрионов, используемых для переноса в программах ЭКО с ооцитами донора

При оценке зрелости ооцитов пользовались следующими параметрами:

Стадия MII - клетки corona radiata расходятся лучами от ооцита, cumulus разросшийся, но имеет клеточную структуру. Ооцит находится на стадии метафазы второго деления мейоза. Полярное тельце уже сформировано.

Оплодотворение методом ИКСИ осуществляли предварительно очищенными сперматозоидами в чашках Петри. Зрелые ооциты находились в сформированных каплях (5 мкл) с Gamete buffer (COOK), сперматозоиды – в каплях (5мкл) с PVP (поливинилпиррилидоном). Оплодотворение выполняли при помощи стеклянных инструментов фирмы ORIGIO. Для этого фиксировали удерживающей иглой ооцит так, чтобы полярное тело располагалось на 6 или 12 часов, и вводили сперматозоид стеклянной иглой в положении на 15 часов.

Культивирование эмбрионов.

Сразу после оплодотворения ооциты переводили в 4х луночные чашки (NUNC) со средой Cleavege medium, сформированой в виде капель объемом 60-80 мкл, покрытых парафиновым маслом и предварительно эквилибрированных не менее 4х часов при температуре 37^0C и 6.0% CO_2. Оплодотворение оценивали через 16-18 часов после введения сперматозоидов по наличию в ооците зрительно распознаваемых пронуклеусов. В случае правильного оплодотворения (два четко видимых пронуклеуса) зиготы переводили в свежие капли Cleavege medium (COOK). На третьи сутки культивирования эмбрионы переносили в среду Blastocyct medium (COOK), сформированной в виде капель объемом 60-80 мкл, покрытых слоем парафинового масла, в которой культивировали эмбрионы до пятых суток. Все время культивирования эмбрионы находились в инкубаторе при температуре 37^0C и 6.0% концентрации CO_2.

Для определения перспективных способностей зиготы традиционно использовали оценку по параметрам, учитывающим:

- близость пронуклеусов,
- центральное положение пронуклеусов,
- ориентацию пронуклеусов относительно полярного тельца (классификация Gianaroli 2007),
- наличие цитоплазматического гало,

- количество проядрышек,
- поляризациюю проядрышек.

В ряде случаев дополнительно оценивали:

- наличие фрагментации и вакуолей,
- форму и толщину zona pellucida (ZP).

При оценке эмбрионов на стадии дробления, учитывали следующие критерии:

- Соответствие числа бластомеров стадии развития (на 3-й день культивирования предпочтение отдается эмбрионам с количеством бластомеров не менее 6-8).
- Предпочтительны эмбрионы с четным количеством бластомеров и сферическими бластомерами равных размеров.
- Степень фрагментации цитоплазмы бластомеров:

  A - отсутствие фрагментов;

  B - количество фрагментов от 10 до 20%;

  C - количество фрагментов от 20% до 50%;

  D - количество фрагментов больше 50%.
- Отрицательными прогностическими признаками считали также наличие многоядерных бластомеров и бластомеров с фрагментированными ядрами, аномалии мембраны, наличие вакуолей, вариации толщины ZP и неполное заполнение ZP бластомерами.

Оценку бластоцист производили по классификации, разработанной D. Gardner, которая учитывает размеры бластоцисты, степень ее «вылупления» (hatching), а также выраженность внутренней клеточной массы и клеток трофэктодермы.

Перенос эмбрионов.

Подготовку к переносу эмбрионов осуществляли, используя однолуночную чашку Петри (NUNC) с предварительно эквилибрированной средой Blastocyct medium (COOK). В чашку со средой помещали эмбрионы, отобранные для

переноса, и под контролем бинокулярного микроскопа забирали их в катетер для переноса. Далее в асептических условиях операционной врачом-репродуктологом осуществлялся перенос эмбрионов под визуальным УЗ-контролем в полость матки пациентки-реципиентки.

Витрификация ооцитов и эмбрионов.

При витрификации ооцитов/эмбрионов использовали 3-х луночный планшет, входящий в фирменный набор для витрификации. В первую лунку добавляли 300 мкл среды ES и переносили в нее эмбрионы/ооциты на 12-15 мин до восстановления эмбрионом/ооцитом первоначальной формы. Для манипуляций с эмбрионами использовали капилляр диаметром 300 мкм, для манипуляций с ооцитами - капилляр диаметром 170.

Во вторую и третью лунки вносили по 300 мкл среды VS. В лунку №2 эмбрионы/ооциты переносили чистым капилляром и пипетировали в течении 30-50 секунд. Затем переносили их в лунку №3 и пипетировали до момента, когда эмбрион/ооцит не уравновешивается в среднем слое среды в лунке. Все время нахождения в VS не должно было превышать 90 сек. Эквилибрированные ооциты/эмбрионы набирали в капилляр и немедленно помещали на носитель в минимальном объеме среды, после чего немедленно опускали носитель в жидкий азот. Далее носитель закрывали и переносили на место постоянного хранения.

Для хранения криоконсервированных ооцитов/эмбрионов использовали фирменные носители Cryotech, на каждый из которых помещали 5 ооцитов или 1-2 эмбриона на стадии бластоцисты. Каждый носитель тщательно маркировали (ФИО пациентки, дата криоконсервации, количество ооцитов/эмбрионов).

Размораживание ооцитов и эмбрионов.

Для размораживания эмбрионов/ооцитов использовали фирменные наборы Cryotech. В чашку Петри с центральной лункой вносили 1 мл среды TS (температура раствора 37^0C) и носитель с эмбрионами/ооцитами помещали в транспортную емкость с жидким азотом. В азоте снимали защитный колпачок, после чего носитель с эмбрионами опускали в раствор TS. После того как

эмбрионы/ооциты были отделены от носителя их сразу забирали в капилляр и переносили в 300 мкл раствора DS комнатной температуры на 3 минуты. Затем эмбрионы/ооциты переносили на 5 минут в 300 мкл раствора WS и далее еще раз помещали в раствор WS на 1 минуту. После этого ооциты/эмбрионы переносили в предварительно эквилибрированную культуральную среду, соответствующую стадии развития эмбриона/ооцита.

Выживаемость размороженных после криоконсервации ооцитов и эмбрионов оценивалась по следующим критериям:

- Ооциты без видимых дегенеративных изменений цитоплазмы, сохранившие целостность оолеммы в течении 2х часов после размораживания, считали жизнеспособными.
- Бластоцисты, восстановившиеся в объеме (полная экспансия) в течение 2-3 часов культивирования (в культуральной среде при 370 С и 5% CO2 в атмосфере), считали жизнеспособными.

2.4. Методы статистического анализа.

Анализ данных проводили с использованием программы «Statistica-6», включающей все необходимые методы описательной и вариационной статистики.

Для оценки достоверности различий между сопоставляемыми группами по качественным признакам использовали непараметрический критерий Пирсона (χ^2-тест), рассчитываемый на основе анализа сопряженности наблюдаемых и ожидаемых чисел в таблице 2^x2. Сравнение частот выполняли с аппроксимацией нормального распределения.

Различия между сравнивавшимися группами по анализируемым признакам во всех случаях расценивали как достоверные при уровне значимости $p<0,05$.

При анализе собранного фактического материала, а также при определении показателей $ЧНБ_{ПЭ}$ и $ЧНБ_{СЦ}$ учитывали только клинически подтвержденную беременность (выявление с помощью УЗИ плодного яйца на 21-23 сутки после ПЭ). Соответственно показатель частоты ранних (в I триместре) репродуктивных

потерь рассчитывали исключительно от числа зарегистрированных клинических беременностей.

ГЛАВА 3.
КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ БОЛЬНЫХ

Возрастная характеристика включенных в исследование пациенток в группах, выделенных с учетом решавшихся в работе задач, приведена в таблице 1.

Таблица 1. Распределение включенных в исследование пациенток по возрасту (n=640)

Группы		**Возраст**	**Количество пациенток**		
			абс		**% в группе**
Группа А	А I	38-40 лет	418	336	80,4
	А II	41-43года		82	19,6
Группа В	В I	38-50 лет	222	115	51.8
	В II			56	25.2
	В III			51	22,9

Данные опроса показали, что частота пациенток с первичным и вторичным бесплодием в группе А составляла 40% и 60%, в группе В - 23% и 77% (табл.2). Как можно видеть, в обеих группах преобладало вторичное бесплодие, что представляется вполне закономерным, учитывая возраст обследованных женщин. Пациенток с первичным бесплодием было достоверно больше в группе А (40% против 23% в группе В, $p<0,001$).

При оценке состояния менструальной функции у обследованных пациенток было установлено (табл. 3), что в группе А у большинства женщин (57,1%) не наблюдалось изменений менструальной функции, тогда как в группе В на различные изменения менструального цикла за последние 2-3 года указывали более 90% пациенток. Следует отметить, что группы А и Б были сходны по частоте с пациенток с нерегулярным циклом (11,5% и 16,2%, $p=0,095$), тогда как частота случаев укорочения цикла и аменореи была достоверно ($p<0,001$) и значительно выше в группе В.

Таблица 2. Частота первичного и вторичного бесплодия у обследованных пациенток (n= 640)

Анализируемые показатели	**Группа А** (n=418)		**Группа В** (n=222)		**p**
	абс	**%**	**абс**	**%**	
Бесплодие первичное	167	40,0	51	23,0	<0,001*
Бесплодие вторичное	251	60,0	171	77,0	<0,001*

Примечание * - достоверные различия.

Таблица 3. Характеристика нарушений менструальной функции у обследованных пациенток (n=640)

Показатели			**Число пациенток**		
			Группа А	**Группа В**	**p**
Число больных			418	222	-
Отсутствие нарушений менструальной функции		Абс	239	20	-
		%	57,1	9,9	<0,001*
Нарушения менструальной функции	укорочение цикла	Абс	131	149	-
		%	31.3	67,0	<0,001*
	нерегулярный ритм менструаций	Абс	48	36	-
		%	11.5	16.2	0,095
	Аменорея II	Абс	0	17	-
		%	0	7.7	<0,001*

Примечание. * - достоверные различия.

При уточнении сопутствующей экстрагенитальной патологии (табл. 4) почти у половины пациенток Групп А и Б были обнаружены заболевания мочеполовой системы (44.2% и 43.2%) и желудочно-кишечного тракта (40,4% и 41%). Заболевания щитовидной железы (гипотиреоз, ХАИТ) имели место у 18,2% пациенток группы А и 11% пациенток группы В.

Таблица 4. Хронические сопутствующие экстрагенитальные заболевания у пациенток обеих групп (n= 640) .

Экстрагенитальные заболевания	**Группа А (n= 418)**		**Группа В (n= 222)**		**p**
	абс	**%**	**абс**	**%**	
Заболевания мочеполовой системы	185	44.2	96	43.2	0,805
Заболевания ЖКТ (хронический гастрит, ДЖВП)	169	40.4	91	41	0,891
Заболевания щитовидной железы (гипотиреоз, ХАИТ)	76	18.2	25	11.2	0,02
Заболевания сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертензия, варикозная болезнь)	58	13.8	47	21,0	0,019*
Сахарный диабет I тип	13	3.1	4	1.8	0,316
Сахарный диабет II тип	27	6.5	5	2.3	0,015*

Примечание. * - достоверные различия.

Заболевания сердечно-сосудистой системы отмечались у 13,8% пациенток группы А и у 21% пациенток группы В. В группах А и В сахарный диабет 1-го типа встречался у 3,1% и 1,8% женщин, сахарный диабет 2-го типа - у 6,5% и 2,3% женщин. Таким образом, по структуре экстрагенитальной патологии группы А и В были достаточно близки. Достоверное различие между группами А и В имело место лишь по частоте сердечно-сосудистых заболеваний (13,8% против 21%, p=0,019) и сахарного диабета 2-го типа (6,5% против 2,3%, p=0,015). Заслуживает внимания, что сочетанные экстрагенитальные патологии наблюдались примерно у 20% всех пациенток из обеих групп, т.е. у каждой пятой обследованной больной.

Необходимо также указать, что во всех случаях сопутствующая экстрагенитальная патология не была противопоказанием к беременности и родам, а также к назначению препаратов для стимуляции яичников и подготовки эндометрия в циклах ЭКО-ОД. При наличии клинических проявлений экстрагенитальных заболеваний в период проведения программы ЭКО, осуществлялась их терапия с учетом рекомендаций «профильных» специалистов.

При анализе гинекологической заболеваемости было установлено, (табл. 5), что инфекции, передаваемые половым путем (ИППП), в группах А и В перенесли в прошлом 62,7% и 50,9% женщин. В момент обследования в группах А и В эндометриоз 1-2 стадии (по УЗ-критериям) диагностировали у 19,8% и 17,5% (p=0,498), миому матки малых размеров (до 3 см в диаметре) – у 15,5% и 14,8% (p=0,818), патологию шейки матки – у 15,5% и 14,8% (p=0,818) больных. Пациенткам с патологией шейки матки до включения в протокол ЭКО или ЭКО-ОД было проведено соответствующее лечение.

Для исключения внутриматочной патологии у всех пациенток в периоде обследования проводили офисную гистероскопию и биопсию эндометрия. При этом в группе В достоверно чаще обнаруживалась гиперплазия эндометрия (21,9% против 13,2% в группе А, p=0,009), тогда как полипы эндометрия, наоборот, достоверно чаще выявляли в группе А (18,7% против 6,7% в группе В, p<0,001). Синехии в группах А и В выявляли примерно с равной частотой (4,8% и

6,3%, p=0,418). Учитывая обнаружение гиперпластических процессов эндометрия (гиперплазия, полипоз) в обязательном порядке проводилось раздельное диагностическое выскабливание шейки матки и полости с последующим гистологическим заключением.

Таблица 5. Гинекологические заболевания и ранее проведенное оперативное лечение на органах малого таза у обследованных больных (n= 640)

Гинекологические заболевания		**Группа А (n= 418)**		**Группа В (n= 222)**		**P**
		абс	**%**	**абс**	**%**	
ИППП		262	62.7	113	50.9	0,004*
Эндометриоз 1-2 стадии.		83	19.8	39	17.5	0,481
Миома матки		65	15.5	33	14.8	0,818
Патология шейки матки (лейкоплакия, эрозия).		38	9	17	7.6	0,535
Внутриматочная патология	гиперплазия эндометрия	55	13,2	47	21.1	0,009*
	полипы	78	18,7	15	6.7	<0,001*
	синехии	20	4,8	14	6.3	0,418
Оперативное лечение на органах малого таза (в прошлом)	без вмешательств на яичниках	192	45.9	64	28.8	<0,001*
	с резекцией яичников	156	37.3	108	48.6	0,006*

Примечание. * - достоверные различия

В прошлом оперативное лечение на органах малого таза без вмешательства на яичниках достоверно чаще выполняли в группе А – 45,9% против 28,8% в группе В (p<0,001). И наоборот, операции с резекцией яичников достоверно чаще проводили в группе В – 48,6% против 37,3% в группе А (p=0,006).

При анализе использованных в прошлом методов ВРТ для лечения бесплодия было установлено (табл. 6), что в группах А и В использовали процедуры искусственной инсеминации (ИИСМ) и контролируемой индукции овуляции (КИО) соответственно 25,1% и 31% женщин (p=0,03). Лечение бесплодия с применением ЭКО в прошлом было выполнено в группе А у 82% больных, в группе В - у 88.5%. При этом, пациенткам группы А в основном (в 68,4% случаев) было проведено по 1-2 попытки ЭКО, тогда как в группе В чаще (у 48,6% женщин) выполняли по 3-4 попытки ЭКО, причем у 5% больных процедура ЭКО была использована 5 и более раз.

Таблица 6. Применявшиеся ранее методы лечения бесплодия у обследованных пациенток (n= 640)

Анализируемые показатели	**Группа А** (n=418)		**Группа В** (n =222)		**p**
	абс	**%**	**абс**	**%**	
Первичное обращение	156	37.3	64	28,8	0,03*
Методы КИО/ИИСМ	105	25,1	69	31,0	0,108
1-2 попытки ЭКО	286	68.4	67	30,1	<0,001*
3-4 попытки ЭКО	52	12.4	108	48,6	<0,001*
более 4 попыток ЭКО	5	1.2	11	5.0	0,005*
Проведено ЭКО (всего)	343	82,0	186	83,8	0,582

Примечание. * - достоверные различия

ГЛАВА 4.
КЛИНИЧЕСКИЕ ИСХОДЫ ПРОГРАММ ЭКО С СОБСТВЕННЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ У ПАЦИЕНТОК СТАРШЕЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ

4.1. Сравнительная оценка ЧНБ у пациенток группы А с сохраненным и сниженным овариальным резервом.

Полученные нами результаты показали, что ЧНБ в программах стандартного ЭКО (т.е. с собственными ооцитами) зависит от возраста пациенток и прогрессивно снижается с его увеличением (табл. 7). Так у пациенток группы А II (41-43 года), в сравнении с женщинами группы А I (38-40 лет), показатель ЧНБ на СЦ оказался ниже в 2,8 раза (8,4% против 23,1%, $p<0,001$), ЧНБ на ПЭ – ниже в 2,4 раза (11,5% против 27,7%, $p<0,001$).

Таблица 7. Исходы попыток стандартного ЭКО у пациенток старшего репродуктивного возраста

Показатели	**Группа AI (38-40 лет)**	**Группа AII (41-43 лет)**	**p**
СЦ	675	274	-
ПЭ	562	200	-
Клиническая беременность	156	23	-
ЧНБ на СЦ, %	23.1	8.4	<0,001*
ЧНБ на ПЭ, %	27.7	11.5	<0,001*

Примечание. * - достоверные различия.

При анализе результатов, полученных у пациенток группы А, было также установлено, что ЧНБ зависит не только от возраста, но и от состояния овариального резерва в одной и той же возрастной группе. Так, если у женщин 38-40 лет с сохранным овариальным резервом (подгруппа AI-α) показатели $ЧНБ_{СЦ}$ и $ЧНБ_{ПЭ}$ достигали 27,7% и 33,1%, то у пациенток того же возраста со сниженным овариальным резервом (подгруппа AI-β), эти же показатели оказывались вдвое ниже – 14,7% и 17,7% (<0,001) (табл. 8).

Таблица 8. Исходы попыток ЭКО у пациенток в возрасте 38-40 лет подгруппы A I (n=336) в зависимости от состояния овариального резерва

Показатели	**Подгруппа AI-α сохраненный резерв (n=204)**	**Подгруппа AI-β сниженный резерв (n=132)**	**p**
СЦ	437	238	-
ПЭ	365	197	-
Клиническая беременность	121	35	-
ЧНБ на СЦ, %	27.7	14.7	<0,001*
ЧНБ на ПЭ, %	33.1	17.7	<0,001*

Примечание. * - достоверные различия

В группе AII, т.е. у более возрастных пациенток (41-43 года), имела место та же закономерность, проявлявшаяся в том, что у пациенток с сохранным овариальным резервом (подгруппа AII-α) показатели $ЧНБ_{СЦ}$ и $ЧНБ_{ПЭ}$ (9,7% и 14,1%) были достоверно в 1,5 раза выше, чем у женщин того же возраста со сниженным овариальным резервом, т.е. в подгруппе AII-β (6,7% и 8,5%).

Таблица 9. Исходы попыток ЭКО у пациенток в возрасте 41-43 лет подгруппы А II (n=82) в зависимости от состояния овариального резерва

Показатели	**Подгруппа AII-α сохраненный резерв (n= 52)**	**Подгруппа AII-β сниженный резерв (n=30)**	**p**
СЦ	154	120	-
ПЭ	106	94	-
Клиническая беременность	15	8	-
ЧНБ на СЦ, %	9,7	6,7	<0,001*
ЧНБ на ПЭ, %	14,1	8,5	<0,001*

Примечание. * - достоверные различия.

Сопоставление результатов, приводимых в таблицах 8 и 9, показывает, что на ЧНБ в программах стандартного ЭКО негативное влияние оказывает как увеличение возраста пациенток, так и наличие признаков снижения овариального резерва. В наибольшей степени клинические исходы ЭКО ухудшаются при сочетании этих двух факторов, т.е. у больных 41-43 лет со сниженным овариальным резервом, у которых показатели ЧНБ на ПЭ и СЦ оказываются минимальным, составляя не более 6,7% и 8,5%.

4.2. Зависимость результатов ЭКО у пациенток группы А от количества полученных ооцитов.

При сравнительной оценке эффективности проведения стандартной программы ЭКО у пациенток старшей возрастной группы была изучена зависимость результатов от количества полученных ооцитов. Данное исследование проводили отдельно в группах AI (пациентки в возрасте 38-40 лет)

и AII (женщины 41-43 лет). При этом в той и другой группе выделяли подгруппы пациенток с разным количеством получаемых ооцитов:

- подгруппа **a** - до 4-х;
- подгруппа **b** - от 5 до 8,
- подгруппа **c** - от 9 до 17.
-подгруппа **d** - от 18 и более.

Результаты использования ЭКО в Группе AI по показателям ЧНБ на СЦ и ПЭ составили (табл. 10):

- в подгруппе **a** – 13,9% и 19,3%;
- в подгруппе **b** - 21,3% и 24,6%;
- - в подгруппе **c** – 32,8% и 35,2%;
- в подгруппе **d** – 31,1% и 38,8%

Из представленных данных видно, что у пациенток с бедным ответом (подгруппа **a**) зарегистрированные показатели ЧНБ на СЦ и ПЭ оказались в 2-2,5 раза ниже, чем у женщин в подгруппах **b**, **c** и **d**, т.е. у пациенток с более активным ответом яичников на стимуляцию суперовуляции. Обнаруженная закономерность указывает на наличие прямой зависимости результатов ЭКО с собственным генетическим материалом от количества полученных ооцитов.

Различия по частоте биохимической беременности (от числа СЦ) между сопоставлявшимися подгруппами были недостоверными, хотя можно было отметить ее несколько более частую встречаемость в подгруппах **b** (5,6%) и **c** (3,2%) в сравнении с подгруппами **a** (2,9%) и **d** (1,6%).

При переносе двух эмбрионов хорошего качества частота многоплодия в сопоставлявшихся группах достоверно не различалась. Показатель многоплодия колебался в пределах от, минимум, 13% (в подгруппе **b**) до, максимум, 21% (в подгруппе **d**) от числа подтвержденных клинических беременностей.

Ранние (в I триместре беременности) репродуктивные потери в группе A I составили:

Таблица 10. Зависимость результатов анализируемых показателей от количества полученных ооцитов в цикле ЭКО у пациенток в возрасте 38-40 лет подгруппы AI.

Показатели		**Сравниваемые подгруппы, выделенные в группе AI с учетом количества полученных ооцитов**			
		Подгруппа a	***Подгруппа b***	***Подгруппа c***	***Подгруппа d***
Получено ооцитов		До 4-х	От 5 до 8	От 9 до 17	От 18 и ≥
СЦ		209	216	189	61
ПЭ		150	187	176	49
Беременность клиническая		29	46	62	19
ЧНБ на СЦ	%	13,9	21,3	32,8	31,1
	p	-	0,044*	<0,001*	0,003*
ЧНБ на ПЭ	%	19,3	24,6	35,2	38,8
	p	-	0,247	<0,001*	0,007*
Биохим. бер-сть	абс	6	12	6	1
	% от СЦ	2,9	5,6	3,2	1,6
	p	-	0,166	0,860	0,580
Многопл. бер-сть	абс	5	6	13	3
	% от клинич. беременностей	17,2	13,0	21,0	15,8
	p	-	0,619	0,675	0,895
Репрод. потери в I триместре	абс	1	6	12	4
	% от клинич. беременностей	3,4	13,0	19,4	21,0
	p	-	0,143	0,027*	0,05*

Примечание. * - достоверное отличие от значения в подгруппе *a*.

- в подгруппе **a** – 3,4%;

- в подгруппе **b** - 13,0%;

- в подгруппе **c** – 19,4%;

- в подгруппе **d** – 21%

Из этого наблюдения следует, что более активный ответ яичников на стимуляцию в последующем ассоциируется с возрастанием риска ранних репродуктивных потерь. Это особенно заметно у женщин с гиперергическим ответом (подгруппа **d**), у которых частота прерывания индуцированной беременности на ее ранних сроках оказалась наибольшей (21% от числа исходно зарегистрированных клинических беременностей).

Результаты, полученные у пациенток группы AII так же показали, что частота наступления беременности на стимулированный цикл и на перенос эмбрионов зависит от количества полученных ооцитов. Необходимо отметить, что у пациенток группы AII ни разу не было получено более 17 ооцитов в стимулированном цикле ЭКО. Поэтому разделение группы AII на подгруппы с учетом числа полученных ооцитов ограничилось выделением только трех подгрупп: **a** (до 4), **b** (от 5 до 8) и **c** (от 9 до 17).

Результаты использования ЭКО в группе AII (женщины 41-43 лет) по показателям ЧНБ на СЦ и ПЭ составили (табл. 11):

- в подгруппе **a** – 3,6% и 5,3%;

- в подгруппе **b** - 9,6,3% и 11,5%;

- в подгруппе **c** – 13,5% и 18,8%.

Представленные данные указывают на тенденцию возрастания показателей $ЧНБ_{СЦ}$ и $ЧНБ_{ПЭ}$ в зависимости от увеличения получаемых ооцитов и у пациенток в возрасте 4-43 лет. Однако в группе AII, в сравнении с группой AI (женщины 38-40 лет), эта тенденция проявляла себя на фоне значительно меньших абсолютных значений ЧНБ на СЦ и ПЭ.

Таблица 11. Зависимость результатов анализируемых показателей от количества полученных ооцитов в цикле ЭКО у пациенток в возрасте 41-43 лет в подгруппе А II (n=82)

Показатели		**Сравниваемые подгруппы, выделенные в группе AII с учетом количества полученных ооцитов**		
		Подгруппа a	***Подгруппа b***	***Подгруппа c***
Получено ооцитов		до 4-х	от 5 до 8	от 9 до 17
СЦ		112	73	89
ПЭ		75	61	64
Беременность клиническая		4	7	12
ЧНБ на СЦ	%	3,6	9,6	13,5
	p	-	0,094	0,009*
ЧНБ на ПЭ	%	5,3	11,5	18,8
	p	-	0,501	0,029*
Биохимическая беременность	абс	3	4	6
	% от СЦ	2,3	5,5	6,7
	p	-	0,334	0,057
Многоплодная беременность	абс	0	1	1
	% от клинических беременностей	0	14,3	8,3
	p	-	0,310	0,421
Репродуктивные потери (в I триместре)	абс	1	2	1
	% от клинических беременностей	25,0	28,6	8,3
	p	-	0,898	0,403

Примечание. * - достоверное отличие от значения в подгруппе *a*.

Так же необходимо указать, что в группе AII у женщин с любым количеством выделенных ооцитов показатели $ЧНБ_{СЦ}$ и $ЧНБ_{ПЭ}$ были заметно хуже, чем у пациенток группы AI с таким же количеством полученных

яйцеклеток, Так, например, в группе AII у пациенток с бедным ответом $ЧНБ_{СЦ}$ составила всего лишь 3,6% и 5,3%, что было 4-5 раз меньше, чем у пациенток с бедным ответом в группе AII (13,9% и 19,3%). Это наблюдение ещё раз подчеркивает негативное влияние возрастного фактора на терапевтическую эффективность программы ЭКО с собственным генетическим материалом при любом количестве получаемых ооцитов.

В группе AII, также как и в группе AI, показатели биохимической и многоплодной беременности между подгруппами пациенток с разным количеством полученных ооцитов достоверно не различались. При этом в абсолютных цифрах частота биохимической беременности и многоплодия оказалась наименьшей у пациенток с бедным ответом. Этот факт, однако, не имеет сколько-нибудь заметной позитивной значимости, поскольку у пациенток с бедным ответом отмечаются наихудшие результаты ЭКО по самым важным терапевтическим показателям, к которым относят частоту наступления беременности на СЦ и ПЭ.

Проведенный в группе AII анализ показателей частоты репродуктивных потерь в I триместре показал, что они были сходными в подгруппах **a** (25%) и **b** (28,6%). В подгруппе **c** указанный показатель оказался наименьшим, составив 8,8%. Эти данные, однако, не позволяют делать каких-либо статистически подтверждаемых заключений из-за слишком малого числа зарегистрированных клинических беременностей в подгруппах **a**, **b** и **c**.

В рамках описанного в данном разделе исследования мы также прицельно определили долю СЦ, сопровождавшихся бедным ответом, среди всех выполненных СЦ в группах AI и AII (табл. 12). При этом было установлено, что в группе AII частота бедного ответа была на 10% выше, чем в группе AI (40,8% против 31,1%, p=0,004).

Таблица 12. Частота бедного ответа при выполнении стандартного ЭКО в группах AI и AII

Показатели		**Группа AI**	**Группа AII**
Число выполненных СЦ (абс)		675	274
СЦ, в которых был зарегистрирован бедный ответ	абс	209	112
	% от всех выполненных СЦ	31,1	40,8
p		0,004*	

Примечание. * - достоверное отличие между сравниваемыми частотами бедного ответа в группах AI и AII.

Таким образом, проведенный анализ полученных данных показал, что при выполнении ЭКО с собственным генетическим материалом его клиническая эффективность возрастает при увеличении числа получаемых ооцитов. Эта закономерность, однако, становится менее выраженной при увеличении возраста пациенток с 38-40 до 41-43 лет. Для более возрастных пациенток, в сравнении с молодыми женщинами, является характерным снижение показателей эффективности ЭКО при одном и том же числе выделенных ооцитов. При этом ситуация усугубляется тем, что при увеличении возраста пациенток достоверно увеличивается и частота бедного ответа, который сам по себе ухудшает клинические исходы ЭКО даже у более молодых женщин.

4.3. Структура отмены переносов у пациенток старшей возрастной группы.

При анализе частоты отмен СЦ на дотрансферном этапе в сравнивавшихся группах AI и AII было установлено, что если у лиц 38-40 лет частота этого осложнения составляла 14,7%, то у пациенток 41-43 лет почти треть всех СЦ

(27%) была прервана из-за невозможности выполнения ПЭ. Резкое возрастание частоты отмен СЦ у пациенток наиболее старшей возрастной группы объясняет крайне низкую эффективность программы ЭКО с собственными ооцитами у данного контингента больных.

В нашей работе для возможности селекции эмбрионов для ПЭ у пациенток старшей возрастной группы проводили культивирование всех полученных эмбрионов до стадии бластоцисты. Перенос эмбрионов отменяли из-за неудовлетворительных морфологических качеств эмбрионов (дегенеративные изменения, остановка развития) или при необходимости криоконсервации эмбрионов. Криоконсервация эмбрионов требовалась:

- в случаях ухудшения самочувствия пациентки;

- для профилактики синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) у лиц с гиперергическим ответом яичников;

- для проведения предимплантационного генетического скрининга (ПГС) с целью исключения генетических мутаций или хромосомных патологии в генерированных эмбрионах у пациенток с высокой вероятностью такого рода нарушений.

Таблица 13. Структура отмен ПЭ у пациенток позднего репродуктивного возраста.

Показатели		**Группа AI** (38-40 лет)	**Группа AII** (41-43 года)
СЦ		675	274
Отмена ПЭ	абс	99	74
	% от СЦ	14.7	27,0
	p	<0,001*	

Примечание. * - достоверное отличие между сравниваемыми частотами отмен ПЭ в группах AI и AII.

Полученные данные в группе AI показали (табл. 14), что частота отмен ПЭ у пациенток подгруппы **a** с бедным ответом (21,5%) была достоверно выше, чем в подгруппах **b** (13,4%) и **c** (6,9%), т.е. у женщин с адекватным ответом. Однако частота отмен ПЭ между подгруппами **a** (21,5%) и **d** (19,7%) достоверно не различалась, что указывает на то, что гиперергический ответ, так же как и бедный, провоцирует существенное возрастание частоты отмен ПЭ.

Таблица 14. Структура отмен ПЭ в зависимости от количества полученных ооцитов в группе A I (n=336)

Показатели		**Сравниваемые подгруппы, выделенные в группе AI с учетом количества полученных ооцитов**			
		Подгруппа a	**Подгруппа b**	**Подгруппа c**	**Подгруппа d**
Получено ооцитов		До 4-х	От 5 до 8	От 9 до 17	От 18 и ≥
СЦ		209	216	189	61
Всего отмен ПЭ	абс	45	29	13	12
	%	21,5	13,4	6,9	19,7
	p	-	0,027*	<0,001*	0,753
% отмен ПЭ по морфологическим критериям	абс	37	21	6	1
	% от всех отмен ПЭ	82,2	72,4	46,1	8,3
	p	-	0,320	0,011*	<0,001*
% отмен ПЭ с целью криоконсервации	абс	8	8	7	11
	% от всех отмен ПЭ	17,8	27,6	53,9	91,7
	p	-	0,320	0,011*	<0,001*

Примечание. * - достоверное отличие от значения в подгруппе **a.**

Анализ доли отмен ПЭ из-за дефектов развития эмбрионов показал (рис. 4), что по этому показателю наихудшие результаты имели место в подгруппе **a** (82,2%). Интересно отметить, что в подгруппе **d**, в которой также отмечался достаточно высокий % прерывания лечебных циклов, доля отмен ПЭ из-за дефектов развития эмбрионов оказалась наименьшей (8,3%).

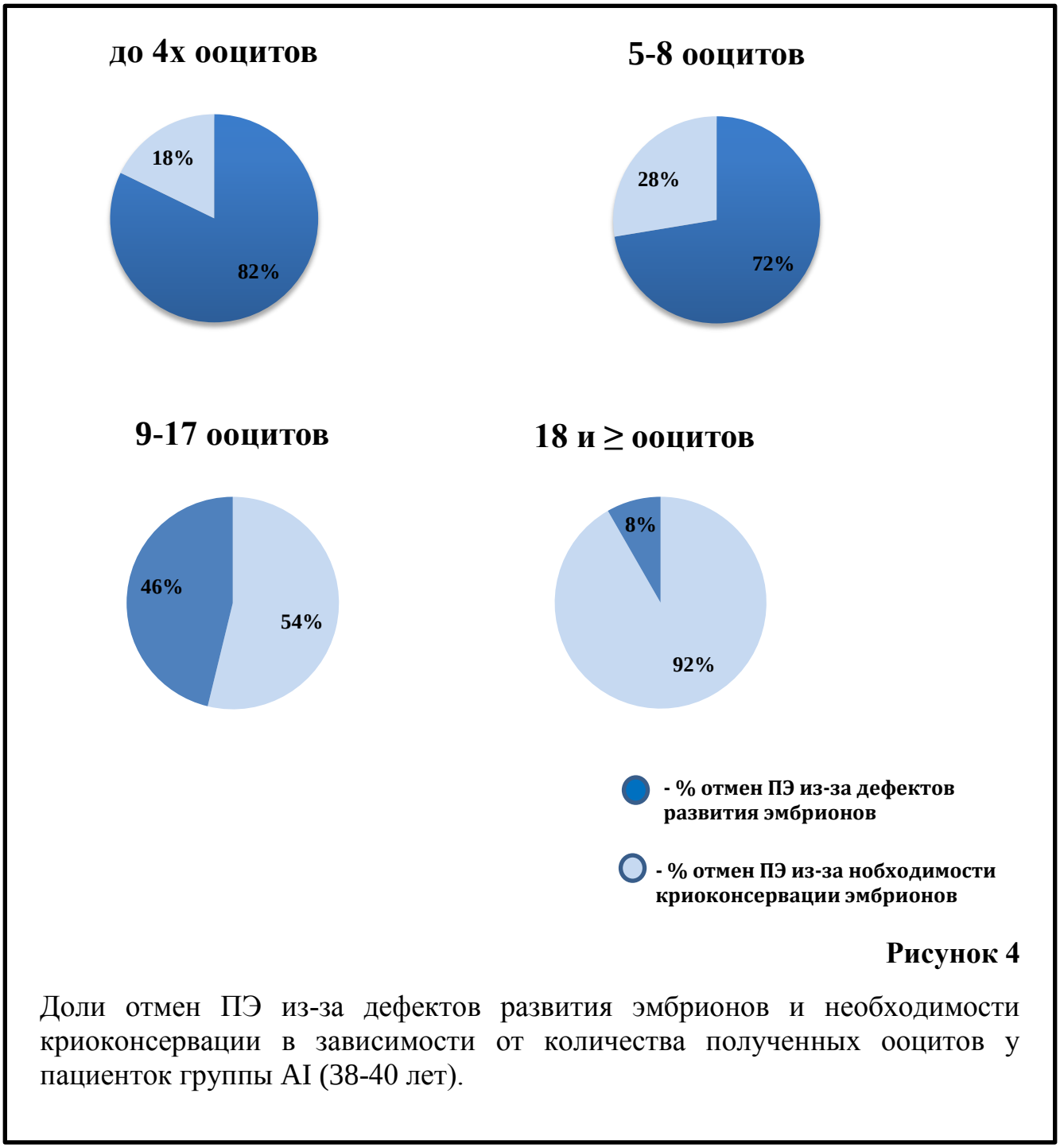

Рисунок 4

Доли отмен ПЭ из-за дефектов развития эмбрионов и необходимости криоконсервации в зависимости от количества полученных ооцитов у пациенток группы AI (38-40 лет).

Это наблюдение указывает на то, что при гиперергическом ответе яичников отмена ПЭ в основном ассоциируется не с дефектами развития эмбрионов (как это имеет место у лиц с бедным ответом), а с необходимостью криоконсервации эмбрионов (как правило, из-за угрозы СГЯ).

При проведении аналогичного исследования в группе AII были отмечены те же закономерности (табл. 15). То есть именно у лиц с бедным ответом имела место наибольшая частота прерывания циклов на доотрансферном этапе (33% против 16,4% и 28% в подгруппах **b** и **c)**.

Таблица 15. Структура отмен ПЭ в зависимости от количества полученных ооцитов в группе AII (n=82)

Показатели		**Сравниваемые подгруппы, выделенные в группе AII с учетом количества полученных ооцитов**		
		Подгруппа a	**Подгруппа b**	**Подгруппа c**
Получено ооцитов		До 4-х	От 5 до 8	От 9 до 17
СЦ		112	73	89
Всего отмен ПЭ	абс	37	12	25
	%	33,0	16,4	28,0
	p	-	0,011*	0,450
% отмен ПЭ по морфологическим критериям	абс	31	7	12
	% от всех отмен ПЭ	83,8	58,3	48,0
	P	-	0,075	0,003*
% отмен ПЭ с целью криоконсервации	Абс	6	5	13
	% от всех отмен ПЭ	16,2	41,7	52,0
	P	-	0,075	0,003*

Примечание. * - достоверное отличие от значения в подгруппе **a.**

При этом в группе AII в структуре отмен ПЭ (рис. 5) у пациенток с бедным ответом доля прерываний лечебных циклов из-за дефектов развития эмбрионов (83,8%) оказалась в 1,5 раза более высокой, чем в подгруппах **b** (58,3%) и **c** (48%).

Рисунок 5

Доли отмен ПЭ из-за дефектов развития эмбрионов и необходимости криоконсервации в зависимости от количества полученных ооцитов у пациенток группы AII (41-43 года).

Суммируя результаты, полученные при анализе причин прерывания лечебных циклов ЭКО с собственными ооцитами на дотрансферном этапе у пациенток позднего репродуктивного возраста, следует указать на явную зависимость риска отмена ПЭ от количества полученных эмбрионов. Процент отмены ПЭ у больных с бедным ответом оказался значительно выше, чем у пациенток с адекватной реакцией яичников на их стимуляцию. Причем отказываться от ПЭ у женщин с бедным ответом приходилось в основном из-за неудовлетворительных морфологических характеристик полученных эмбрионов или отсутствия их развития. При адекватной и гиперергической реакции яичников на гонадотропины отказываться от ПЭ чаще приходилось из-за необходимости криоконсервации полученных эмбрионов, что в основном было связано либо с угрозой СГЯ, либо с необходимостью проведения генетического скрининга.

4.4. Структура репродуктивных потерь при выполнении ЭКО у пациенток старшего возраста с разным состоянием овариального резерва.

При изучении зависимости частоты ранних (в I триместре) репродуктивных потерь в программах стандартного ЭКО от состояния овариального резерва у больных старшего репродуктивного возраста было установлено следующее (табл. 16):

У пациенток со сниженным овариальным резервом в сравнении женщинами без такого нарушения частота ранних репродуктивных потерь была вдвое более высокой среди женщин 38-40 лет (22,8% против 12,4%), так и 41-43 лет (25% против 13,3%). Для группы AI эта закономерность носила достоверный характер (p=0,001), тогда как в группе AII выявленное различие не подтверждалось статистически (p=0,488), что очевидно было связано со слишком малым числом индуцированных беременностей в группе AII. Тем не менее, все же следует подчеркнуть о наличии явной тенденции к росту ранних репродуктивных потерь у пациенток с признаками редукции овариального резерва и в группе AII.

Таблица 16. Структура репродуктивных потерь у пациенток старшего репродуктивного возраста с индуцированной в результате ЭКО беременностью в группах AI и AII

Анализируемые показатели		**Группа А I** (38-40 лет)		**Группа А II** (41-43 года)	
		AI-α сохранный овариальный резерв	**AI-β сниженный овариальный резерв**	**AII-α сохранный овариальный резерв**	**AII-β сниженный овариальный резерв**
Беременность клиническая		121	35	15	8
Репродуктивные потери (всего)	абс	15	8	2	2
	%	12.4	22.8	13.3	25,0
	p	0,001*		0,488	
Репродуктивные потери (1 триместр)	Анэмбриония	3	2	0	1
	Неразвивающаяся беременность	11	5	2	1
	Самопроизвольный выкидыш	1	1	0	0

Примечание. * - достоверное отличие между подгруппами α и β.

Полученные данные указывают на то, что редукция овариального резерва у женщин старшего репродуктивного возраста является очевидным фактором риска для возрастания частоты ранних репродуктивных потерь индуцированной беременности в программах ЭКО с собственными ооцитами. Наиболее распространенной причиной гестационных потерь в I триместре является неразвивающаяся беременность, что вероятно связано с неудовлетворительным качеством эмбрионов, которые, как правило, используются для переноса без предварительной генетической диагностики на предмет выявления возможных хромосомных дефектов.

4.5. Заключение.

Представленные в данной главе результаты показывают, что частота наступления беременности в программах ЭКО с собственным генетическим материалом у пациенток старшего репродуктивного возраста прогрессивно снижается. Причем клинические исходы ЭКО по показателям ЧНБ на СЦ и ПЭ ухудшаются не только из-за увеличения возраста пациенток. Следует подчеркнуть, что эффективность ЭКО у пациенток одних и тех же возрастных групп оказывается достоверно более низкой при исходном наличии признаков редукции овариального резерва и ослабленной реакции яичников на гонадотропины, проявляемой в виде бедного ответа.

Приходится констатировать, что среди больных старшего репродуктивного возраста увеличивается доля пациенток, как с признаками редукции ОВР, так и с подтверждаемым бедным ответом в проводимых СЦ. То есть у больных старше 38 лет проявляют себя сразу три фактора, препятствующие реализации терапевтического потенциала стандартного ЭКО – собственно сам возрастной фактор (снижающий качество женских гамет и получаемых из них эмбрионов), редукция ОВР и развивающийся при стимуляции яичников бедный ответ

Кроме того, ухудшение терапевтических исходов ЭКО у пациенток старшего репродуктивного возраста происходит и из-за потерь индуцированной беременности, причем опасность этого осложнения у женщин с исходно сниженным ОВР оказывается вдвое выше, чем у пациенток с нормальным состоянием ОВР. С учетом того, что увеличение возраста (после 35 лет) ассоциируется с прогрессирующим снижением ОВР, приходится констатировать, что женщины позднего репродуктивного возраста при выполнении у них программы ЭКО с собственными ооцитами не только имеют низкие шансы для успешного зачатия. У таких пациенток также снижается и вероятность успешного вынашивания индуцированной беременности.

Очевидно, что наблюдаемая на практике (и наглядно подтвержденная в нашем исследовании) низкая терапевтическая эффективность программ ЭКО с собственным генетическим материалом у женщин старшего репродуктивного

возраста ставит вопрос о необходимости более широкого использования у них программ ЭКО с донорскими ооцитами.

ГЛАВА 5.
КЛИНИЧЕСКИЕ ИСХОДЫ ПРОГРАММ ЭКО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ООЦИТОВ ДОНОРА У ПАЦИЕНТОК СТАРШЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

5.1. Зависимость клинических исходов программ ЭКО-ОД от особенностей получения переносимых эмбрионов.

При оценке терапевтической эффективности программ ЭКО с ооцитами донора (ЭКО-ОД), выполнявшейся у 222 пациенток, эти больные были распределены в 3 группы с учетом особенностей получения переносимых эмбрионов:

- Группа BI (n=115) - программа ЭКО-ОД с использованием нативных донорских ооцитов и последующим переносом свежих эмбрионов;
- Группа BII (n=56) - программа ЭКО-ОД с переносом размороженных крио-эмбрионов, полученных из свежих ооцитов донора;
- Группа BIII (n=51) – программа ЭКО-ОД с использованием витрифицированных (криоконсервированных) донорских ооцитов. После разморозки и оплодотворения ооцитов осуществлялось культивирование генерированных эмбрионов до стадии бластоцисты и их последующий перенос.

Пациентки группы BI были синхронизированы с донором. В день ТВП полученные ооциты донора оплодотворялись спермой мужа/партнёра пациентки и через 5 дней осуществлялся перенос эмбрионов (стадия бластоцисты) в полость матки пациентки.

Пациентки группы BII не проходили этап синхронизации с донором, а в день ТВП донора полученные зрелые ооциты оплодотворялись спермой мужа/партнёра пациентки. Через 5 дней выполняли криоконсервацию эмбрионов (на стадии бластоцисты). В отсроченном порядке пациенткам из группы BII проводили подготовку эндометрия препаратами эстрогенов для переноса эмбрионов в полость матки после размораживания эмбрионов.

У пациенток группы BIII использовали изначально витрифицированные (криоконсервированные) донорские ооциты. Этим женщинам проводили подготовку эндометрия к переносу эмбрионов препаратами эстрогенов. При достижении эндометрием нормальной толщины (8-12 мм) размораживали донорские ооциты, выполняли их оплодотворение спермой мужа/партнёра, культивировали эмбрионы до стадии бластоцисты и выполняли их перенос в полость матки.

Для оценки эффективности использования ооцитов донора в программах ЭКО-ОД были использовань следующие показатели:

- количество пригодных для переноса эмбрионов на 5 сутки культивирования;
- частота наступления беременности на перенос эмбрионов;
- частота многоплодной беременности;
- ранние репродуктивные потери (в I триместре);
- частота отмены переносов;
- выживаемость ооцитов после размораживания и их способность к оплодотворению - только в группе BIII;
- частота генерации бластоцист из порций витрифицированных и нативных ооцитов.

В результате использования программ ЭКО-ОД частота наступления беременности на ПЭ составила в группах BI, BII и BIII соответственно 47%, 35,5% и 34,1% (табл. 17). Эти данные указывают на то, что наилучшие результаты в программах ЭКО-ОД наблюдаются при использовании нативных донорских ооцитов и переносе получаемых из них свежих эмбрионов. Тем не менее, все же нужно отметить, что выявленные различия между сопоставлявшимися группами по показателю ЧНБ на ПЭ не были статистически значимыми, что можно рассматривать только как тенденцию, а не как безусловную закономерность к улучшению результатов лечения в группе BI.

Таблица 17. Результаты программы ЭКО-ОД с использованием 1 порции (5-6 шт.) ооцитов донора.

Показатели		**Группа В I**	**Группа В II**	**Группа В III**
ПЭ		115	56	51
Беременность клиническая		54	20	16
ЧНБ на ПЭ	%	47,0	35,7	31,4
	p	-	0,162	0,059
Многоплодная беременность	абс	13	1	9
	% от клинических беременностей	24,0	5,0	56,2
	p	-	0,043*	0,017*
Репродуктивные потери (I триместр)	абс	6	2	1
	% от клинических беременностей	11,1	10,0	6,2
	p	-	0,891	0,555
Отмена ПЭ по морфологическим причинам	абс	0	3	6
	% от ПЭ	0	5,3	11,8
	p	-	0,007*	<0,001*

Примечание. * - достоверное отличие от значения в группе В I.

Частота многоплодной беременности в группах BI, BII и BIII составила соответственно 24%, 5% и 56%. Высокая встречаемость многоплодия в группе BIII, в которой одновременно наблюдали наименьшую общую частоту клинических беременностей, свидетельствует о колебаниях качества витрифицированных ооцитов в разных порциях. Видимо пациентки группы BIII, у которых были использованы более качественные витрифицированные ооциты, имели большую вероятность как для наступления беременности вообще, так и для многоплодия. Однако поскольку таких пациенток в группе BIII было немного, у

большинства пациенток этой группы беременность не наступила. Это собственно и объясняет наибольший % многоплодия на фоне наименьшего показателя ЧНБ на ПЭ в группе BIII.

Частота ранних репродуктивных потерь в сравнивавшихся группах была сопоставима и колебалась от, минимум, 6,2% (группа BIII) до, максимум, 11,1% (группа BI). Из этого наблюдения следует, что вероятность раннего прерывания беременности, полученной в результате применения ЭКО-ОД, фактически не зависит от вариантов получения эмбрионов, используемых для переноса.

Характеризую частоту отмен ПЭ по морфологическим причинам в сравнивавшихся группах пациенток старшего репродуктивного возраста следует подчеркнуть, что в группе BI этот показатель оказался равным нулю. В группах BII и BIII частота отмен ПЭ из-за морфологических дефектов эмбрионов составляла соответственно 5,3 и 11,8%. Из полученных данных следует, что по критерию частоты отмен ПЭ наихудшие результаты наблюдаются при использовании ЭКО-ОД с витрифицированными донорскими ооцитами, а наилучшие – со свежими эмбрионами, полученными из нативных донорских ооцитов.

5.2. Зависимость клинических исходов программ ЭКО-ОД от количества переносимых эмбрионов.

Учитывая наблюдавшийся нами высокий показатель многоплодной беременности среди пациенток группы BIII, в которой использовались подвергнутые витрификации донорские ооциты, мы проанализировали исходы программы ЭКО-ОД в зависимости от количества переносимых эмбрионов, полученных из витрифицировпнных ооцитов. При этом было установлено (табл. 19), что перенос одного, двух и трех эмбрионов сопровождался возникновением беременности в соответственно 10,5%, 47,8% и 100% циклах с выполненным ПЭ. Частота многоплодия при этом составила соответственно 0%, 54,5% и 100%.

Таблица 18. Результаты программы ЭКО-ОД с использованием эмбрионов, полученных из витрифицированных ооцитов донора (группа BIII).

Анализируемые показатели		**Перенос 1 эмбриона**	**Перенос 2 эмбрионов**	**Перенос 3 эмбрионов**
ПЭ		19	23	3
Беременность клиническая		2	11	3
ЧНБ на ПЭ	%	10.5	47.8	100
	P	-	0,007*	<0,001*
Многоплодная беременность	абс.	0	6	3
	% от клин. бер-тей	0	54,5	100
	P	-	<0,001*	<0,001*
Ранние репродуктивные потери (I триместр)	абс.	0	1	0
	% от клин. бер-тей	0	9%	0
	P	-	-	-

Примечание. * - достоверное отличие от значения в группе с переносом 1 эмбриона

Полученные результаты приводят к заключению о том, что при использовании витрифицированных ооцитов в программе ЭКО-ОД перенос единственного эмбриона сопровождается очень низким показателем клинически подтвержденной беременности, что указывает на нецелесообразность переноса 1 эмбриона пациенткам старшей возрастной группы. Использование для ПЭ двух и, в особенности, трёх эмбрионов, резко увеличивает вероятность наступления беременности, что свидетельствует о высокой эффективности программы ЭКО-ОД с витрифицированными ооцитами при условии увеличения числа

переносимых эмбрионов. При этом, однако, драматически возрастает и показатель частоты многоплодия, о чем следует предупреждать пациентку.

5.3. Характеристика эмбриологического этапа при выполнении программ ЭКО-ОД с использованием витрифицированных и нативных ооцитов.

Оценка влияния витрификации ооцитов на их выживаемость и способность к оплодотворению

В нашей работе в группе BIII при выполнении программы ЭКО-ОД в 51 цикле было использовано 286 донорских ооцитов, подвергнутых предварительной витрификации. При изучении влияния на витрифицированные ооциты криотравмы было установлено (табл. 19), что их выживаемость после размораживания достигала 92,3%. Эти данные свидетельствуют о том, что подавляющее большинство подвергаемых криотравме ооцитов при использовании современных технологий витрификации вполне успешно сохраняют свой жизненный потенциал.

Тем не менее, приходится констатировать, что криотравма все же часто негативно влияет на функциональные способности замораживаемых яйцеклеток. Об этом свидетельствует тот факт, что отмеченная нами частота оплодотворения размороженных ооцитов (подтверждаемая по числу образуемых зигот) составила только 67.2% от числа всех витрифицированных женских гамет или 72,7% от числа размороженных ооцитов с подтвержденной жизнеспособностью. Полученные данные показывают, что при использовании в программах ЭКО-ОД витрифицированных ооцитов с учетом их потерь в результате криотравмы и, в особенности, из-за безуспешности оплодотворения, только 2/3 из них обеспечивают формирование зиготы.

Таблица 19. Выживаемость и оплодотворяемость ооцитов, подвергнутых витрификации

Анализируемые показатели		**Результаты**
Число циклов ЭКО-ОД с размораживанием витрифицированных ооцитов		51
Количество ооцитов, подвергнутых витрификации		286
Количество витрифицированных ооцитов, сохранивших жизнеспособность после размораживания		264
Выживаемость витрифицированных ооцитов после размораживания		92,3%
Потери ооцитов в связи с криотравмой		7,7%
Оплодотворение размороженных Ооцитов	абсолютное число	192
	% от количества витрифицированных ооцитов	67,2
	% от количества выживших витрифирированных ооциов после размораживания	72,7

Оценка эффективности генерации бластоцист из эмбрионов, полученных из нативных и предварительно витрфицированных ооцитов

При оценке частоты формирования бластоцист из оплодотворяемых зрелых (стадия MII) ооцитов было установлено, что в группах BI, BII и BIII этот показатель составил соответственно 30,5%, 35% и 25,8% (табл. 20).

Таблица 20. Частота формирования бластоцист (эмбрионов на 5 сутки развития) из оплодотворенных нативных и ранее витрифицированных ооцитов

Показатели		**Группа В I** (n=115) нативные ооциты	**Группа В II** (n=56) нативные ооциты	**Группа В III** (n=51) витрифицированные ооциты
Количество выделенных ооцитов в фазе MII		712	334	286
Количество полученных бластоцист	абс.	217	117	74
	% от числа ооцитов MII	30,5	35,0	25,8
	p	-	0,142	0,146
Доля порций ооцитов, в которых удалось получить более 3 бластоцист		20%	18%	4%*
Среднее количество бластоцист, генерированных в 1 порции ооцитов		2,8 ± 0,4	2,9 ± 0,5	1,8 ± 0,5*

Примечание. * - достоверное ($p<0,05$) отличие от значения в Группе **В I.**

Бластоцисты мы получали из ооцитов, входящих в порции из 5-6 яйцеклеток. Доля порций ооцитов, в которых удавалось воспроизвести более 3 бластоцист, была равна в группах BI, BII и BIII соответственно 20%, 18% и 4%. Среднее количество бластоцист, генерируемых из 1 порции ооцитов составляло в Группах BI, BII и BIII соответственно 2,8 ± 0,4, 2,9 ± 0,5 и 1,8 ± 0,5.

Эти данные показывают, при выполнении любого из вариантов ЭКО-ОД, применявшихся в нашей работе, из одной порции в 5-6 нативных ооцитов возможно получение двух и более эмбрионов хорошего качества, достигающих стадии бластоцисты. Получение же более трех эмбрионов хорошего качества на 5-е сутки культивирования, позволяет дополнительно криоконсервировать «лишние» бластоцисты для последующего использования в повторной попытке

ЭКО. Учитывая старший репродуктивный возраст пациенток, возможность сохранения дополнительных эмбрионов на стадии бластоцисты позволяет значительно сократить материальные затраты и период повторного подбора донора.

Приходится, однако, констатировать, что возможность получения «лишних» бластоцист для их последующих переносов оказывается заметно меньшей при использовании витрифицированных донорских ооцитов в сравнении с нативными. Очевидно, что это является еще одним недостатком при использовании в программах ЭКО-ОД витрифицированных донорских ооцитов вместо нативных.

5.4. Заключение.

Приводимый в данной главе материал наглядно демонстрирует, что применение витрифицированных вместо нативных ооцитов в программах ЭКО-ОД сопровождается снижением эффективности лечения бесплодия, оцениваемого по критерию ЧНБ, т.е. по самому важному показателю, используемому в репродуктологии при оценке любых программ, ставящих целью реализацию репродуктивной функции. При этом эффективность программ ЭКО-ОД с нативными ооцитами не зависит от того, будут ли получаемые из них эмбрионы переносится сразу же после их генерации (на стадии бластоцисты) или ПЭ будет осуществлен в отсроченном варианте, предусматривающем криоконсервацию (витрификацию) бластоцист, полученных из нативных эмбрионов.

Так же необходимо принять во внимание, что витрифицирование ооцитов для использования в программах ЭКО-ОД обусловливает необходимость увеличения числа донорских яйцеклеток, расходуемых для получения того же числа беременностей, которое обеспечивается нативными ооцитами. Это связано с потерями витрифицированных женских гамет на этапах замораживания/оттаивания и, в особенности, со снижением их способности к оплодотворению после размораживания. Кроме того, при культивировании эмбрионов, происходящих из витрифицированных ооцитов, реже происходит развитие до стадии бластоцисты. Из-за этого в программах ЭКО-ОД с

витрифицированными ооцитами редко когда удается получить количество бластоцист более 3 из одной порции, состоящей из 5-6 донорских яйцеклеток, что препятствует созданию запаса «лишних» (не использованных в текущем лечебном цикле) бластоцист для их последующих дополнительных переносов.

К недостатку программ ЭКО-ОД с витрифицированными ооцитами следует отнести и возрастание частоты многоплодия (в % от числа всех клинических беременностей), которое, как это ни парадоксально, отмечается на фоне более низких показателей ЧНБ в сравнении с программами ЭКО с нативными донорскими яйцеклетками. Данный факт указывает на то, что разные порции используемых витрифицированных ооцитов содержат очень разные по качеству яйцеклетки. По этой причине после переноса 2 или 3 бластоцист, генерированных из витрифицированных ооцитов, беременность или не наступает вообще, или оказывается многоплодной. Иными словами, при использовании витрифицированных ооцитов зачатием труднее управлять, т.е. сложнее обеспечивать условия для индукции именно одноплодной беременности, что является явным недостатком. Поэтому на практике выбор числа переносимых эмбрионов в программах ЭКО-ОД с витрифицированными ооцитами должна определять сама пациентка, для которой в одних случаях приоритетом лечения является достижение беременности с любым числом развивающихся плодов, а в других – только одноплодная беременность (т.е. когда многоплодие рассматривается как более негативное явление, чем бесплодие).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В последнее время в развитых европейских странах прослеживается стойкая тенденция к увеличению возраста планирования деторождения после 30 лет, что привело к необходимости применения методов ВРТ для достижения беременности. Бесплодие затронуло более 25 млн. граждан ЕС [93]. При этом средняя частота наступления беременности в европейских центрах в программе экстракорпорального оплодотворения составляет 32,5 % [85, 105]. Отмечается стойкая тенденция к откладыванию репродуктивной функции. Так, по данным ASRM среди населения США в течение последних трех десятилетий возросла частота беременности и родов в возрасте 35-50 лет в структуре общей рождаемости.

Всем известно, что с 35 лет у женщин отмечается постепенное угасание репродуктивной функции, а в возрасте 40-50 лет – менструальной и гормональной функции, что по критериям STRAW+10 уже является возрастом перименопаузы, а необратимое выключение репродуктивной функции наступает задолго до прекращения менструальной функции [24]. В этой связи встаёт вопрос о типе использования генетического материала у женщин в возрасте после 35 лет.

Накопленный мировой опыт использования методов ВРТ у пациенток в старшем репродуктивном возрасте позволяет отметить преимущества применения донорских ооцитов для достижения беременности. В то же время возникает ряд споров относительно проведения собственной стимуляции суперовуляции, либо использования донорских ооцитов [67, 91, 128, 143]. Однако, для подтверждения преимущества использования донорских ооцитов по сравнению с использованием собственного генетического материала в старшем репродуктивном возрасте возможно проведение исследований лишь в тех странах, где программы ЭКО с донацией ооцитов не запрещены. В связи с чем, проведенное нами исследование актуально, что подтверждается с одной стороны, увеличением в структуре обращаемости в центры ЭКО после 35 лет, и

необходимостью выбора программы ЭКО с собственной ССО, либо с использованием донорских ооцитов с другой стороны.

Проведенное нами исследование эффективности программ ЭКО с собственным и с донорским генетическим материалом у пациенток старшего репродуктивного возраста показало, что эффективность программ ЭКО у пациенток в 38-40 лет (группа AI) и 41-43 года (группа AII) имеет прямую зависимость от возраста. Такое разделение пациенток было принято в связи с критериями STRAW+10, согласно которым 40 лет является возрастом перименопаузы, а также для достоверности полученных результатов был определен меньший возрастной интервал.

Помимо возрастного критерия, принято считать, что достаточное количество ооцитов в результате ССО в программе ЭКО повышает частоту наступления беременности, однако эта зависимость актуальна в основном у пациенток молодого возраста [106, 112, 140]. Для подтверждения данной тактики в проведенной нами работе пациентки дополнительно были разделены на подгруппы α (с сохраненным резервом) и β (со сниженным резервом). Таким образом, были сформированы 4 подгруппы: AI- α, AI- β, AII- α и AII- β, согласно дизайну исследования.

Клинические исходы характеризовали по показателям $ЧНБ_{ПЭ}$, $ЧНБ_{СЦ}$, количеству отмен переносов эмбрионов и частоте ранних (в I триместре) репродуктивных потерь.

Результаты проведенного исследования показали, что возраст значительно влияет на успех проведения попытки ЭКО и на показатель ЧНБ, который прогрессивно снижается после 40 лет (табл. 7). Так у пациенток группы А II (41-43 года) в сравнении с женщинами группы А I (38-40 лет) показатель ЧНБ на СЦ оказался ниже в 2,8 раза (8,4% против 23,1%, $p<0,001$), ЧНБ на ПЭ – в 2,4 раза (11,5% против 27,7%, $p<0,001$). Наши данные согласуются с данными зарубежных авторов [97], где $ЧНБ_{СЦ}$ у пациенток 38-40 лет составляет 22.1%, а среди пациенток 41-42 лет $ЧНБ_{СЦ}$ 12,4%.

В литературе имеются данные о том, что вероятность наступления беременности при проведении лечения методом ЭКО снижается в среднем на 4,7% из расчёта на каждый год жизни после 30 лет (Schwartz, Mayaux M., 2007). А при получении бедного ответа, особенно у пациенток старшего возраста достичь желаемой беременности гораздо сложнее [98]. Мы оценили основные результаты по показателям $ЧНБ_{СЦ}$ и $ЧНБ_{ПЭ}$ в зависимости от количества полученных ооцитов. По полученным результатам нашего исследования, согласно которым в группе AI у пациенток с бедным ответом $ЧНБ_{СЦ}$ составила 13,9% (табл. 10), что практически в два раза ниже, чем у пациенток с оптимальным ответом яичников на стимуляцию суперовуляции в подгруппах b, c, d ($ЧНБ_{СЦ}$ 21,3%; $ЧНБ_{СЦ}$ 32,8%; $ЧНБ_{СЦ}$ 31,1%). Это подчеркивает важность не только возрастного фактора и состояния овариального резерва, но и характера ответа яичников на СОО.

Однако, при оценке тех же параметров у пациенток в возрасте 41-43 лет из группы AII (табл.11) результаты программы ЭКО резко снижены даже при получении адекватного ответа яичников в подгруппах a, b, c ($ЧНБ_{СЦ}$ 3.5%; $ЧНБ_{СЦ}$10%; $ЧНБ_{СЦ}$ 13%;), что перекликается с результатами других исследований [26, 90, 97], которые говорят о низкой эффективности лечения бесплодия в позднем репродуктивном возрасте. Всё это подчеркивает целесообразность своевременного перехода к альтернативным программам ЭКО с использованием донорских ооцитов.

В настоящее время важным показателем при проведении программы ЭКО является частота отмен переноса эмбрионов, которая в основном связана либо с СГЯ (когда приходится секвенировать цикл), либо с прерыванием лечебного цикла в связи с отсутствием эмбрионов пригодного морфологического качества. Накопленный мировой опыт демонстрирует, что частота анеуплоидии зрелых ооцитов наблюдаемая у женщин в возрасте после 40 лет, составляет почти 75% [73, 100, 112, 129]. В связи с чем, такой показатель, как частота отмен переноса, является важным при проведении ЭКО у пациенток в старшем репродуктивном возрасте.

Анализ отмен ПЭ показал, что среди исследуемых пациенток в возрасте 41-43 лет он в 2 раза выше, чем в группе 38-40 лет и составляет 27% против 14,7% соответственно (табл. 13). При этом наши наблюдения продемонстрировали, что основной причиной отмены ПЭ явилось неудовлетворительное морфологическое качество эмбрионов и достоверно выше среди пациенток с бедным ответом и составляет более 82% в обеих возрастных группах (табл. 14; 15). При этом только у 18% пациенток отмена ПЭ была связана либо с проведением предимплантационного генетического анализа, либо с желанием пациентки накопления эмбрионов. Процент отмены переноса в связи с возможным синдромом гиперстимуляции яичников наблюдался лишь у пациенток с адекватным ответом на стимуляцию в возрастной группе до 40 лет и не имел значимых клинических проявлений, что говорит о минимальных рисках развития СГЯ у пациенток позднего репродуктивного возраста. Тогда как у каждой 4 пациентки в возрасте 38-40 лет и у каждой 3 пациентки в возрасте 41-43 лет программа ЭКО была не завершена по причине отмены переноса эмбрионов в связи с отсутствием морфологически пригодных эмбрионов.

Учитывая, что конечной целью проведения программы ЭКО является рождение здорового ребенка, одним из важнейших показателей является частота репродуктивных потерь, которая, согласно данным литературы, у женщин старшего репродуктивного возраста, забеременевших с помощью методов экстракорпорального оплодотворения, достигают 30% [33, 54, 112].

В проведенной работе нами были оценены репродуктивные потери у пациенток в старшем репродуктивном возрасте в зависимости от возраста и от сохранности овариального резерва. Полученные результаты показали, что максимальная частота репродуктивных потерь была у пациенток в возрасте 41-43 лет и достигла 25%, что служит дополнительным показателем к использованию донорских ооцитов, а у пациенток с сохраненным ОВР в обеих возрастных группах отмечался сравнительно схожий результат частоты репродуктивных потерь на уровне 12-13% с преобладанием неразвивающейся беременности, что вероятно связано с генетическими мутациями эмбрионов не прошедших

предварительно генетический скрининг. У пациенток со сниженным ОВР, в сравнении с женщинами с сохраненным ОВР, отмечалось примерно 2-кратное возрастание ранних репродуктивных потерь что очевидно снижает результативность программы ЭКО у пациенток старшей возрастной группы, в то же время усиливая негативный психологический настрой на рождение здорового ребёнка.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют констатировать, что пациенткам старшей возрастной группы со сниженным овариальным резервом яичников и бедным ответом в предыдущих циклах ЭКО целесообразно переходить к программе ЭКО с донацией ооцитов. Применение донорских ооцитов у женщин позднего репродуктивного возраста способно значительно повысить эффективность лечения бесплодия, не только потому, что у них очень низкий овариальный резерв, но и потому, что яйцеклетки этих женщин зачастую имеют неудовлетворительное качество [63]. Проведенный нами анализ по обращаемости пациенток старшего репродуктивного возраста продемонстрировал высокую востребованность программ ЭКО с использованием ооцитов донора, что согласуется с авторами [67, 94, 121].

Ретроспективный анализ проводимой нами работы также показал возрастание востребованности программы ЭКО с донацией ооцитов с 23% в 2013г до 25% в 2015 г. по данным МОНИИАГ.

На сегодняшний день ооциты доноров могут быть использованы как с синхронизацией циклов донор-реципиент (нативные ооциты), так и без этапа синхронизации циклов с реципиенткой полученные ооциты могут быть витрифицированы для удобства использования позднее или оплодотворены в день получения, а далее криоконсервированы уже полученные эмбрионы.

Согласно данным США в период 2013-2015гг. было определено сокращение программ ЭКО с использованием свежих ооцитов на 32,9% в связи с нежеланием пациентами проходить этап синхронизации циклов с донором, напротив программы с витрифицированными ооцитами и эмбрионами увеличились на 44% [107].

В связи с чем, нами было проведено собственное исследование для оценки эффективности различных программ ЭКО-ОД и выделено 3 группы пациенток, для которых использовали три вида программ:

- с нативными ооцитами;
- с крио-эмбрионами, полученными из нативных ооцитов;
- с витрифицированными ооцитами.

Полученные нами данные показали, что преимуществом обладают программы с нативными ооцитами по показателям $ЧНБ_{ПЭ}$ 47% (нативные ооциты), 35% (криоэмбрионы из нативных ооцитов) и 31,4% (витрифицированные ооциты). При этом и по данным зарубежных авторов программа ЭКО-ОД с витрифицированными ооцитами по важнейшим показателям клинической эффективности уступает своим конкурентам, т.е. программам ЭКО-ОД с размороженными и с нативными эмбрионами, получаемыми из свежевыделенных ооцитов [75, 102, 109, 133]. Так же согласно данным РАРЧ за 2014 год при проведении программы ЭКО-ОД с использованием нативных ооцитов ЧНБ составила 37.4% [48].

Результаты работы показали, что при использовании витрифицированных ооцитов существует ряд рисков, связанных с лизисом клеток, потерей эмбрионов и в последствии незавершением программы ЭКО, а это весьма накладно экономически, учитывая отсутствие возможности получения донорских ооцитов за счёт средств ОМС на территории РФ [41].

Согласно данным зарубежных авторов, витрификация обеспечивает высокую выживаемость донорских ооцитов 90% и сопоставимое оплодотворение, развитие эмбрионов, имплантацию и ЧНБ с нативными ооцитами донора [102, 107, 109]. По результатам авторов, при использовании витрифицированных ооцитов донора выживаемость составила 86,1%, оплодотворились 89,7% ооцитов, ЧНБ 26% [65, 73, 102].

Основываясь на результатах нашего исследования можно отметить сопостовимые результаты, а именно, при проведении программ с использованием

витрифицированных ооцитов, выживаемость составила 92,3%, оплодотворение от количества выживших 72,7%, ЧНБ 31,4% (табл. 19). В другом исследовании [74, 75], был проведен сравнительный анализ программ с витрифицированными и свежими ооцитами, при котором выживаемость витрифицированных составила 92,5%, оплодотворение 74,2% против 73,3% у свежих, а ЧНБ 43,7% в группе витрифицированных ооцитов, при том что в группе с нативными ооцитами ЧНБ составила 41,1%. Основываясь на этих исследованиях и учитывая результаты нашей работы, можно подтвердить, что программы ЭКО-ОД с использованием витрифицированных ооцитов являются эффективными, надежными и безопасными для пациенток старшего репродуктивного возраста.

В работе дополнительно было определено адекватное количество переносимых эмбрионов при использовании витрифицированных донорских ооцитов, при этом полученные результаты показали, что при переносе 1 эмбриона возможность наступления беременности крайне низка, а при переносе более 1 эмбриона существует риск многоплодия, что увеличивает риски осложнений беременности, в связи с возрастом исследуемых пациенток. Таким образом, сама по себе программа ЭКО-ОД с витрифицированными ооцитами характеризуется парадоксальной несбалансированностью зависимости ЧНБ от числа переносимых эмбрионов и требует дополнительных иссследований для достижения наилучших результатов.

Ещё одним аргументом в пользу программы ЭКО с донацией ооцитов является показатель отмены ПЭ, который в программе ЭКО с нативными эмбрионами оказалась равной нулю, а с размороженными эмбрионами составил 5,3% из-за последствий криотравмы (полного лизиса или появления морфологических дефектов при размораживании). В группе пациенток с использованием витрифицированных ооцитов перенос эмбрионов выполнить не удалось у 11,8%, где причиной отмены ПЭ была неудовлетворительная морфологическая характеристика полученных эмбрионов к 5-м суткам развития (табл. 17).

Из этого наблюдения следует, что для обеспечения сопоставимой частоты наступления беременности в случаях использования ЭКО-ОД с

витрифицированными ооцитами потребуется минимум на 25% больше ооцитов, чем при выполнении описываемых конкурирующих программ ЭКО-ОД. На практике для многих пациенток это неизбежно будет приводить к удорожанию лечения, но с другой стороны уменьшит период ожидания донора. Кроме того, программа ЭКО-ОД с витрифицированными ооцитами оказывается более дорогостоящей еще и из-за того, что при ее выполнении для оплодотворения размороженных женских гамет всегда приходится использовать технологию ИКСИ. В отличие от этого, в программах ЭКО с нативными эмбрионами и размороженными криоэмбрионами для оплодотворения нативных ооцитов, при отсутствии сопутствующего мужского фактора вполне пригодна менее дорогая методика стандартной инсеминации спермой [109, 139]. Несомненно, что методики витрификации, последующего размораживания и оплодотворения ооцитов является значительным достижением современной эмбриологии, тем не менее, данные литературы и собственный опыт позволяют предостеречь от чрезмерной комерциализации этого направления.

Основываясь на представленный материал, можно констатировать, что по совокупности параметров, характеризующих клинические исходы сравнивавшихся программ ЭКО-ОД, наилучшими и примерно одинаковыми оказались варианты с использованием свежих и размороженных эмбрионов, полученных из нативных ооцитов. В свою очередь, применение эмбрионов, полученных из предварительно витрифицированных ооцитов оказалось неэффективным при переносе одного эмбриона.

Что касается самого предназначения технологии витрификации ооцитов, то она должна, по нашему мнению, использоваться у доноров в программах ЭКО-ОД, ооциты которых не обладают принципом криотолерантности, который до настоящего времени недостаточно изучен, к методу витрификации, либо применяться для сохранения репродуктивного потенциала у женщин с вполне нормальным (в период забора ооцитов) овариальным резервом. Допустимо использование витрификации собственных ооцитов у женщин молодого возраста с целью сохранить свой генетический материал для отсроченного его

использования. Одним из основных показаний к витрификации ооцитов может быть угроза потери репродуктивной функции (перед проведением гонадотоксичной терапии, операций на яичниках), если у женщины нет полового партнера и одновременно нет желания сохранения эмбрионов, полученных из собственных ооцитов и донорской спермы .

Суммируя представленный материал, можно заключить, что пациенткам позднего репродуктивного возраста с бедным ответом в анамнезе целесообразно переходить к альтернативным программ ЭКО с использованием ооцитов донора для улучшения клинических исходов и достижения беременности. Так как по основным критериям эффективности программы ЭКО, а именно ЧНБ, частота отмен переноса эмбрионов, частота репродуктивных потерь программы ЭКО с донорскими ооцитами независимо от модификации, имеют гораздо большую эффективность у пациенток старшего репродуктивного возраста. Важно отметить, что использование порции донорских ооцитов в количестве 5-6 штук является достаточным для проведения одной программы ЭКО по опробованной в нашей работе схеме лечения. Учитывая возможности эмбриологии и развитие метода витрификации в отношении ооцитов, выбор программы ЭКО-ОД зависит в основном от финансовых возможностей пациентов и грамотного объяснения специалистами всех плюсов и минусов программы ЭКО с донацией ооцитов. Было бы правильно, чтобы специалисты максимально объективно доводили до сведения пациентки шанс наступления беременности после размораживания ооцитов и их оплодотворения.

Что касается программ ЭКО-ОД, то данные, полученные в нашем исследовании, продемонстрировали приоритетность метода оплодотворения нативных ооцитов, с последующим переносом или криоконсервацией

полученных эмбрионов. При этом, показана не только клиническая эффективность, но и экономическая целесообразность использования для оплодотворения нативных ооцитов, по сравнению с применением размороженных ооцитов доноров в программах ЭКО-ОД.

ВЫВОДЫ

1. При лечении бесплодия у пациенток старшей возрастной группы результаты ЭКО по критериям $ЧНБ_{СЦ}$, $ЧНБ_{ПЭ}$ и частоты ранних репродуктивных потерь существенно улучшаются при использовании вместо собственного генетического материала:

- нативных ооцитов донора;
- криоконсервированных эмбрионов, полученных из нативных ооцитов;
- витрифицированных ооцитов донора.

2. ЧНБ при использовании ооцитов донора в программе ЭКО-ОД у пациенток старшей возрастной группы статистически значимо не отличается от ЧНБ у молодых пациенток в стандартной программе ЭКО.
3. Среди программ ЭКО-ОД наибольшей эффективностью обладают программы с нативными ооцитами донора и программы с криоэмбрионами, полученными из нативных донорских ооцитов.
4. Для достижения беременности при проведении программы ЭКО-ОД достаточным является использование одной порции нативных ооцитов в количестве 5-6 штук или двух порций с таким же количеством витрифицированных ооцитов.
5. Улучшение результатов лечения по показателю ЧНБ в программе ЭКО-ОД с витрифицированными ооцитами возможно лишь при увеличении числа переносимых эмбрионов более одного, однако при этом возрастает риск многоплодия, который оказывается значительно большим, чем в альтернативных программах ЭКО-ОД с эмбрионами, полученными из свежевыделенных ооцитов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Факт отмены переноса из-за неполучения эмбрионов или их неудовлетворительного морфологического качества при выполнении процедуры стандартного ЭКО с собственным генетическим материалом пациентки следует рассматривать как показание к использованию для преодоления бесплодия программы ЭКО с ооцитами донора (ЭКО-ОД).

2. При выполнении программы ЭКО-ОД с витрифицированными ооцитами следует предусматривать их более повышенный расход, который проявляется в удвоении числа порций, необходимых для достижения беременности в сравнении с использованием нативных донорских ооцитов.

3. Решение о переносе конкретного количества эмбрионов (бастоцист) при выполнении лечебного цикла программы ЭКО-ОД с витрифицированными ооцитами должна принимать сама пациентка, которую следует предупреждать:

- о крайне низкой (на уровне 10%) вероятности достижения одноплодной беременности при переносе единственного эмбриона;
- о существенном увеличении возможности преодоления бесплодия с одновременно резким возрастанием риска многоплодия при переносе 2 и, тем более, 3 эмбрионов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.

АМГ-антимюллеров гормон

а-ГнРГ - агонист (аналог) гонадотропин-релизинг гормона

ант-ГнРГ–антагонист гонадотропин-релизинг гормона

ЗГТ – заместительная гормональная терапия

ИКСИ- ICSI (intracellular spermatozoa injection) внуриклеточная инъекция сперматозоида

ИППП- инфекции передаваемые половым путем

ОВР- овариальный резерв

ОКК- ооцит-кумулюсные клетки

ПГС- предимплантационный генетический скрининг

ПЭ – перенос эмбрионов

РДВ-раздельное диагностическое выскабливание

СГЯ – синдром гиперстимуляции яичников

ССО- стимуляция суперовуляции

СЦ – стимулированный цикл

ТВП- трансвагинальная пункция

УЗИ - ультразвуковое исследование

ФСГ - фолликулостимулирующий гормон

ЧНБ– частота наступления беременности

$ЧНБ_{ПЭ}$– частота наступления беременности на перенос эмбрионов

$ЧНБ_{СЦ}$– частота наступления беременности на стимулированный цикл

ЧРП- частота репродуктивных потерь

ЧХГ– человеческий хорионический гонадотропин

ЭКО - экстракорпоральное оплодотворение

ЭКО-ОД- экстракорпоральное оплодотворение с использованием ооцитов донора

STRAW- (Stages of Reproductive Aging Workshop) критерии репродуктивного старения

ЛИТЕРАТУРА

1. Авраменко, Н.В. Вспомогательные репродуктивные технологии / Н.В. Авраменко // Запорожский медицинский журнал. – 2014. – Том 84, №3. – С. 95-100.

2. Альбицкий, В.Ю. Правовые аспекты применения вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия / В.Ю. Альбицкий, Н.Д. Одинаева, В.О. Мансимова // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – Том 10, №2. – С. 12-14.

3. Амирова, А.Ф. Результаты переноса криоконсервированных эмбрионов в полость матки у пациенток с предыдущей неудачной попыткой ЭКО / А.Ф. Амирова, Г.М. Керимова // Проблемы репродукции. – 2009. – №1. – С.63-64.

4. Амирова, А.А. Факторы, влияющие на исходы ЭКО (обзор литературы) / А.А. Амирова, Т.А. Назаренко, Н.Г. Мишиева // Проблемы репродукции. – 2010. - №1.

5. Багненко С.Ф. Перспективы применения консервирующих технологий сохранения фертильности у женщин / С.Ф. Багненко, Б.В. Афанасьев, В.Ф. Беженарь, Н.Н. Рухляда // Материалы Международной научно-практической конференции «Репродуктивные технологии в онкологии». – 2015. – С. 29.

6. Белоцерковцева, Л.Д. Влияние возраста пациенток на частоту биологических потерь в программах ЭКО: опыт работы / Л.Д. Белоцерковцева, Л.В. Коноваленко, Е.В. Корнеева и др. // Проблемы репродукции. – 2008. - №3. – С. 53-56.

7. Бодрова, В.В. Репродуктивное здоровье женщин в России (по результатам исследований, проведенных в Перми, Екатеринбурге и Ивановской области в 1996 и 1999 г.г.) / В.В. Бодрова, Х. Голдберг // Социология медицины. - 2002.- № 1.- С. 21-32.

8. Боярский, К.Ю. Фолликулогенез и современная овариальная стимуляция (обзор литературы) / К.Ю. Боярский // Проблемы репродукции. – 2002. - №3. – С. 36-43.

9. Боярский, К.Ю. Роль антимюллерова гормона (АМГ) в норме и при различных гинекологических заболеваниях / К.Ю. Боярский, С.Н. Гайдуков // Журнал акушерства и женских болезней. – 2009. – Т. 58, №3. – С. 74-83.

10. Боярский, К.Ю. Молекулярные основы фолликулогенеза: от стадии больших антральных фолликулов до овуляции / К.Ю. Боярский, С.Н. Гайдуков // Проблемы репродукции. – 2010. – Том 16, №5. – С.13-23.

11. Боярский, К.Ю. Патофизиологические механизмы старения репродуктивной функции у женщин после 40 лет / К.Ю. Боярский, С.Н. Гайдуков // Проблемы репродукции. – 2011. - №3. – С. 6-15.

12. Брулеев, В.А. Состояние молекулярного имплантационного окна: роль в исходах ЭКО (обзор литературы) / В.А. Брулеев, Л.Н. Кузмичев, Н.С. Щеткина и др. // Проблемы репродукции. – 2009. - №6. – С. 24-27.

13. Буренкова, Н.В. Проблема выбора тактики лечения женщин со сниженным овариальным резервом методами ВТР / Н. Б. Буренкова, Э. В. Комличенко, А. В. Иванов // Проблемы репродукции. – 2014. - №3-4. – С. 28-33.

14. Булавенко, О.В. Антимюллеров гормон как маркер репродуктивной системы женщины / О.В. Булавенко // Репродуктивная эндокринология. – 2011. - №1. – С. 27-29.

15. Быстрова, О.В. Способы восстановления фертильности у онкологических больных / О.В. Быстрова, А.С. Калугина, Е.В. Цыбатов и др. // Практическая онкология. – 2009. – Том 10, №4. – С. 245-253.

16. Вартанян, Э.В. Причины неудач ЭКО (обзор литературы) / Э.В. Вартанян, И.В. Айзикович, А.Р. Антонов // Проблемы репродукции. – 2010. - №3. – С. 57-61.

17. Вейсман А. Перенос криоэмбрионов / А. Вейсман // Проблемы репродукции. – 2010. – №2. – С.34-40.

18. Верткин, А.Л. Возрастной андрогенный дефицит и эректильная дисфункция /А.Л. Верткин, Д.Ю. Пушкарь. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 176 с.

19. Витязева, И.И. Инновационные технологии в лечении бесплодия у пациентов с эндокринопатиями / И.И. Витязева // ДОКТОР. РУ. – 2009. – Том 50, №9. – С. 39-42.

20. Витязева,И.И. Исторические вехи развития методов вспомогательных репродуктивных технологий, основанных на оплодотворении invitro / И.И. Витязева, И.И. Бармина, Г.А. Мельниченко // Вестник репродуктивного здоровья. – 2011.- №1. - С. 5-14.

21. Громенко, Ю.Ю. Влияние факторов оценки качества перенесенных эмбрионов на прогнозирование частоты наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения / Ю.Ю. Громенко, И.Р. Исхаков // Медицинский вестник Башкортостана. – 2012. – Том. 7, №2. – С. 27-30.

22. Ермоленко, К.С. Секреция мелатонина у женщин старшего репродуктивного возраста / К.С. Ермоленко, С.И. Рапопорт, А.В. Соловьева // Клиническая медицина. – 2013. - №7. – С. 52-54.

23. Ермоленко, К.С. Коррекция содержания мелатонина в программах вспомогательных репродуктивных технологий. дис. … канд. мед. наук / К.С. Ермоленко. – Москва, 2014. - 115с.

24. Журнал «Здоровье женщины» №5 (81) / 2013 стр. 17-19

25. Калинина, Е.А. Некоторые клинико-эмбриологические аспекты программы переноса криоэмбрионов / Е.А. Калинина, И.И. Калинина, В.И. Корнеев и др. // Проблемы репродукции. – 2004.– №6. – С.28-33.

26. Ким, Р.Л. Эффективность применения препарата Перговерис в программах ЭКО/ИКСИ в старшей возрастной группе // Л. Ким, О. А. Попова // Репродуктивная медицина. – 2014. – Том 21, №4. - С. 37-39.

27. Крстич, Е.В. Влияние качества ооцитов и состояния овариального резерва на терапевтический потенциал экстракорпорального оплодотворения у пациенток позднего репродуктивного возраста / Е.В. Крстич, М. Крстич, В.Н. Юдаев // Альманах клинической медицины. – 2014. - №31. – С. 70-75.

28. Кулаков, В.И. Вспомогательные репродуктивные технологии – настоящее и будущее. В кн.: Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии. Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова, Л.Н. Кузьмичева. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. С. 11–14.

29. Кулаков, В.И. Гинекология. Национальное руководство / В.И. Кулаков, И.Б. Манухин, Г.М. Савельева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - С. 890-897.

30. Кулаков, В.И. Репродуктивное здоровье населения России / В.И. Кулаков // Consiliummedicum. – 2007. - №2. – С. 87-90.

31. Лопатина, О.В. Факторы женского здоровья с точки зрения старения репродуктивной системы и риска развития сердечно-сосудистых заболеваний / О.В. Лопатина, В.Е. Балан, О.Н. Ткачева и др. // Альманах клинической медицины. – 2015. - №37. – С. 111-117.

32. Малышева, Н.Н. Варианты неврологических нарушений у детей, рожденных от возрастных первородящих матерей / Н.Н. Малышева, диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, 14.01.11. нервные болезни, казань, 2014 148с.

33. Мишиева, Н. Г. Бесплодие у женщин позднего репродуктивного возраста: принципы диагностики и лечения в зависимости от овариального резерва: автореф. дис. … д-ра мед. наук / Н.Г. Мишиева Н. Г. - Москва, 2008. – 47 с.

34. Мотовилова, Н.О. Роль некоторых цитокинов в эффективности лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения / Н.О. Мотовилова, И.Ю. Коган, К.А. Сысоев, А.Н. Буйнова и др. // Медицинская иммунология. – 2012. – Т.14, №4-5. – С. 373-382.

35. Назаренко, Т.А. Донация ооцитов в программе ЭКО и ПЭ. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические и практические подходы) / Т.А. Назаренко, Е.Я. Финогенова, О.А. Осина. - М.: МИА; 2000.

36. Назаренко, Т.А. Значение оценки овариального резерва в лечении бесплодия у женщин старшего репродуктивного возраста / Т.А. Назаренко, Н.Г. Мишиева, Н.Д. Фанченко и др. // Проблемы репродукции 2005;(2):56-9.

37. Назаренко, Т.А. Синдром поликистозных яичников (современные подходы к диагностике и лечению бесплодия) / Т.А. Назаренко,В.М. Здановский, Э.Р. Дуринян и др. - М.: МЕДпресс-информ, 2005. - 208 с.

38. Назаренко, Т.А. Стимуляция функции яичников. / Т.А. Назаренко. – 3-е изд. – М.: Медпресс-Информ, 2011. – 271 с.

39. Назаренко, Т.А. «Бедный ответ». Тактика пациенток со сниженной реакцией на стимуляцию гонадотропинами в программах ЭКО / Т.А. Назаренко, К.В. Краснопольская. - М.: МЕДпресс-информ, 2012. – 80с.

40. Нефедова, А.В. Влияние стимуляции овуляции и условий культивирования эмбрионов на исход экстракорпорального оплодотворения у женщин разных возрастных групп / А.В. Нефедова, Т.И. Пестова, М.Д. Русакова, Г.В. Брюхин // Вестник ЮУрГУ. – 2011. - №26. – С. 87-90.

41. Попенко, А.Н. Анализ эффективности вспомогательных репродуктивных технологий методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида / А.Н. Попенко // Вестник Челябинского государственного университета. - 2013. - № 7 (298). – С. 142-144.

42. Приказ министерства здравоохранения РФ от 30 августа 2012г. № 107 " О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению" Зарегистрировано в Минюсте РФ 12 февраля 2013 г. Регистрационный N 27010

43. Протопопова, Н.В. Реализация федеральных и областных программ для лечения бесплодия в браке / Н.В. Протопопова, Ю.В. Мыльникова, Е.Б. Дружинина, Е.В. Одареева // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. Том 85, №3. - С. 107-109.

44. Протопопова, Н.В. Результаты переноса криоконсервированных и «свежих» эмбрионов в полость матки / Н.В. Протопопова, Е.Б. Дружинина, Н.А. Болдонова, Е.В. Одареева // Сибирский медицинский журнал. – 2012. - №6. – С. 67-71.

45. Радзинский, В.Е. Бесплодие и экстракорпоральное оплодотворение в свете контраверсий (по данным 7 Всемирного конгресса «Противоречия в акушерстве, гинекологии и фертильности») / В.Е. Радзинский, И.А. Алеев // Акушерство и гинекология. – 2006. - №1. – С. 60-62.

46. Резолюция по итогам общественных слушаний на тему: «Современные репродуктивные технологии: их доступность и эффективность» 28 апреля 2011 г., г.Москва.

47. Рищук, С.В. Вспомогательные репродуктивные технологии как ятрогенный фактор ухудшения здоровья детского населения / С.В. Рищук, В.Е. Мирский // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). – 2013. - №4. – 1-15.

48. Российская Ассоциация Репродукции Человека. Регистр ВРТ. Отчет за 2012 год. СПб., 2014. – 36 с.

49. Рощина Я.М. Факторы фертильности в современной России / Я.М. Рощина, А.В. Бойков. - Москва: EERC, 2005. - 64с.

50. Рудакова, Е.Б. Возможности повышения результативности вспомогательных репродуктивных технологий / Е.Б. Рудакова, Е.В. Полторака, А.А. Лузин и др. // Вестник НГУ. – 2009. – Том 7, №2. – С 20-25.

51. Струкова, С.А. Перинатальные исходы у пациенток после экстракорпорального оплодотворения / С.А. Струкова, Т.В. Павлова // Научные ведомости. – 2009. – Том 67, №12. – С. 71-74.

52. Табеева, Г.И., Преждевременная недостаточность яичников – загадка XXI века / Г.И. Табеева, Н.Н. Шамилова, Н.А. Жарух и др. // Акушерство и гинекология – 2013. - №12. – С.16-21.

53. Тишкевич, О.Л. Клинико-эмбриологическая оценка результатов экстракорпорального оплодотворения в зависимости от возраста пациенток. / О.Л. Тишкевич, А.Б. Жабинская, Е.В. Малышева // Проблемы репродукции. – 2004. - №2. – С. 33-37.

54. Троицкая, И.А.Рождаемость и планирование семьи в России: История и перспективы. Сборник статей / Под ред. Троицкой И.А., Авдеева А.А. – М., 2011. – «Демографические исследования», выпуск 18. – 177 с.

55. Фролова, О.Г. Основные показатели деятельности акушерско-гинекологической службы и репродуктивного здоровья / О.Г. Фролова, З.З. Токова // Акушерство и гинекология. – 2005. - №1. – С. 3-6.

56. Эверт, Л.С. Исходы беременности и состояние здоровья детей, рожденных после применения вспомогательных репродуктивных технологий / Л.С. Эверт, В.Г. Галонский, Е.А. Теппер и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – Том 28, №1. С - 65-69.

57. Элдер, К. Экстракорпоральное оплодотворение / К. Элдер, Б. Дейл. - М.: МЕДпресс-информ, 2008. – С.189-220.

58. Щербина, Н.А. Оценка возрастных изменений овариального резерва у женщин с бесплодием / Н.А. Щербина, О.Г. Градиль // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Том16, № 2, ч.2 (62). – С. 140-144.

59. Ярман, В.В. О значении медико-биологических факторов, влияющих на наступление беременности в супружеской паре / В.В. Ярман, В.В. Михайличенко, А.И. Новиков, Г.В. Долгов / Андрология и генитальная хирургия. – 2013. - №4. – С. 28-35.

60. Agopian, A.J. Predictors of trisomy 21 in the offspring of older and younger women / A.J. Agopian. L.K. Marengo, L.E. Mitchell // Brith Defects Res A ClinMolTeretol. – 2012. – Vol. 94, №1. – P. 31-35.

61. Ana Cobo, José Remohí, Ching-Chien Chang, Zsolt Peter Nagy Oocyte cryopreservation for donor egg banking Volume 23, Issue 3, Pages 341–346 DOI: https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.05.014

62. Azem, F., How many embryos to transfer in patients undergoing IVF? / F. Azem, Y. Yaron, A. Amit [et al.] // Hum Reprod. – 1996. - Vol.11, №1. – P. 229-230.

63. Balasch, J. Ageing and infertility: an overview / J. Balasch J. // Gynecological Endocrinology. – 2010. – P. 1–6.

64. Barad, D.H. Comparing anti-Mullerian Hormone (AMH) and Follicle-Stimulating Hormone (FSH) as predictors of ovarian function // D.H. Barad, A. Weghofer, N. Gleicher // FertilSteril. – 2009. –Vol. 91. P. 1553-1555.

65. Barritt, J., Luna, M., Duke, M., Grunfeld, L., Mukherjee, T., Sandler, B., Copperman, AB., 2007. Report of four donor-recipient oocyte cryopreservation cycles resulting in high pregnancy and implantation rates. Fertil. Steril. 87, 189 e113–187.

66. Beltadze, K. Ovarian reserve in women of late reproductive age by the method of treatment of PCOS / K. Beltadze, L. Barbakadze // Iranian Journal of Reproductive Medicine. – 2015. - Vol. 13, №. 5. – P. 263-268.

67. Brittany J Harrison1 Tara N Hilton1 et al. Advanced maternal age: ethical and medical considerations for assisted reproductive technology; International Journal of Women's Health 2017:9 561–570

68. Broekmans F, Kwee J, Hendriks D, Mol B, Lambalk C. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. Hum Reprod Update. 2006; 12:685–718. [PubMed: 16891297]

69. Broer S, Mol B, Hendricks D, Broekmans F. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. Fertil Steril. 2009; 91:705–13. [PubMed: 18321493]

70. C. Calhaz-JorgeC. de GeyterM.S. KupkaJ. de MouzonK. ErbE. et al. Wyns The European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)//Human Reproduction, Volume 31, Issue 8, 1 August 2016, Pages 1638-1652, https://doi.org/10.1093/humrep/dew151

71. Cakmak H., Taylor H.S. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. //Hum Reprod. -2011. V.26. -№2. -pp. 242-253

72. Casper R.F. It's time to pay attention to the endometrium. //Fertil Steril. -2011 – v.96. –pp. 519-521.

73. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2012 Assisted reproductive technology national summary report. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services; 2014.

74. Cobo A, Kuwayama M, P_erez S, Ruiz A, Pellicer A, Remoh_ı J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. Fertil Steril 2008;89:1657–64.

75. Cobo A, Meseguer M, Remoh_ı J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. Hum Reprod 2010;25:2239–46.

76. Chandra, A. Infertility service use in the United States: data from the national survey of family growth, 1982-2010 / A. Chandra, C.E. Copen, E.H. Stephen // Natl Health Stat Report. – 2014. - Vol.73. – P.1-21.

77. Chen M.J., Yang J.H., Peng F.H. et al. Extended estrogen administration for women with thin endometrium in frozen-thawed in-vitro fertilization program. //J Ass Reprod Genet. -2006. –v.23. –pp. 337-342.

78. Chen S.L., Wu F.R., Luo C. et al. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a retrospective cohort study. //Reprod Biol Endocrinol. -2010. –v.8. –pp. 30-32.

79. Cheng, E.Y. Meiotic recombination in human oocytes / E.Y. Cheng, P.A. Hunt, T.A. Naluai-Cecchini [et al.] // PLoS Genet. - 2009. – V.5,№9.

80. Chian, R.C. Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes / R.C. Chian, J.Y Huang., L. Gilbert [et al.] // Fertil. Steril. – 2009. – Vol.91, №6. – P.2391-2398.

81. Chie, T. Anti-Mullerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization / T. Chie, F. Atsuy, K. Masahiro [et al.] // FertilSteril. – 2008. – Vol. 89. – P. 586-591.

82. Child, T.J. Success during in vitro maturation (IVM) of oocyte treatment is dependent on the numbers of oocytes retrieved which are predicted by early follicular phase transvaginal ultrasound measurement of the antral follicle count and peak ovarian stromal blood flow velocity / T.J. Child, B. Guleki, S.L. Tan // Hum Reprod. – 2001. – Vol. 16. – P. 41.

83. Chung K. Sperm cryopreservation for male patients with cancer: an epidemiological analysis at the University of Pennsylvania / K. Chung, J. Irani, G. Knee [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2004. – Vol.113, №5. – P 7-11.

84. Dain L., Bider D., Levron J. et al. Thin endometrium in donor oocyte recipients: enigma or obstacle for implantation? //Fertil Steril. -2013. –v.100. -№5. –pp. 1289-1295.

85. De Mouzon, J. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE The European IVF-Monitoring (EIM),

and Consortium for the European Society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE) / J. de Mouzon, V. Goossens // Hum. Reprod. – 2012. Vol. 27. – P. 954-966.

86. Deffieux, X. Inhibins, activins and anti-Mullerian hormone: structure, signaling pathways, actions and clinical relevance in assisted reproductive therapy / X. Deffieux, J.M. Antoine // GynecolObstetFerti. – 2003. – Vol. 31, №11. - P. 900-11.

87. Detti L, Williams DB, Robins JC, Maxwell RA, Thomas MA. A comparison of three down regulation approaches for poor responders undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril. 2005; 84:1401–15. [PubMed: 16275235]

88. Donaghay, M. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease / M. Donaghay, B.A. Lessey // Semin. Reprod. Med. - 2007. - Vol. 25. - P. 461–475.

89. Drakakis P., Loutradis D., Vomvolaki E. et al. Luteal estrogen supplementation in stimulated cycle may improve the pregnancy rate in patients undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer. //Gynecological Endocrinology. //2007. –v.23. -№11. –pp. 645-652.

90. Ebner T. Basal level of anti-Mullerian hormone is associatied with oocyte quality in stimulated cycles / T. Ebner, M. Sommergruber, M. Mosser et al. // Hum Reprod. – 2006. – Vol. 21, №8. – P. 2022-2026.

91. Eisenberg VH, Schenker JG. Pregnancy in the older woman: scientific and ethical aspects. Int J Gynecol Obstet. 1997;56(2):163–169.

92. El-Toukhy, T. Outpatient hysteroscopy and subsequent IVF cycle outcome: a systematic review and meta-analysis / T. El-Toukhy, S.K. Sunkara, A. Coomarasamy [et al.] // Reprod Biomed Online. – 2008. - Vol. 16. – P. 712-719.

93. ESHRE annual report 2015; 57, pp.8-10

94. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Oocyte donation to postmenopausal women. Fertil Steril. 2004;82 Suppl 1:S254–S255.

95. Farahavar, A. Effect of melatonin on in vitro maturation of bovine oocytes / A. Farahavar, A.Z. Shahne, H. Kohram [et al.] // African Journal of Biotechnology. – 2010. - Vol. 9, №17. - P.2579-2583.

96. FeichtingerW. Проблемы оценки перинатального исхода и состояния здоровья детей после ВТР / W. Feichtinger, P. Lyatoshinakya, P. Kemeteretal. // Материалы XXI международной конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека «Репродуктивные технологии сегодня и завтра». – СПб., 2011. – С. 145-147.

97. Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589. American College of Obstetricians and Gynecologists. Obstet Gyne- col 2014;123:719–21

98. Ferraretti A.P., La Marca A., Fauser B.C. et al. ESHRE consensus on definition of "poor response" to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. //Hum. Reprod. –2011. –v.26. -№7. –pp. 1616 – 1624

99. Garrido-Gomez T., Ruiz-Alonso M., Blesa D. et al. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. //Fertil Steril. -2013. –v.32. -№4. –pp. 1078-1085.

100. Grotegut CA, Chisholm CA, Johnson LN, Brown HL, Heine RP, James AH. Medical and obstetrical complications among pregnant women aged 45 and older. PLoS One 2014;9:e96237.

101. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Anti-Mullerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. Fertil Steril. 2010; 94:2824–7. [PubMed: 20538269]

102. G Sher, L Keskintepe, T Mukaida at al. Selective vitrification of euploid oocytes markedly improves survival, fertilization and pregnancy-generating potential.// Reproductive BioMedicine Online No 4. 2008 524-529.

103. Hassold, T. Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew / T. Hassold, P. Hunt // CurrOpinPediatr. – 2009. - Vol. 21, №6. - P.703-708.

104. Herbert, D.L. Infertility, medical advice and treatment with fertility hormones and/or in vitro fertilization population perspective from the Australian Longitudinal Study on Women's Health / D.L. Herbert, J.C. Luck, A.J. Dobson // Aust N Z J Public Health. – 2009. Vol. 33, №4. – P. 358-364.

105. Human Reproduction, vol. 29, no. 10 pp. 2103-2104, 2014

106. Klipstein S, Regan M, Ryley DA, Goldman MB, Alper MM, Reindollar RH. One last chance for pregnancy: a review of 2,705 in vitro fertilization cycles initiated in women age 40 years and above. Fertil Steril 2005;84:435–45.

107. Kushnir et al. New national outcome data on fresh versus cryopreserved donor oocytes // Journal of Ovarian Research (2018) 11:2 DOI 10.1186/s13048-017-0378-4

108. Kuwayama, M. Efficiency of the cryotop method to cryopreserve human oocytes; analysis of in vitro and in vivo results at eleven IVF clinics / M. Kuwayama, S.P. Leibo// Fetil. Steril. – 2008. – Vol. 90. – P. 281-282.

109. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online 2005;11: 300–8.

110. Leader, A. Pregnancy and motherhood: the biological clock / A. Leader // Sex Reprod Menopause. – 2006. – Vol. 4. – P. 3-6.

111. Maheshwari, A. Dynamic tests of ovarian reserve: a systematic review of diagnostic accuracy / A. Maheshwari, A. Gibreel, S. Bhattacharya, N. Johnson // ReprodBiol Med. – 2009. Vol. 18. – P. 717-734.

112. Mark V. Sauer, M.D. Reproduction at an advanced maternal age and maternal health Volume 103, Issue 5, Pages 1136–1143
DOI: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.03.004

113. Mashiach, R. Follicular fluid levels of anti-Mullerian hormone as a predictor of oocyte maturation, fertilization rate, and embryonic development in patients with polycystic ovary syndrome / R. Mashiach, A. Amit, J. Hasson [et al.] // FertilSteril. – 2010. Vol. 93. – P. 2299-2302.

114. Mosalanejad, L. Barriers to infertility treatment: an integrated study / L. Mosalanejad, N. Parandavar, S. Abdollahifard // Glob J Health Sci. – 2013. - Vol.6, №1. – P.181-191.

115. Muttukrishna S. Markers of Ovarian Reserve / S. Muttukrishna // BJOG. – 2004. – Vol. 111. – P. 1248–1253.

116. Nakayama, T. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion in vitro: HCG enhances the effects of PBMC. // T.

Nakayama, H. Fujiwara, M. Maeda et al. // Hum Reprod. - 2002. Vol. 17, №1. – P. 207–212.

117. Ng, E.H. Ageing and ART: a waste of time and money? / E.H. Ng, P.C. Ho // Best Pract Res ClinObstetGynaecol. – 2007. – Vol. 21. - P. 5-20.

118. Olson, C.K. In-vitro fertilization is associated with an increase in major birth defects / C.K. Olson, K.M. Keppler-Noreuil, P.A. Romitti et al. // Fertil. Steril. – 2005. – Vol.84, №5. – P. 1308-1315.

119. Oosthuizen, G.M., A role for melatonin in breast disease and the menopause / G.M. Oosthuizen, G. Joubert, R.S. du Toit // S. Aft. Med. J. – 2001. – Vol.91, №7. – P. 576-577.

120. Papathanasiou A. Implementing the ESHRE ‘poor responder’ criteria in research studies: methodological implications. Hum Reprod. 2014; 29:1835–8

121. Paulson RJ, Sauer MV. Pregnancies in post-menopausal women: Oocyte donation to women of advanced reproductive age: ‘How old is too old?’. Hum Reprod. 1994;9(4):571–572.

122. Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. Hum Genet 2003;112:195–203.

123. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Aging and infertility in women // FertilSteril. – 2006. – Vol. 86, №1. – P. 248-252.

124. Res, U. Birth after treatment of a male with seminoma and azoospermia with cryopreserved thawed testicular tissue / U. Res, P. Res, D. Kastelic et al. // Hum. Reprod. – 2000. – Vol.15, №4. – P.861-864.

125. Rosendahl M., Loft A., Byskov A.G. et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report / M. Rosendahl, A. Loft, A.G. Byskov [et al.] // Hum. Reprod. – 2006. – Vol.21, №8. – P. 2006-2009.

126. Rosenwaks, Z. The role of maternal age in assisted reproduction / Z. Rosenwaks, O.K. Davis, M.A. Damario // Hum Reprod. – 1995. – Vol. 10, №1. - P. 165–73.

127. Sibert, L. Aging of the human testis / L. Sibert, E. Lacarrière, A. Safsaf [et al.] // Presse Med. – 2014. – Vol.43, №2. – P.171-177.

128. Smajdor A. The ethics of egg donation in the over fifties. Menopause Int. 2008;14(4):173–177.

129. Schoen C, Rosen T. Maternal and perinatal risks for women over 44. A review. Maturitas 2009;64:109–13.

130. Tao, J. Cryopreservation of human embryos at the morula stage and outcomes after transfer / J. Tao, H. Randall, M. Craig, M. Johnson [et al.]// Fertil. Steril. – 2003. – Vol. 82. – P.108-118.

131. Tinkanen, H. Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function / H. Tinkanen, M. Bläuer, P. Laippala P. [et al.] // Eur J ObstetGynecolReprod Bio. – 2001. Vol. 94, №1. – P. 109-113.

132. Török, P. New methods for the ambulatory evaluation of female infertility / P. Török, T. Major // Orv Hetil. – 2013. - V.154, №33. – P.1287-1290.

133. Traub M., Arsdale A., Pal L.et al. Endometrial thickness, Caucasian ethnicity, and age predict clinical pregnancy following fresh blastocyst embryo transfer: a retrospective cohort. //Reprod Biol Endocrinol. -2009. -7. -33.

134. Trokoudes KM, Pavlides C, Zhang X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. Fertil Steril 2011;95:1996–2000.

135. Twenty years of Cochrane reviews in menstrual disorders and subfertility / C. Farquhar [et al.] // Hum Reprod. – 2013. – Vol. 28, № 11. – P. 2883-2892.

136. Vaskivuo, T.E. Apoptosis in the human ovary / T.E. Vaskivuo, J.S. Tapanainen // Reprod Biomed Online. – 2003. – Vol. 6. - P. 24–35.

137. Venetis, C.A. Evidence-based management of poor ovarian response / C.A. Venetis, E.M. Kolibianakis, T.B. Tarlatzis, .B.C. Tarlatzis // Ann NY Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1205. – P. 199-206.

138. Venetis CA. The Bologna criteria for poor ovarian response: the good, the bad and the way forward. Hum Reprod. 2014; 29:1839–41.

139. Wang Y.A., Farquhar C., Sullivan EA. Donor age is a major determinant of success of oocyte donation/recipient program. //Hum Reprod -2012. –v.27. -№1. –pp. 118-125.

140. Warburton D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. Cytogenet Genome Res 2005;111:266–72.

141. Westerlund, E. Detection of a procoagulable state during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization with global assays of haemostasis / E. Westerlund, P. Henriksson, H. Wallén [et al.] // Thromb. Res. - Apr. 2012. — Vol. 46, №4. - P. 417–425.

142. Wiener-Megnazi Z. Advanced paternal age and reproductive outcome / Z. Wiener-Megnazi, R. Auslender, M. Dirnfeld // Asian J Androl. – 2012. - Vol. 14, №1. – P. 69-76.

143. Usta IM, Nassar AH. Advanced maternal age. Part I: obstetric complications. Am J Perinatol. 2008;25(8):521–534

144. Yu B, Mumford S, Royster GD, Segars JH, Armstrong AY. Cost-effectiveness analysis comparing continuation of assisted reproductive technology with conversion to intrauterine insemination in patients with low follicle numbers. Fertil Steril. 2014; 102:435–9. [PubMed: 24951366]

145. Zhao, Y. In vitro fertilization: Four decades of reflections and promises / Y. Zhao, P. Brezina, C.C. Hsu [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – Vol. 1810. – P. 843-852.