

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И. М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Хачатрян Лия Варужановна

**Оптимизация программ вспомогательных репродуктивных технологий
у пациенток позднего репродуктивного возраста с помощью
культивирования эмбрионов в среде с пониженным лактатом**

3.1.4. Акушерство и гинекология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Смольникова Вероника Юрьевна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Медико-социальные проблемы бесплодия в позднем репродуктивном возрасте.....	14
1.2. Оценка репродуктивного потенциала у пациенток позднего репродуктивного возраста	16
1.3. Значение хромосомных аномалий в исходах программ вспомогательных репродуктивных технологий	22
1.4. Молекулярные механизмы старения яичников	25
1.5. Особенности энергетического метаболизма ооцитов	32
1.6. Современные подходы к эмбриональному этапу программ вспомогательных репродуктивных технологий	34
1.7. Роль преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на анеуплоидии	37
1.8. Особенности ранних этапов эмбрионального развития. Роль лактата.....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
2.1. Материал и дизайн исследования	45
2.2. Методы исследования	49
2.2.1. Общеклинические методы исследования.....	49
2.2.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза.....	50
2.2.3. Гормональное исследование.....	51
2.2.4. Исследование параметров эякулята.....	52
2.2.5. Протокол овариальной стимуляции и проведение трансвагинальной пункции фолликулов яичников	53
2.2.6. Морфологическая оценка ооцитов и анализ результатов оплодотворения..	54
2.2.7. Особенности эмбриологического этапа при культивировании эмбрионов в различных средах.....	55
2.2.8. Морфологическая оценка эмбрионов на 5-е сутки культивирования.....	56

2.2.9. Перенос эмбрионов в полость матки. Особенности ведения пострансферного периода	58
2.2.10. Диагностика наступления беременности и анализ ее исходов	58
2.2.11. Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии	59
2.2.12. Статистический анализ полученных данных.....	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	61
3.1. Результаты ретроспективного этапа исследования с включением женщин позднего репродуктивного возраста	62
3.1.1. Клинико-anamнестическая характеристика, включенных в исследование пациенток возрастной группы 35–39 лет	62
3.1.2. Клинико-anamнестическая характеристика включенных в исследование пациенток возрастной группы 40–42 лет	71
3.1.3. Результаты клинического и эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин возрастной группы 35–39 лет	79
3.1.4. Результаты клинического и эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин возрастной группы 40–42 лет	80
3.1.5. Сравнительный анализ соматического и гинекологического анамнеза, частоты оперативных вмешательств, параметров овариального резерва и результатов эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у женщин 35–39 и 40–42 лет.....	81
3.1.6. Исходы программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин возрастной группы 35–39 лет.....	84
3.1.7. Исходы программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин возрастной группы 40–42 лет.....	85

3.2. Результаты проспективного этапа исследования	86
3.2.1. Клинико-anamнестическая характеристика пациенток, участвующих в проспективном этапе исследования.....	87
3.2.2. Результаты клинического и эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин, участвующих в проспективном этапе исследования.....	95
3.2.3. Исходы программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин, участвующих в проспективном этапе исследования	99
3.2.4. Корреляционный анализ параметров эмбриологического этапа с параметрами овариальной стимуляции и исходами программ вспомогательных репродуктивных технологий у женщин позднего репродуктивного возраста	102
3.2.5. Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии	103
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
ВЫВОДЫ	122
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	127
Приложение А. Алгоритм выбора среды для культивирования эмбрионов у пациенток позднего репродуктивного возраста	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В современном здравоохранении бесплодие относится к числу наиболее значимых нарушений репродуктивного здоровья, сопровождающихся выраженными социальными и клиническими последствиями [1, 2, 3]. По сведениям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), примерно каждый шестой человек репродуктивного возраста сталкивается с нарушением фертильности [4]. При этом, согласно последним эпидемиологическим исследованиям, наиболее высокая частота бесплодия отмечается в позднем репродуктивном возрасте женщины [3]. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) получили широкое распространение в качестве наиболее эффективного метода решения проблемы бесплодного брака [5, 6, 7, 8, 9]. Несмотря на активную разработку и внедрение новых технологий, частота наступления беременности и живорождения в программах ВРТ составляет 25–32% [10]. Кроме того, пациентки позднего репродуктивного возраста, в связи с биологическим старением и снижением овариального резерва, а также наличием отягощенного анамнеза, наиболее часто сталкиваются с неудачами при применении программ ВРТ [11, 12, 13, 14].

Сбалансированное и синхронное взаимодействие между функционально полноценным эмбрионом и рецептивным эндометрием является одним из ключевых факторов успешного результата лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Имплантация эмбриона представляет собой сложный многоэтапный процесс, который является результатом прямой или опосредованной связи между клеточными и молекулярными факторами [15, 16, 17]. При этом обеспечение благоприятных условий раннего эмбрионального развития является одним из ключевых аспектов успеха программ ЭКО, в связи с этим в настоящее время перспективным является применение специальных сред с различными

метаболитами, которые способны обеспечить оптимальные условия культивирования для получения эмбрионов лучшего морфологического качества. С целью улучшения результатов ВРТ предпринимались попытки применения культуральных сред с различными составами, начиная от простых солевых растворов и заканчивая сложными средами для тканевых культур с добавлением различных метаболитов [18, 19, 20].

Внимание исследователей в последние несколько лет обращено на оценку роли лактата в регуляции метаболических процессов на этапе раннего эмбрионального развития. С момента оплодотворения наблюдаются процессы, направленные на удовлетворение меняющихся энергетических потребностей эмбриона, которые сопровождаются изменением концентрации различных метаболитов, в том числе лактата [21]. При этом лактат выступает в качестве важной сигнальной молекулы, участвует в процессах инвазии, ангиогенеза и иммунной модуляции, тем самым способствуя улучшению восприимчивости эндометрия и имплантации эмбриона [22, 23, 24]. Особого внимания заслуживают исследования, в которых показана роль лактата в раннем эмбриогенезе. Согласно исследованиям, низкие концентрации лактата могут повысить энергетический метаболизм кумулюсных клеток, обеспечить достаточное количество аденозинтрифосфата (АТФ) на ранних этапах эмбрионального развития и, тем самым, повысить частоту наступления беременности [25].

Таким образом, в современных условиях заслуживает внимания тактика эмбрионального культивирования в средах со сниженным содержанием лактата, что особенно значимо для группы женщин позднего репродуктивного возраста, у которых отмечаются более высокие показатели метаболического стресса на клеточном уровне.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время имеется большое количество исследований, посвященных модификации прегравидарной подготовки или протоколов

овариальной стимуляции у пациенток позднего репродуктивного возраста для повышения эффективности программ ЭКО. Однако, с учетом высокой частоты остановки эмбрионального развития и малого количества доступных для переноса бластоцист высокого качества у данной когорты женщин, перспективным направлением для исследований является оптимизация этапа культивирования эмбрионов [12, 13]. Изменение состава культуральной среды может способствовать формированию компетентных бластоцист из эмбрионов с исходно более низким потенциалом к развитию ввиду особенностей энергетического метаболизма. Известно, что снижение концентрации лактата в культуральной среде способствует повышению степени экспансии бластоцист и положительно влияет на частоту наступления беременности [23, 25]. Однако в настоящее время отсутствуют работы, посвященные изучению возможности применения среды культивирования с пониженным содержанием лактата у пациенток различных возрастных групп [22]. Поскольку женщины позднего репродуктивного возраста относятся к группе с наиболее низкой эффективностью ВРТ, исследования применения низколактатной культуральной среды в этой возрастной когорте могут позволить индивидуализировать эмбриональный этап для повышения успешности ЭКО.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Улучшение репродуктивных исходов программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у женщин позднего репродуктивного возраста с помощью оптимизации эмбриологического этапа и дифференцированного подхода к выбору культуральных сред.

Задачи исследования:

1. Проанализировать клинико-anamнестические данные пациенток позднего репродуктивного возраста, проходящих лечение бесплодия с помощью ВРТ.

2. Проанализировать особенности фолликуло- и оогенеза у пациенток позднего репродуктивного возраста, проходящих лечение бесплодия с помощью ВРТ.

3. Оценить течение раннего эмбриогенеза у пациенток позднего репродуктивного возраста при культивировании эмбрионов в классической среде и среде с пониженным лактатом.

4. Провести сравнительный анализ эффективности программ лечения бесплодия (частота имплантации, наступления клинической беременности, живорождения) при культивировании в классической среде и среде с пониженным лактатом.

5. Провести сравнительный анализ результатов преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А) эмбрионов при их культивировании в классической среде и среде с пониженным лактатом.

6. Разработать практические рекомендации по персонализированному подходу к эмбриологическому этапу программ лечения бесплодия методами ВРТ.

Научная новизна

Получены данные об особенностях раннего эмбрионального развития в среде с пониженной концентрацией лактата, соответствующей физиологическим значениям на стадии дробления, у пациенток позднего репродуктивного возраста.

Установлена нецелесообразность применения культуральной среды с низким содержанием лактата у пациенток возрастной когорты 35–39 лет с целью улучшения параметров эмбриологического этапа и клинических результатов программ ЭКО.

Обосновано применение культуральной среды с низким содержанием лактата у пациенток в возрасте 40–42 лет для обеспечения адекватного энергетического метаболизма эмбрионов с целью улучшения параметров эмбриогенеза и клинических результатов программ ЭКО.

Изучено влияние различных концентраций лактата в культуральной среде на эуплоидный статус эмбрионов.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведенного исследования показаны статистически значимые различия в исходах ВРТ в зависимости от возраста женщин. Определена целесообразность выбора среды культивирования с пониженным содержанием лактата для пациенток позднего репродуктивного возраста старше 40 лет.

На основании полученных данных об особенностях эмбриологического этапа и их сопоставлении с исходами лечения был разработан персонализированный клинический алгоритм программ ВРТ у женщин в зависимости от возраста и метода культивирования, а именно классического культивирования и культивирования в среде с пониженным содержанием лактата.

Методология и методы исследования

Научная работа выполнена на базе отделения ВРТ в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова (руководитель отделения – д.м.н., проф. Калинина Е.А.) Института репродуктивной медицины (директор – д.м.н., проф. Назаренко Т.А.) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН Сухих Г.Т.) в период с 2022 по 2025 гг.

На первом этапе было проведено ретроспективное исследование, в которое вошли 200 супружеских пар с возрастом женщин от 35 до 39 лет и 140 супружеских пар с возрастом женщин от 40 до 42 лет, которые проходили лечение бесплодия с применением методов ВРТ с 2020 по 2022 годы. В зависимости от среды культивирования эмбрионов группа женщин 35–39 лет была разделена на две подгруппы: подгруппа 1 (n=115) – среда культивирования эмбрионов

с пониженным содержанием лактата CSCM-NX («Фуджифильм Ирвайн Сайнтифик, Инк.», США); подгруппа 2 (n=85) – одноэтапная классическая среда G-TL («Витролайф», Швеция). Группа женщин в возрасте 40–42 лет – подгруппа 1 (n=70) – культуральная среда с пониженным содержанием лактата CSCM-NX; подгруппа 2 (n=70) – классическая среда G-TL. Конечными точками служили медианы и частоты клинико-анамнестических данных, показателей лабораторного обследования, параметров овариальной стимуляции и эмбриологического этапа, а также результаты исходов программ ЭКО.

На втором этапе проведено проспективное исследование, включившее 520 супружеских пар с возрастом женщин от 40 до 42 лет, которые проходили лечение бесплодия в период с 2022 по 2024 годы. Данная когорта случайным образом была также разделена на две подгруппы: подгруппа 1 (n=264) – культуральная среда с пониженным содержанием лактата CSCM-NX; подгруппа 2 (n=256) – одноэтапная классическая культуральная среда G-TL [22]. Конечными точками данного этапа работы являлись следующие параметры: медианы и частоты клинико-анамнестических данных, медианы лабораторных показателей, медианы и частоты параметров овариальной стимуляции и эмбрионального этапа, данных о плоидном статусе бластоцист, а также клинические результаты эффективности программ ЭКО.

Супружеские пары, включенные в исследование, прошли полное обследование согласно приказу МЗ РФ №803н от 31 июля 2020 года и клиническим рекомендациям МЗ РФ «Женское бесплодие». Специальным методом исследования являлось преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии (ПГТ-А).

Для статистической обработки результатов применялись программы Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics v. 27.0.1.0. Примененные методы статистической обработки соответствовали типу исследуемых данных.

Положения, выносимые на защиту

1. У пациенток 40–42 лет частота соматических и гинекологических заболеваний не превышает показатели, выявленные в возрастной группе 35–39 лет. При переходе пациенток в возрастную когорту 40–42 лет характерно значительное снижение уровня АМГ и количества антральных фолликулов, что сопряжено с уменьшением числа зрелых ооцитов, зигот, бластоцист и частоты живорождения в программах ВРТ.

2. У женщин 35–39 лет культивирование эмбрионов в среде с пониженным лактатом не приводит к изменению показателей эмбриологического этапа, частоты наступления клинической беременности и живорождения в программах ВРТ по сравнению с культивированием в классической среде.

3. У женщин позднего репродуктивного возраста 40–42 лет культивирование эмбрионов в среде с пониженным лактатом достоверно повышает частоту бластуляции и число бластоцист «отличного» и «хорошего» качества, приводит к двукратному снижению частоты отмены переноса эмбриона по причине остановки его в развитии, а также увеличивает частоту наступления клинической беременности в расчете на перенос эмбриона с 12% до 28% и живорождения в расчете на перенос эмбриона с 7% до 14% по сравнению с культивированием в классической среде.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация в полном объеме соответствует паспорту научной специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология, а именно пунктам 1, 4, 5: пункт 1 «Исследования по изучению эпидемиологии, этиологии, патогенеза гинекологических заболеваний»; пункт 4 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики осложненного течения беременности и родов, гинекологических заболеваний»; пункт 5 «Экспериментальная и клиническая разработка методов оздоровления женщины

в различные периоды жизни, вне и во время беременности и внедрение их в клиническую практику».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечена использованием надлежащей системы построения теоретической и практической деятельности, использованием современных методов исследования и проведением статистического анализа в соответствии с общепринятыми правилами обработки данных.

Результаты и положения научной работы доложены на заседании апробационной комиссии на кафедре акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол №5 от 15.05.2026).

Личный вклад автора

Автором определены тематика, основное направление, цель и задачи научной работы. На всех этапах лечения бесплодия с применением вспомогательных репродуктивных технологий соискатель осуществляла отбор пациентов и формирование клинической выборки, а также участвовала в пополнении базы данных, содержащей клинико-anamnestические, лабораторные показатели, параметры овариальной стимуляции и эмбриологического этапа. Самостоятельно автором выполнены статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 6 работ, в том числе 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных

изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 иная публикация по результатам исследования, 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанные на основании исследования подходы внедрены и применяются в клинической практике при оказании специализированной медицинской помощи в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Леонова Б.В. (руководитель отделения – доктор медицинских наук, профессор Калинина Е.А.) Института репродуктивной медицины (директор – доктор медицинских наук, профессор Назаренко Т.А.) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, профессор, доктор медицинских наук Сухих Г.Т.).

Структура и объем диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с традиционной академической структурой и изложена на 155 страницах. Структурно состоит из обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, заключения, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 38 таблицами и 10 рисунками. Библиографический список литературы включает 21 отечественный и 225 зарубежных источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Медико-социальные проблемы бесплодия в позднем репродуктивном возрасте

Бесплодный брак представляет собой актуальную проблему во всем мире, затрагивающую как социальные, так и медицинские аспекты. Согласно опубликованным Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) данным в мире примерно каждый шестой человек репродуктивного возраста страдает от бесплодия, при этом данные показатели являются сопоставимыми в разных регионах [4]. Так, в странах со средним и низким уровнем дохода распространенность бесплодия составляет 16,5%, тогда как в странах с высоким уровнем – 17,8% [4]. Данные тенденции диктуют необходимость оптимизации подходов к лечению бесплодия с помощью ВРТ [5]. Кроме того, под воздействием социально-экономических изменений в последние десятилетия сдвиг возрастной структуры материнства выражается в неуклонном увеличении доли женщин позднего репродуктивного возраста, что представляет собой сложную клиническую задачу для специалистов в области репродуктивной медицины [1, 5, 22, 26]. Так, в настоящее время отмечается значимая тенденция к росту женского бесплодия во всем мире, особенно в регионах с высоким уровнем дохода [27, 28]. Помимо экономического бремени, бесплодный брак может иметь выраженные негативные общественные и психологические последствия для супружеских пар, нарушая семейную адаптацию и общее функционирование личности в обществе [29, 30].

В современном обществе проблема отложенного материнства становится более заметной не только в связи с изменением социальных условий, но и ложными представлениями о возможностях ВРТ. В общемировой клинической практике в настоящее время существует большая проблема, связанная с отсутствием руководств консультирования пациенток по вопросам репродуктивного старения. Это подчеркивает необходимость разработки новых протоколов информирования

пациентов в отношении репродуктивного выбора [31]. Поскольку возрастное снижение женской фертильности является результатом сложного взаимодействия множества биологических факторов, которое может приводить к неудачам на разных этапах проведения программ ВРТ, вопрос оптимизации подхода к лечению бесплодия у данной возрастной группы остается значимым и требует дальнейшего развития. Женщины позднего репродуктивного возраста являются наиболее сложной когортой пациентов, требующей зачастую мультидисциплинарного подхода для решения многочисленных клинических задач. Известно, что стойкое снижение фертильности у женщин наблюдается уже после 35 лет, а вероятность живорождения резко уменьшается после 40 лет. В исследовании Gu F и соавторов у пациенток в возрасте от 35 до 40 лет кумулятивная частота живорождения варьировала от 62 до 72% при проведении четырех циклов ВРТ [32]. Стоит отметить, что пропорционально возрасту увеличивается частота соматических и гинекологических заболеваний, ведущих не только к бесплодию, но и осложнениям периода беременности. Так, беременность, наступившая в программе ЭКО у пациенток старше 40 лет, сопряжена с высокими рисками перинатальных осложнений [33, 34].

В отчете Российской Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ) от 2022 года показано негативное воздействие возрастного фактора на результаты программ ВРТ [35]. В группе женщин позднего репродуктивного возраста от 35 до 39 лет частота наступления беременности в расчете на трансвагинальную пункцию фолликулов яичников (ТВП) после ЭКО составила 20,6%, после ИКСИ – 19,7%. Согласно представленным данным после 40 лет наблюдалось значительное снижение частоты наступления беременности, которая в результате ЭКО составила 9,9%, а после ИКСИ – 9,0% [35].

Таким образом, низкая эффективность программ ВРТ у женщин позднего репродуктивного возраста служит основанием для их совершенствования. Поскольку ведущей причиной неудач является биологическое старение яичников, в современных условиях оптимальным подходом к решению данной проблемы

является оптимизация протоколов овариальной стимуляции и эмбрионального этапа.

1.2. Оценка репродуктивного потенциала у пациенток позднего репродуктивного возраста

Оценка репродуктивного потенциала имеет ведущее прогностическое значение для оптимизации лечения бесплодия, особенно для супружеских пар старшей возрастной группы. При этом индивидуализация протоколов овариальной стимуляции основывается на данных об овариальном резерве, определение которого является приоритетным диагностическим этапом. В настоящее время с целью оценки овариального резерва широко применяются такие лабораторные показатели, как уровень антимюллерова гормона (АМГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), а также проведение ультразвукового исследования органов малого таза с подсчетом количества антральных фолликулов (КАФ). Тем не менее, исследования по оптимизации протоколов с поиском лучших маркеров для улучшения результатов ВРТ не теряют актуальности.

С момента открытия АМГ в 1947 году понимание его клинической значимости постепенно расширялось, достигнув в настоящее время значения маркера, который отражает овариальный резерв. Являясь пептидом из суперсемейства трансформирующего фактора роста бета, АМГ имеет множество биологических значений, которые реализуются через схожие с ВМР-сигнальные пути (сигнальные пути костного морфогенетического белка), что обеспечивает нормальное функционирование репродуктивной системы [36]. Как известно, уже с 23-ей недели гестации гранулезные клетки плода синтезируют АМГ, при этом его уровень достигает максимальных значений в фертильном возрасте женщины [37]. В процессе фолликулогенеза секретируемый клетками гранулезы АМГ останавливает созревание дополнительных примордиальных фолликулов до мейоза II, действуя как отрицательный паракринный фактор [38]. Впервые оценка АМГ в качестве маркера овариального резерва в программах ВРТ была

проведена Seifer DB и соавторами в 2002 году, которые обнаружили, что более высокие значения АМГ связаны с лучшими исходами овариальной стимуляции [39]. Позднее в сравнительных исследованиях прогностической значимости различных маркеров овариального резерва была обнаружена сопоставимая эффективность между уровнем АМГ и количеством антральных фолликулов. Так, согласно данным систематического обзора и мета-анализа, опубликованного в 2023 году Liu Y и соавторами, прогностическая ценность обоих изучаемых показателей в отношении ответа яичников на стимуляцию в циклах ЭКО была признана высокой [40]. В то же время более позднее исследование, проведенное на группе пациенток молодого возраста, продемонстрировало, что концентрация сывороточного АМГ является наиболее сильным предиктором числа полученных ооцитов после овариальной стимуляции, превосходя по значимости такие критерии, как КАФ и возраст [41, 42]. Кроме того, актуальным направлением современных исследований является оценка клинической значимости АМГ, которая не ограничивается прогнозированием числа получаемых ооцитов, но также их качества в циклах ВРТ. Borges E и соавторы в своем исследовании получили положительную корреляционную связь между уровнем АМГ и качеством полученных ооцитов ($p\text{-value}<0,001$), частотой имплантации ($p\text{-value}<0,05$) и наступления беременности ($p\text{-value}<0,001$) [43]. В настоящее время особый интерес представляет клиническая ценность АМГ как прогностического фактора не только исходов программ ЭКО, но и вероятности спонтанного наступления беременности. В систематическом обзоре и мета-анализе 2023 года Peigné M и соавторы показали, что уровень АМГ не является предиктором спонтанной беременности [44]. В настоящее время вопрос об информативности АМГ у женщин позднего репродуктивного возраста остается дискуссионным.

Изучение клинических исходов лечения бесплодия с применением методов ВРТ, проведенное Zhang B и соавторами, показало более высокую частоту клинической беременности (58,01% против 49,44%, $p\text{-value}<0,01$) и живорождения (48,52% против 37,45% $p\text{-value}<0,01$) у женщин моложе 35 лет с низким уровнем АМГ ($\leq 1,32$ нг/мл) по сравнению с пациентками старше 35 лет с высокими

значениями АМГ ($\geq 2,41$ нг/мл) [45]. В 2020 году Dai X и соавторами была показана ограниченная ценность АМГ в прогнозировании эмбрионального развития *in vitro* и отсутствие значимости в частоте живорождения у женщин позднего репродуктивного возраста, что обосновывает клиническую целесообразность накопления эмбрионов «хорошего» качества путем проведения повторных циклов овариальной стимуляции в данной возрастной группе [46]. Позднее, в исследовании 2023 года, представлявшем собой систематический обзор и мета-анализ, была установлена положительная взаимосвязь у женщин позднего репродуктивного возраста между уровнем АМГ и частотой живорождения [47]. При этом была выявлена низкая прогностическая значимость уровня АМГ в отношении живорождения в группе пациенток молодого возраста [47].

В связи с высокой меж- и внутрицикловой вариабельностью ФСГ представляет собой менее специфичный показатель овариального резерва. Тем не менее, определение базального уровня ФСГ является наиболее точным маркером качества ооцитов у женщин моложе 35 лет, в то время как уровень АМГ служит лучшим предиктором ответа яичников на овариальную стимуляцию в когорте старше 35 лет [48]. Результаты ретроспективного исследования Ligon S и соавторов показали более низкую частоту живорождения из расчета на один цикл овариальной стимуляции у женщин со сниженным уровнем АМГ при нормальных значениях ФСГ по сравнению с группой пациенток с повышенным уровнем ФСГ и нормальными показателями АМГ (26% против 39%), на основании чего авторами был сделан вывод о высокой предиктивной ценности АМГ [49]. В исследовании Cierpela P и соавторов, в котором проводилось определение уровня данных гормонов в фолликулярной жидкости, была показана положительная корреляционная связь между количеством бластоцист и частотой живорождения с уровнем фолликулярного АМГ [50]. При этом данные показатели были ниже при более высоких значениях ФСГ в фолликулярной жидкости [50]. Авторы показали, что определение концентрации АМГ в фолликулярной жидкости имеет более высокую ценность в отношении прогнозирования живорождения по сравнению с определением уровня гормона в сыворотке крови [50]. Позднее Miller SM

и соавторы при исследовании когорты пациенток с нормальным уровнем АМГ продемонстрировали значимое снижение количества полученных ооцитов и бластоцист в программах ЭКО у женщин с высоким уровнем ФСГ (≥ 10 МЕ/л) по сравнению с группой пациенток с нормальным показателем ФСГ [51]. При этом частота наступления беременности и частота родов живым плодом не зависели от уровня ФСГ [51].

Проблемой истощения фолликулярного пула является не только уменьшение количества получаемых ооцитов в циклах ЭКО, но и ухудшение их качества, что связано с реализацией механизмов биологического овариального старения [52]. Однако в случае низкого овариального резерва результаты исследований по исходам ВРТ остаются противоречивыми. Tarasconi В и соавторы опубликовали исследование зависимости исходов ВРТ от уровня АМГ у женщин старше 33 лет [53]. Было показано двукратное повышение риска самопроизвольного выкидыша после переноса эмбриона при уровне АМГ $\leq 1,60$ нг/мл по сравнению с группой, где показатель АМГ был выше 5,60 нг/мл [53].

Наиболее важным прогностическим критерием благоприятных исходов ВРТ остается возраст женщины, что в первую очередь связано с реализацией механизмов биологического старения, борьба с которым в настоящее время остается непреодолимой клинической задачей. Так, в исследовании Morin SJ и соавторов у женщин моложе 38 лет со сниженным овариальным резервом (АМГ менее 0,5 нг/мл) частота показателей бластуляции и живорождения в расчете на перенос эуплоидного эмбриона была эквивалентной показателям у женщин с нормальным овариальным резервом [54]. При возрасте женщин старше 42 лет наблюдается отсутствие взаимосвязи между показателями овариального резерва и живорождения [55]. В исследовании Fernandez AM и соавторов показано, что даже при нормальных показателях ФСГ и АМГ кумулятивная частота живорождения остается крайне низкой [56].

«Бедный» овариальный ответ представляет собой сложную клиническую проблему, которая затрагивает пациенток всех возрастных групп, с распространенностью, по данным различных исследований, от 9 до 24% [57, 58].

Поскольку небольшое количество полученных при овариальной стимуляции ооцитов ассоциировано с худшими исходами программ ВРТ, данное клиническое состояние требует совершенствования подходов, в особенности у наиболее уязвимых когорт пациентов, в том числе женщин позднего репродуктивного возраста. Polanski L и соавторы изучили влияние возраста и количества аспирированных при ТВП ооцитов на кумулятивный показатель живорождения у пациенток с «бедным» ответом яичников и получили данные, согласно которым после учета таких факторов как возраст, исходный уровень ФСГ, протокол лечения и суточная доза гонадотропинов (Гн) наблюдалось значительное увеличение кумулятивной частоты живорождения для двух (ОР 2,63, 95 % ДИ 1,43–4,81), трех (ОР 3,74, 95 % ДИ 2,09–6,68) и четырех (ОР 5,3, 95 % ДИ 3,01–9,35) ооцитов по сравнению с получением лишь одного [58]. В данном исследовании была проведена оценка роли возраста как независимого фактора исходов ВРТ, которая показала, что у женщин старше 43–45 лет вне зависимости от результатов овариальной стимуляции шансы на живорождение остаются самыми низкими [58]. Тем не менее, получение даже одного дополнительного ооцита было связано с увеличением кумулятивной частоты живорождения вне зависимости от возраста [58].

В настоящее время прогнозирование «бедного» ответа яичников проводится по двум общепринятым критериям – Болонские критерии и критерии POSEIDON (Patient-Oriented Strategies compassing Individualized Oocyte Number – ориентированные на пациента стратегии, охватывающие индивидуальное количество ооцитов). Впервые с целью создания универсального определения «бедного» овариального ответа были внедрены Болонские критерии [59]. Согласно им для определения «бедного» ответа яичников используются следующие показатели: поздний репродуктивный возраст женщины (≥ 40 лет), слабый ответ яичников после проведения стимуляции в анамнезе (≤ 3 ооцитов), сниженный овариальный резерв по лабораторным данным (АМГ $< 1,1$ нг/мл) и результатам ультразвукового исследования (КАФ < 7). Для прогнозирования «бедного» ответа достаточно наличия двух критериев из вышеперечисленных. Ху В и соавторы

в ретроспективном исследовании, в которое вошла 3391 женщина с «бедным» ответом яичников согласно Болонским критериям, получили данные о значительном снижении кумулятивной частоты живорождения у женщин позднего репродуктивного возраста старше ≥ 38 лет. Так, в группе 41–43 лет кумулятивная частота живорождения составила 10,5%, в группе 38–40 лет – 13,5%, в то время как для женщин в возрасте 31–34 лет этот показатель достиг 18,3% [61]. В исследовании Yang Y и соавторов показана прямая зависимость кумулятивной частоты живорождения при «бедном» ответе яичников от возраста: 48,0% в возрастной группе < 35 лет против 16,9% в группе ≥ 40 лет [62]. В настоящее время клиническая роль Болонских критериев представляется менее значимой в связи с большой гетерогенностью пациенток с предполагаемым «бедным» ответом, которые требуют различных терапевтических подходов [59].

Для персонификации подходов к ведению женщин с «бедным» овариальным ответом были разработаны критерии POSEIDON, согласно которым проводится стратификация пациенток на четыре группы в соответствии с возрастом, параметрами овариального резерва, количеством полученных ооцитов в предыдущих циклах овариальной стимуляции [41, 60]. Данные критерии позволяют разделять женщин на две категории: с непрогнозируемым «плохим ответом» (1 и 2 группы) и с прогнозируемым «плохим ответом» (3 и 4 группы); в первых двух группах отмечаются нормальные показатели овариального резерва, при этом в группе 1 возраст женщин составляет < 35 лет, в группе 2 ≥ 35 лет, в зависимости от количества полученных ооцитов в предыдущих циклах стимуляции проводится разделение на две подгруппы а и б: < 4 и 4–9 ооцитов соответственно [41]. Для групп 3 и 4 характерны пониженные параметры фолликулярного запаса: концентрация АМГ менее 1,2 нг/мл, а КАФ менее 5; возрастное разделение при этом таково: в третью группу входят женщины до 35 лет, в четвертую – от 35 лет и старше. У пациенток из групп 1 и 2 наблюдаются более благоприятные результаты программ ВРТ по сравнению с группами 3 и 4, что в первую очередь связано с овариальным резервом. Патогенетической причиной «плохого» ответа яичников в программах ВРТ для всех групп

POSEIDON является снижение количества фолликулов, способных ответить на овариальную стимуляцию [63]. Уменьшение количества фолликулов в первую очередь связано с биологическим старением, однако, существенный вклад вносят факторы окружающей среды, аутоиммунные патологические процессы, сопутствующие гинекологические заболевания, ятрогенные вмешательства. У женщин с сохранным овариальным резервом групп 1 и 2 отсутствие адекватного ответа на стимуляцию может быть связано с повышением резистентности яичников к экзогенным Гн [64]. Важно отметить, что риск анеуплоидий увеличивается с каждой последующей группой по классификации POSEIDON [65]. Несмотря на то, что обе классификации являются важными клиническими инструментами, которые позволяют оптимизировать терапевтические подходы с учетом гетерогенности пациенток с бесплодием, в настоящее время потребность в совершенствовании данных систем не теряет актуальности. Результаты последних исследований подчеркивают первостепенную важность возраста как наиболее точного предиктора успеха программ ВРТ.

Таким образом, поздний репродуктивный возраст женщины является немодифицируемым фактором неблагоприятных исходов программ ЭКО и представляет собой значительную проблему для специалистов области репродуктивной медицины. В настоящее время перспективными направлениями для исследований у данной когорты пациенток является разработка персонифицированных протоколов овариальной стимуляции и модификация эмбрионального этапа, что требует изучения молекулярных основ биологического старения яичников и особенностей раннего эмбриогенеза, в частности, преимплантационного развития.

1.3. Значение хромосомных аномалий в исходах программ вспомогательных репродуктивных технологий

Генез бесплодия в позднем репродуктивном возрасте сложен, поскольку в него зачастую вовлечены не только физиологические процессы естественного

снижения овариального резерва, но и различные механизмы, приводящие к геномным нарушениям в ооцитах [66]. Поэтому одной из наиболее распространенных проблем в позднем репродуктивном возрасте является повышение частоты хромосомных аномалий эмбриона. Показано, что если в возрасте женщины до 35 лет частота анеуплоидий составляет 53%, то уже в 41–42 года – 86%, а после 42 лет – 93%. [67]. В исследовании Franasiak JM и соавторов было показано влияние возраста на частоту хромосомных патологий [68]. Так, если в возрастной когорте 26–30 лет анеуплоидии были связаны в 71% с ошибкой в одной хромосоме, то в возрасте старше 43 лет этот показатель составил всего 32% [68]. Исследование показало, что с увеличением материнского возраста повышается частота выявления анеуплоидий, связанных с изменениями более чем в одной хромосоме, что приводит к сложным хромосомным нарушениям [68]. Важные с клинической точки зрения результаты были получены Vaiarelli A и соавторами, согласно которым для получения одного эмбриона с нормальным хромосомным набором в возрасте 35–37 лет требуется забор 5 ооцитов, то уже после 42 лет – более 20 [69]. Около 70% случаев беременностей и живорождений, связанных с трисомией 21 хромосомы, возникают в результате ошибок, происходящих во время мейотического деления ооцита у женщин [70]. В программах ВРТ возраст мужчины не оказывает настолько существенного влияния на частоту формирования эмбрионов с хромосомными нарушениями. В ретроспективном исследовании Bonus ML и соавторов было проведено преимплантационное генетическое тестирование 1720 эмбрионов, согласно которому статистически значимая разница в частоте полученных анеуплоидных эмбрионов между группами с отцовским возрастом <50 и ≥ 50 лет отсутствует [71]. Образование гамет происходит в результате мейоза, который имеет решающее значение для стабильности хромосомного набора и обеспечения генетического разнообразия. Показано, что наибольший вклад в хромосомные аномалии вносит aberrантный мейоз на различных стадиях созревания ооцитов, когда наблюдается активное клеточное деление и реструктурирование генетического материала [72]. При этом развитие анеуплоидий является результатом накопления поврежденной

дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), эпигенетических изменений хроматина, митохондриальной дисфункции, нарушений формирования веретена деления, преждевременного разделения или нерасхождения гомологичных хромосом или сестринских хроматид, увеличение частоты которых наблюдается после 35 лет [72, 73, 74]. Ошибки сегрегации наиболее часто возникают во время первого мейотического деления, что связано с реализацией сложных патогенетических процессов, которые регулируются рядом белков. Одним из наиболее изученных маркеров овариального старения являются белки когезины, которые обеспечивают сплоченность хроматид до вступления в мейоз II [75, 76]. С увеличением возраста наблюдается усиление деградации когезина, что приводит к неправильному расхождению хромосом и нарастанию хромосомных отклонений [70, 77]. Кроме того, в позднем репродуктивном возрасте наблюдается дефицит белков-защитников когезина – шугошина 2 (SGO2), что приводит к снижению сцепления сестринских хроматид [78]. Также известно, что нарушению формирования веретена деления способствует усиление окислительного стресса [79].

Ключевую роль в обеспечении энергетическими субстратами эмбриона на ранних стадиях развития выполняют митохондрии, полученные от ооцита [80]. В связи с этим потенциал развития эмбриона и его имплантационные способности напрямую связаны с количеством копий митохондриальной ДНК (мтДНК) [41, 81]. В позднем репродуктивном возрасте токсическое воздействие агентов окислительного стресса приводит к нарушению механизмов восстановления поврежденных мтДНК в ооцитах, что негативно влияет на ранний эмбриогенез [41, 82, 83, 84].

На всех этапах дробления эмбриона могут возникать ошибки, которые негативно отражаются на его качестве, способности к имплантации и дальнейшем развитии. На ранних стадиях эмбриогенеза наиболее часто встречающимися ошибками, помимо аномалий сегрегации хромосом, являются нарушения цитокинеза. Асимметричный цитокинез, приводящий к образованию бластомеров различного размера, может негативно влиять на имплантационные способности эмбриона [85]. На стадии компактизации клеток могут возникать нарушения,

выражающиеся либо в полном сбое уплотнения клеток, либо в менее серьезных дефектах, которые приводят к неравномерному или частичному уплотнению морулы. При этом происходит потеря одного или нескольких бластомеров, что в конечном счете приводит к нарушениям эмбриогенеза и имплантации [86]. Так, в ретроспективном исследовании Lagalla С и соавторов было предложено рассматривать неравномерное уплотнение как возможный механизм самокоррекции, обеспечивающий исключение дефектных анеуплоидных клеток из мозаичных эмбрионов [87]. Негативное воздействие возраста на процессы формирования бластоцисты показано в исследовании Ezoe К и соавторов [88]. Было выявлено нарушение регуляции клеточной полярности, значительное ухудшение морфологических характеристик внутренней клеточной массы и трофэктодермы у женщин старше 42 лет по сравнению с возрастной группой моложе 35 лет [88].

Таким образом, в позднем репродуктивном возрасте наблюдается повышение частоты повреждений ДНК и нарушений митохондриальной функции, что приводит к развитию анеуплоидий. Помимо этого, значительный вклад в снижение жизнеспособности и имплантационного потенциала эмбриона вносит процесс асимметричного цитокинеза у данной возрастной когорты женщин. Учитывая отсутствие в настоящее время эффективной стратегии, направленной на устранение патологических механизмов возрастного снижения компетентности ооцитов, оптимальной тактикой ведения пациенток позднего репродуктивного возраста является усовершенствование протоколов овариальной стимуляции с целью получения большего количества ооцитов, а значит, и повышения шанса на получение эуплоидных эмбрионов.

1.4. Молекулярные механизмы старения яичников

В настоящее время знания о клеточных и молекулярных механизмах старения яичников ввиду их сложности ограничены, однако их изучение может лечь в основу разработки новых стратегий поддержки репродуктивного здоровья.

Если при физиологическом старении яичников происходит естественное угасание их функции, то при патологическом наблюдается сложное взаимодействие различных экзогенных и эндогенных факторов, которое приводит к нарушениям фолликулогенеза, снижению овариального резерва и способности ооцитов к оплодотворению [14]. К патологическим состояниям относят преждевременную недостаточность яичников, а также ятрогенные факторы снижения овариального резерва, которые приводят к «бедному ответу» яичников на стимуляцию их функции в программах ВРТ. Старение яичников характеризуется постепенным и необратимым снижением не только количества, но и, безусловно, качества ооцитов, что увеличивает частоту хромосомных аномалий и спонтанных генетических мутаций в позднем репродуктивном возрасте и является препятствием для получения эуплоидного эмбриона в программах ВРТ [89].

Старение клетки является процессом необратимого завершения ее жизненного цикла под воздействием многочисленных факторов, которые подавляют пролиферацию [90]. В настоящее время при старении яичников выявлены маркеры провоспалительного стресса, двуцепочечные разрывы ДНК, изменение активности факторов транскрипции и сигнальных путей, а также эпигенетические модификации [91]. Так, в исследовании Ansere VA и соавторов на моделях животных было выявлено повышение экспрессии связанных со старением генов – *Cdkn1a* (ген внутриклеточного белка-ингибитора циклин-зависимой киназы 1A), *Cdkn2a* (ген внутриклеточного белка-ингибитора циклин-зависимой киназы 2A), *PAI-1* (гена ингибитора активации плазминогена 1 типа) и *Hmgbl* (гена белка высокомолекулярной группы 1) с увеличением возраста [92]. Кроме того, анализ транскриптомного профиля показал активацию генов провоспалительного стресса и ингибиторов клеточного цикла и, напротив, сниженную регуляцию генов-стимуляторов клеточного цикла, которые играют ключевую роль в регуляции созревания ооцитов [92]. *Cdkn1a* или *p21* является белком, который локализуется главным образом в нуклеоплазме и ядерных тельцах и ингибирует активность циклин-зависимых киназ посредством прямого связывания, что способствует регуляции клеточного цикла [93]. Кроме того,

по данным исследования Jin C и соавторов, повышенная активность *Cdkn1a* способствует экспрессии генов тканевого ингибитора металлопротеиназы 2 (*TIMP2*), гликопротеина *IL6ST*, а также белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста человека 4 типа (IGFBP-4), которые являются компонентами секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (Senescence-associated secretory phenotype SASP) [94]. Wu M и соавторы при анализе сетей транскрипционной регуляции также выявили повышенное обогащение сигнального пути SASP в клетках теки и стромы в сочетании с экспрессией *Cdkn1a* в гранулезных клетках и ооцитах у женщин старшей возрастной группы [95]. При этом экспрессия последнего регулируется различными факторами, в том числе FOXP1 (Forkhead box протеина O1) – наиболее крупным транскрипционным фактором из семейства Foxp, который у человека кодируется геном *FOXP1*. Одним из процессов, который требует изучения, является ингибирование транскрипции *Cdkn1a* за счет связывания FOXP1 с его промотором, что может иметь важное значение в реализации овариального старения [95].

При возрастной дисфункции яичников наблюдается активация различных путей программируемой клеточной гибели, которые представляют собой эволюционно развитые механизмы, способствующие естественному отбору ооцитов с наилучшими качественными характеристиками. Под воздействием многочисленных внешних и внутренних факторов такие процессы, как апоптоз, пироптоз, некроптоз, партанотоз и аутофагия, усиливаются, что может приводить к снижению функции яичников [96]. Подобные механизмы имеют фундаментальное значение в репродуктивном периоде жизни, поскольку посредством различных медиаторов через активацию сигнальных путей они оказывают воздействие на фолликулы на разных стадиях их развития. Так, на 12-й неделе внутриутробного периода происходит формирование фолликулярного пула из первичных половых клеток. К моменту рождения девочки этот запас значительно сокращается под воздействием сигнальных молекул клеточной гибели. Именно оставшийся фолликулярный запас регулирует продолжительность фертильного периода и начало менопаузы. В пубертатный период, который

характеризуется значительными гормональными изменениями, происходит активация процессов, связанных с атрезией фолликулов в яичниках [97]. Фолликулогенез происходит в течение всего репродуктивного периода жизни женщины, при этом более 99% активированных фолликулов подвергаются естественной атрезии, ведущим механизмом которой является апоптоз [98]. Клиническую проблему представляют процессы потери фолликулярного резерва, которые регулируются апоптотическими и неапоптотическими путями [96]. Механизмы клеточной гибели в яичниках разнообразны как в морфологических характеристиках, так и в патофизиологических аспектах их течения. В данные процессы вовлечены различные молекулы, участвующие в сигнальной трансдукции, что связано со сложностью и многогранностью их регуляции. Наиболее изученным путем клеточной гибели в яичниках является апоптоз, который активируется двумя путями: внешним, когда «рецепторы смерти» на поверхности клеток, относящиеся к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (апоптозный антиген 1 и другие) взаимодействуют со своими лигандами и внутренним, который активируется при взаимодействии проапоптотических белков с мембранами митохондрий [99, 100]. При внешнем пути активации апоптоза связывание лиганда «рецептора смерти» с Fas-ассоциированным белком и инициаторными каспазами приводит к формированию сигнального комплекса, который запускает эффекторные каспазы [101]. Внутренний или митохондриальный путь апоптоза запускается при воздействии различных внутренних раздражителей. Нарушения митотической активности, срыв клеточных гомеостатических механизмов, патологическая продукция активных форм кислорода, стресс эндоплазматического ретикулума, повреждение ДНК, репликационный стресс и другие патологические процессы связаны с синтезом различных внутриклеточных регуляторных молекул, которые приводят к нарушению мембранной проницаемости митохондрий и выходу проапоптотических белков из межмембранного пространства в цитозоль [96, 102]. Оба пути приводят к активации каскада семейства каспаз – ключевых регуляторов запрограммированной клеточной гибели, которые запускают окончательную

гибель клеток путем расщепления белков-мишеней, фрагментации разрушенных органелл на апоптотические тельца и их подготовки к фагоцитозу [103, 104]. Под воздействием различных факторов сигнальные пути апоптоза инициируют клеточную гибель в яичниках, что лежит в основе механизмов биологического старения, преждевременной недостаточности яичников и других патологических состояний. Механизмы регуляции апоптоза позволяют устранять дефектные ооциты, что имеет важное значение для поддержания здорового фолликулярного пула. Целостность и стабильность ДНК являются основополагающими факторами успешного зачатия и благоприятного эмбрионального развития [105]. В исходе каскада внутриклеточных метаболических событий могут формироваться различные повреждения генома, ведущие к последующему обширному апоптозу ооцитов [106, 107, 108]. Таким образом, различные внешние и внутриклеточные события являются инициирующими апоптоз и другие процессы программируемой клеточной гибели.

Баланс между механизмами антиоксидантной системы и окислительным стрессом необходим для поддержания основных функций организма. Окислительный стресс и механизмы клеточного старения тесно взаимосвязаны, при этом повышение продукции активных форм кислорода (АФК) приводит к нарушению гомеостаза путем активации ряда сигнальных путей с проапоптотическим воздействием [7, 22]. Воздействие АФК как мультифункциональных сигнальных молекул на овариальное старение представляет большой интерес для изучения ввиду их перспективности с точки зрения разработки потенциальных терапевтических стратегий. Метаболическая активность митохондрий необходима для поддержания всех стадий фолликулогенеза, но особо важное значение она имеет на ранних сроках оплодотворения, когда окисление органических соединений обеспечивает достаточным уровнем энергии активно развивающийся эмбрион. С увеличением возраста под негативным воздействием окислительного стресса наблюдается повреждение мтДНК и снижение экспрессии ядерных генов. Это приводит к усилению митохондриальной дисфункции, которая проявляется нарушением

митохондриального окислительного фосфорилирования и снижением продукции АТФ [109]. Данные изменения отражаются на метаболических процессах в яичниках в виде перехода от митохондриального источника энергии к альтернативным [110]. Такие изменения клеточного метаболизма могут быть предрасполагающими факторами усиления апоптотических процессов и снижения компетентности ооцитов [111]. В результате исследования метаболомного и липидомного профилей ооцитов Smits M и соавторы продемонстрировали, что у пациенток позднего репродуктивного возраста, начиная со стадии примордиальных фолликулов, наблюдается интенсификация процессов окислительного повреждения белков и липидов, а также снижение митохондриальной функции, что проявляется снижением НАД⁺, пуринов и пиримидинов и чрезмерным накоплением различных субстратов гликолиза [110]. Митохондриальное окислительное фосфорилирование приводит к продукции АФК, которые поддерживают важные функции в организме [112]. Нарушение баланса между антиоксидантной защитой и оксидативным стрессом приводит к апоптозу фолликулов и других клеток яичника [113, 114, 115]. Так, апоптотическая гибель клеток гранулезы усугубляет овариальную дисфункцию, что связано с развитием метаболических нарушений [116]. Кроме того, запуск апоптоза инициирует гибель зародышевых клеток, в результате чего происходит выделение внеклеточной ДНК и закономерное усиление продукции АФК, что приводит к интенсификации патологических процессов через активацию многочисленных сигнальных путей [117]. Одной из наиболее изученных сигнальных систем, выполняющих защитную функцию в яичниках, является редокс-чувствительная сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE [7, 22, 118]. В физиологических условиях связывание редокс-чувствительного ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) с келч-подобным ассоциированным с ЕСН белком 1 приводит к разрушению первого. Изменение интрацеллюлярных условий под воздействием окислительного стресса приводит к накоплению Nrf2, который путем связывания с геномными антиоксидант-респонсивными элементами (ARE) способствует экспрессии генов-мишеней антиоксидантной

защиты [119]. В опытных исследованиях на животных было показано, что ингибирование данного сигнального пути приводит к нарушению созревания ооцитов и снижению функциональной активности яичников [120].

Сиртуины представляют собой белки, активно участвующие в процессах репарации ДНК, регуляции экспрессии генов метаболических путей, антиоксидантной защиты и апоптоза [121]. Деацетилаза сиртуин-1 зависимая от НАД⁺, или Sirt1, имеет важное значение в контроле клеточного метаболизма и окислительного стресса, в том числе при фолликулогенезе [122]. Старение ооцитов сопровождается снижением уровня НАД⁺ и экспрессии сиртуина, что приводит к метаболическим изменениям, нарушению созревания ооцитов и снижению их качества [122]. Данные патологические процессы приводят к закономерному повышению окислительного стресса в предимплантационных эмбрионах и нарушению их развития [122]. С увеличением возраста женщины в ооцитах наблюдается снижение экспрессии сиртуинов 1–3 [123]. Являясь ключевым белком многих сигнальных путей, Sirt1 регулирует процессы созревания фолликулов. Под воздействием АФК происходит активация пути Sirt1/FoxO1, который играет ключевую роль в апоптозе гранулезных клеток и снижении овариального резерва [124, 125]. Кроме того, в экспериментальных исследованиях на животных было продемонстрировано, что при окислительном стрессе в клетках эндометрия происходит перенос из цитоплазмы в ядро белка FoxO1, который активирует транскрипцию проапоптотических белков и инициирует апоптоз [126]. НАД-зависимая деацетилаза Sirt3 в свою очередь обеспечивает энергетический гомеостаз внутри клеток, так как регулирует в митохондриях активность комплекса I дыхательной цепи переноса электронов и поддерживает базальные уровни АТФ [127]. При дефиците или отсутствии Sirt3 в ооцитах наблюдается усиление окислительного стресса и митохондриальная дисфункция, что влияет на эпигенетическую регуляцию генов, связанных со старением [128]. Важную роль в регуляции роста и апоптоза гранулезных клеток, синтеза стероидных гормонов во время фолликулогенеза играет сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR, активация которого ингибирует фермент каспазу-9 и активирует белковые факторы семейства

bcl-2 [129, 130].

Таким образом, процесс овариального старения реализуется через сложную сеть сигнальных путей, которые требуют изучения для последующей разработки прицельных терапевтических стратегий в борьбе с бесплодием в позднем репродуктивном возрасте.

1.5. Особенности энергетического метаболизма ооцитов

В настоящее время большое внимание уделяется изучению энергетического метаболизма ооцитов, от функционирования которого напрямую зависит качество эмбрионов. Метаболические пути ооцитов представляют собой сложную сеть биохимических реакций, которые обеспечивают их жизнедеятельность. При овариальном старении, которое затрагивает множество биологических звеньев, наблюдается интенсификация патологических процессов, в том числе связанных с нарушениями энергетического обмена. Являясь основным углеводным источником для клеток, глюкоза имеет исключительно важное значение в процессах созревания ооцитов. Однако ее утилизация становится возможной только в присутствии кумулюсных клеток, что связано с отсутствием восприимчивости к инсулину и низкой гликолитической активностью ооцитов [131, 132, 133]. Клетки кумулюса обеспечивают энергетический баланс ооцитов, предоставляя им метаболические субстраты для производства АТФ [134]. Они осуществляют метаболизм глюкозы преимущественно путем анаэробного гликолиза, что приводит к образованию лактата в качестве конечного продукта биохимических реакций. Вместе с тем, альтернативным путем метаболизма глюкозы, который имеет определяющее значение в фолликулогенезе, является пентозофосфатный путь, в результате которого происходит синтез никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН) и пирувата помимо лактата [135]. При переходе в ооциты данные субстраты вовлекаются в окислительное фосфорилирование и цикл трикарбоновых кислот, что приводит к синтезу АТФ. Кроме того, в данный цикл через путь β -окисления жирных кислот могут

включаться свободные жирные кислоты, которые транспортируются в ооциты из пространства ооцит-кумулюсных клеток и фолликулярной жидкости, преобразуясь в ацетил-кофермент А (ацетил-КоА) [136]. Таким образом, продуктами данных обменных процессов являются активные метаболиты, которые не только выполняют энергетическую функцию, но и, выступая в качестве сигнальных молекул, обеспечивают созревание ооцитов.

Ооциты являются наиболее богатыми по содержанию митохондрий клетками в организме, что объясняет критическое значение митохондриальной функции в гормональной регуляции и фолликулогенезе [137]. Митохондриальный биогенез, путем координации ядерной и мтДНК, является адаптивным ответом, который обеспечивает синтез АТФ, удовлетворяя растущие энергетические потребности созревающих фолликулов [83]. Нарушение митохондриальной функции определяется снижением числа копий мтДНК в клетках, что служит не маркером овариального старения, а его наиболее значимым фактором [14, 83, 138]. Количественная или качественная дисфункция мтДНК является результатом не только естественной сенесценции, но и пагубного воздействия факторов окружающей среды и окислительного стресса [139]. В исследовании Корольковой АИ и соавторов показана связь между снижением копийности мтДНК в кумулюсных клетках и снижением овариального резерва, что объясняет роль митохондриальной дисфункции в снижении репродуктивного потенциала у женщин позднего репродуктивного возраста [140]. В результате митохондриальной дисфункции происходит снижение продукции АТФ, что оказывает негативное влияние на клеточный цикл, нарушая оплодотворение и развитие эмбриона [136].

Вышеописанные процессы имеют важное значение в установлении овариального эпигенома, для которого характерна пластичность в ответ на изменение окружающих условий и непосредственная зависимость от возраста. Эпигенетические модификации, которые включают метилирование ДНК, малые некодирующие рибонуклеиновые кислоты (РНК) и модификацию гистонов, приводят к изменению регуляции обменных процессов, тем самым меняя

метаболический профиль ооцитов и, соответственно, их качество [141]. После оплодотворения наблюдается эпигенетическое ремоделирование, которое включает реорганизацию генома и значительные транскрипционные изменения, а также процесс перехода от материнской матричной РНК к эмбриональной, что носит название материнско-зиготического перехода [142]. Несмотря на то, что механизмы данного эволюционного процесса остаются неясными, очевидное значение в эмбриональном развитии имеют исходные данные эпигенома, который подвержен воздействию различных факторов, в том числе метаболического профиля ооцит-кумулюсного комплекса (ОКК).

Таким образом, результаты данных исследований дают понимание возрастной изменчивости метаболических процессов в ооцитах, что создает условия для глубинного изучения физиологических особенностей эмбриона. Понимание роли данных механизмов имеет важное значение в модификации эмбрионального этапа у пар позднего репродуктивного возраста.

1.6. Современные подходы к эмбриональному этапу программ вспомогательных репродуктивных технологий

Мировая тенденция увеличения частоты программ ВРТ не только отражает достижения современной репродуктивной медицины, но и отвечает на актуальные потребности совершенствования и оптимизации протоколов лечения бесплодия. В настоящее время изучение условий культивирования эмбрионов становится более востребованным, и если ранее преимущественное значение придавалось оптимизации физико-химических свойств культуральных сред, то в настоящее время большое значение приобретает изучение их биомеханических условий. Согласно современным исследованиям эмбриональное окружение путем изменения экспрессии генов через эпигенетические модификации воздействует на течение эмбриогенеза, а значит, и на исходы программ ВРТ [143]. Эти данные подчеркивают актуальность и необходимость дальнейшего изучения

и оптимизации эмбрионального этапа с целью достижения успеха в лечении бесплодия.

Несмотря на то, что критическая роль среды культивирования эмбрионов является общеизвестным фактом, в настоящее время единого мнения относительно их оптимального состава не достигнуто [144, 145]. Выбор среды культивирования имеет важное значение для развития эмбрионов и повышения их имплантационного потенциала. В настоящее время внимания заслуживает не столько оценка преимуществ эмбриологических подходов, сколько изучение роли основных составляющих сред культивирования в качестве сигнальных молекул, которые способны регулировать метаболические пути и эпигенетические механизмы на этапе эмбрионального развития [146]. Серьезной проблемой является отсутствие полной прозрачности со стороны производителей в отношении состава культуральных сред, что затрудняет их оценку, сравнение в научных и клинических исследованиях, а также оптимизацию эмбрионального этапа.

Определение потребностей эмбриона человека на преимплантационном этапе и, соответственно, состава культуральных сред проводится с применением двух различных подходов. Первые исследования *in vivo* определили метаболические условия, окружающие эмбрион в маточных трубах и матке, что легло в основу разработки последовательной среды культивирования, которая предоставляет необходимые условия на каждой стадии развития преимплантационного эмбриона по принципу «назад к природе» [147, 148]. Второй подход основан на принципе «пусть эмбрион выбирает», что заключается в обеспечении преимплантационного эмбриона всеми необходимыми питательными веществами в единой одноэтапной среде культивирования [149]. В современных условиях оба принципа в одинаковой степени активно применяются на практике без ограничений и предпочтений со стороны производителей [150]. Тем не менее, сравнительные исследования по эффективности двух разных подходов к эмбриональному этапу продолжаются.

В большинстве случаев подбор состава, концентрации и соотношения компонентов в средах проводится на основании экспериментальных работ

на моделях животных или исследований *in vivo*, которые ввиду небольшой выборки имеют ограничения в научном обосновании выводов. Zagers MS и соавторами был проведен анализ культуральных сред на содержание более чем 40 компонентов, в результате которого получены данные о том, что по составу одних метаболитов, например, глюкозы, большинство из них соответствуют общепринятым представлениям об энергетических потребностях на ранних этапах эмбриогенеза [150]. Однако концентрации некоторых компонентов, в том числе лактата, значительно различаются в средах, что требует сравнительного анализа и оценки исходов ВРТ [150]. Оценка энергетических потребностей эмбрионов была произведена Ferrick L и соавторами, которые показали, что эмбрионы 5-х суток развития с морфологической оценкой по классификации Гарднера выше стадии ВВ потребляли значительно больше глюкозы, по сравнению с эмбрионами с менее высокой оценкой развития ($91,7 \pm 8,5$ против $61,4 \pm 5,9$ пмоль/глюкозы/ч, $p < 0,01$) [151]. Кроме того, были получены данные о двукратном повышении потребления глюкозы у blastocysts, перенос которых привел к наступлению клинической беременности, по сравнению с blastocysts, перенос которых не завершился имплантацией ($77,4 \pm 11,7$ против $38,4 \pm 11,2$ пмоль/эмбрион/ч, $p < 0,05$) [151]. В исследовании Lee YS и соавторов были получены данные, согласно которым эмбрионы, опережающие по скорости дробления в среднем на 2,5 часа «медленные» эмбрионы, к 5-ому дню культивирования имели большую внутреннюю клеточную массу и характеризовались более высоким потреблением глюкозы и низкой скоростью гликолиза по сравнению с «медленными» эмбрионами [152].

Одноэтапная среда культивирования обладает преимуществами за счет снижения стресса для эмбрионов, технологического упрощения процесса, сокращения временных затрат, а также способности более эффективного контроля за ростом эмбрионов. Сравнительные исследования двух разных подходов к эмбриональному этапу продолжаются, а их результаты зачастую противоречивы. Так, Deng J и соавторами было показано, что применение одноступенчатой культуральной среды по сравнению с последовательной хоть и приводило к более

высокой частоте образования бластоцист (51,7% против 43,4%), но и увеличивало частоту анеуплоидий (54,0% против 45,8%) у молодых женщин [153]. Подобные данные были получены в исследовании Abdala A и соавторов, где более высокая частота бластуляции на 5-й день культивирования в одноэтапной среде по сравнению с последовательной (70,6% против 62,2%) не привела к увеличению количества пригодных для переноса эмбрионов [154].

1.7. Роль преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на анеуплоидии

Поскольку к наиболее распространенным причинам неудач ВРТ относят хромосомные аномалии, преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии (ПГТ-А) достаточно быстро приобрело популярность как метод, способный улучшить исходы лечения бесплодия [140]. В клинической практике наиболее широкое применение получили микроматричная сравнительная геномная гибридизация (array comparative genomic hybridization, aCGH) и секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS), которое в настоящее время является приоритетным методом [155]. Хотя в некоторых сравнительных исследованиях не выявлены статистически значимые различия в частоте наступления беременности при проведении ПГТ-А данными методами [156, 157, 158, 159], имеются данные в пользу преимуществ NGS. Так, результаты исследования Lai НН и соавторов свидетельствуют о преимуществах, а именно, о более высокой диагностической эффективности NGS по сравнению с aCGH при выявлении эмбрионов с мозаицизмом и сегментарными формами анеуплоидий, а также о повышении частоты имплантации эмбриона при использовании данного метода (53,2% против 45,0%) [160]. Более поздние исследования подтвердили высокую клиническую значимость NGS в улучшении исходов программ ВРТ, в особенности у женщин позднего репродуктивного возраста [161, 162].

Известно, что нормальный кариотип является предиктором благоприятного исхода беременности лишь в 50-60% [163]. С увеличением возраста женщины

закономерно повышается частота анеуплоидий как при естественном зачатии, так и в программах ВРТ. По данным Matorras R частота анеуплоидий эмбрионов у женщин позднего репродуктивного возраста выше на 24,32%, чем у женщин моложе 35 лет [164]. В мета-анализе 7 клинических исследований Taskin O и соавторы не выявили повышения частоты наступления беременности при использовании ПГТ-А эмбрионов [165]. Однако в систематическом обзоре и мета-анализе Cheng X и соавторов было показано, что у женщин позднего репродуктивного возраста ПГТ-А повышает показатели живорождения [166]. Аналогичные результаты были получены позднее в ретроспективном исследовании Kim JW и соавторов, где было показано, что перенос эмбриона после ПГТ-А связан с повышением частоты имплантации и живорождения из расчета на цикл переноса по сравнению с переносом эмбрионов, не прошедших генетическое тестирование [167]. В недавней работе Jiang W и соавторы определили зависимость исходов программ ВРТ с эуплоидными эмбрионами от возраста со снижением частоты живорождения до 41,7% у женщин ≥ 38 лет, по сравнению с группами < 35 и 35–37 лет, где этот показатель составил 54,5% и 54,0% соответственно [168].

Таким образом, несмотря на совершенствование методов ПГТ, проблема неудач имплантации остается актуальной, в связи с чем в настоящее время все больший интерес приобретает разработка новых подходов к диагностике. Кроме того, показано, что вне зависимости от плоидности эмбриона, возраст матери старше 35 лет является независимым фактором снижения успеха программ ВРТ [169]. В связи с этим перспективными для изучения выступают механизмы репродуктивного старения, эмбриональной механотрансдукции и успешной имплантации, а также другие молекулярные характеристики эмбриона [170]. В настоящее время продолжаются поиски надежных малоинвазивных диагностических методов исследования генома эмбриона. Другими направлениями, которые могут улучшить исходы программ ВРТ, являются модификации культуральных сред с применением различных современных биоматериалов, а также внедрение современных технологий мониторинга

биофизического профиля эмбрионального окружения [143, 171]. Внедрение новых подходов к культивированию эмбрионов может послужить фактором улучшения исходов ВРТ.

1.8. Особенности ранних этапов эмбрионального развития.

Роль лактата.

В настоящее время изучение эмбрионального этапа развития человека ограничено в связи с этическими и нормативными аспектами, которые накладывают запрет на расширение объема экспериментальных исследований *in vitro*. Однако благодаря исследованиям на моделях животных и технологиям культивирования *in vitro* в настоящее время знания о физиологии эмбриона расширяются, что имеет важную практическую ценность для совершенствования эмбрионального этапа в программах ВРТ, в том числе оптимизации культуральных сред [172].

После оплодотворения ооцита сперматозоидами формируется диплоидная зигота, представляющая собой начальную стадию эмбрионального развития. Геном зиготы, который сформирован материнским и отцовским генетическим материалом, является транскрипционно неактивным до тех пор, пока не произойдет его перепрограммирование. Активация зиготического генома является критическим событием развития, которое у человека происходит на стадии 4-8 бластомеров и характеризуется включением транскрипции эмбриональных генов за счет РНК и специализированных белков ооцита [173]. До настоящего времени эволюционное значение данного процесса остается не до конца выясненным. Согласно последним исследованиям активация зиготического генома способствует геномной стабильности преимплантационных эмбрионов за счет исправления повреждений ДНК [174]. В течение первых трех дней после оплодотворения происходит активное дробление клеток, в результате чего формируются бластомеры. В исследовании Zhu M и соавторов была подробно описана динамика компактизации человеческого эмбриона, которая показала, что

апикально-базальная поляризация клеток происходит на стадии 8-16 клеток [175]. Помимо компактизации, важным процессом для развития эмбриона от стадии морулы до бластоцисты является интернализация или «втягивание» части бластомеров для формирования плюрипотентной линии внутриклеточной массы, которая дает начало тканям плода, в то время как клетки, остающиеся на поверхности, образуют трофэктодерму, которая дифференцируется в специализированные субпопуляции трофобластов [175]. При успешной имплантации дальнейшее развитие эмбриона подразумевает последовательные фазы гаструляции, плацентации и постгаструляционного органогенеза [176].

Изучение естественных условий раннего эмбриогенеза имеет важное значение для оптимизации подходов к эмбриональному этапу программ ВРТ. Обменные процессы являются основой клеточного функционирования, а регуляция метаболического гомеостаза реализуется посредством эволюционно закрепленной многоуровневой системы, вовлеченной в контроль генной экспрессии на начальных этапах развития эмбриона [177]. Расширение исследовательских возможностей, обусловленное внедрением новых методологических подходов, включая технологии «омиксного» профилирования, создало предпосылки для углубленного изучения взаимосвязей между метаболитами и геномом, при этом гистоны, являясь ядерными белками, выполняют двойную функцию – обеспечивают структурную организацию хроматина и участвуют в регуляторных механизмах, контролирующих экспрессию генов [178]. С момента открытия нового механизма эпигенетической модификации – лактирования остатков гистонов, которое активирует транскрипцию генов, изучение лактата в качестве молекулярного инструмента вызвало большой интерес [178, 179, 180].

До недавнего времени лактат воспринимался как побочный конечный продукт обменных процессов, уступая по значимости другим метаболитам в том числе глюкозы и пирувата. Особенно важным, но пока не изученным, представляется его значение в качестве регулятора эмбриогенеза. Присутствие лактата *in vivo* и *in vitro* в микроокружении преимплантационных эмбрионов

млекопитающих предполагает его важное значение как сигнальной молекулы. В исследовании Li J и соавторов было обнаружено сильное обогащение лактатом на этапе активации зиготического генома, которое прерывалось в случае ингибирования продукции лактата и последующей потери лактилированного гистона H3K18lac [181]. Роль лактата в качестве важнейшего источника энергии на ранних стадиях эмбрионального этапа хорошо изучена [182]. Получение эмбрионом лактата осуществляется двумя путями: поглощением *in vitro* посредством экспрессии монокарбоксилатных транспортеров на клеточной мембране и синтезом *in vivo*, который опосредован гликолитической системой [183].

Гликолитическая система является основной для производства энергии с ранних этапов развития эмбриона до стадии бластоцисты, в результате метаболических реакций которой наблюдается образование двух молекул пирувата [184]. Пируват является ключевым метаболитом в производстве энергии в клетках, участвует в цикле трикарбоновых кислот и синтезе АТФ. Так, в условиях достаточного уровня кислорода пируват превращается в ацетил-КоА, который входит в цикл трикарбоновых кислот и становится субстратом для синтеза АТФ.

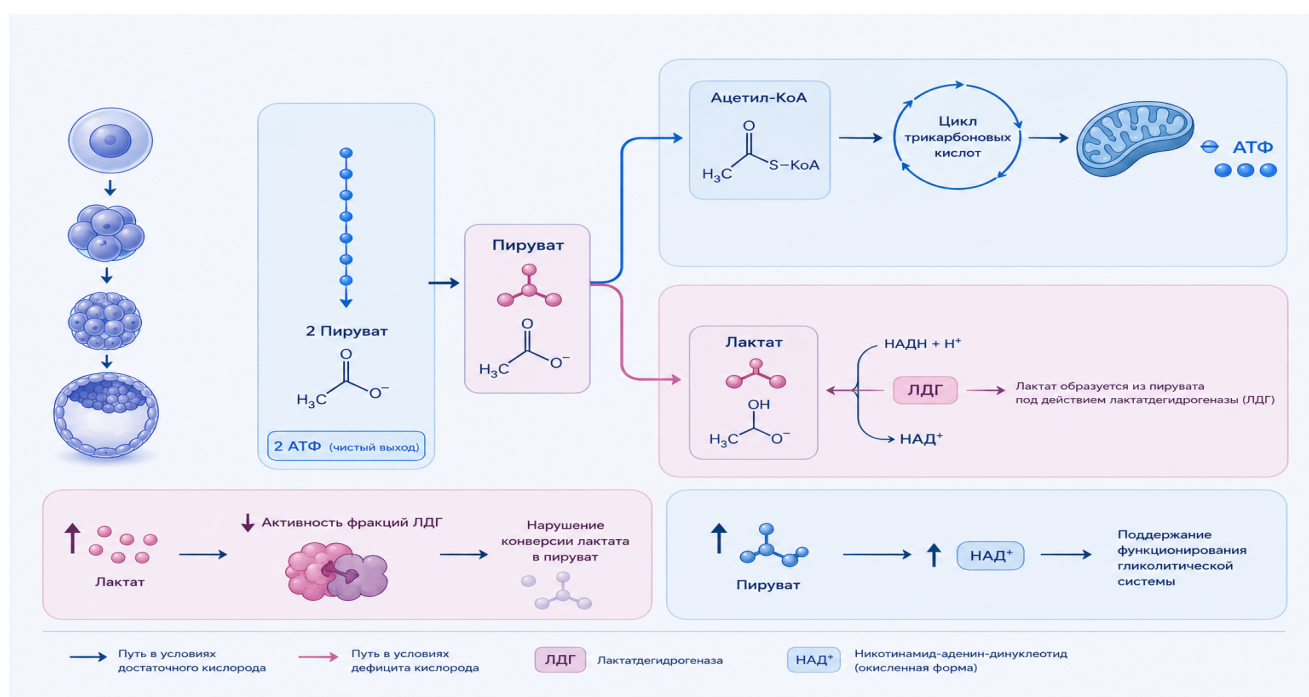


Рисунок 1 – Схематическое изображение энергетических процессов раннего эмбрионального этапа

Однако в условиях дефицита кислорода активируется альтернативный метаболический путь превращения пирувата в лактат, который катализируется лактатдегидрогеназой (ЛДГ). Повышенные концентрации лактата приводят к снижению активности фракций ЛДГ, что нарушает его конверсию в пируват. Кроме того, известно, что при высоких концентрациях пирувата наблюдается увеличение концентрации кофактора НАД⁺, который поддерживает функционирование гликолитической системы [25] (Рисунок 1).

У лактата имеется два стереоизомера лактата – L-молочная кислота (L-лактат) и D-молочная кислота (D-лактат), которые отличаются пространственным расположением атомов в молекуле и, соответственно, их физико-химическими свойствами и биологической активностью [185]. D-лактат не обладает способностью конвертироваться в пируват под действием ЛДГ, и его присутствие может быть губительным для дробления эмбрионов. В исследовании Gardner DK и соавторов было показано снижение концентраций пирувата и лактата в жидкости маточных труб в лютеиновой фазе, что, предположительно, необходимо для обеспечения повышенных энергетических потребностей развивающегося эмбриона [186]. Полученные данные совпадают с результатами более позднего исследования Utsunomiya T и соавторов, которые показали, что в естественных условиях в составе жидкости маточных труб наблюдаются низкие концентрации лактата (до 5,1 мМ) [187].

Изучение особенностей метаболического окружения эмбриона имеет важное значение для разработки благоприятных условий культивирования эмбрионов. Потребность в энергии меняется в зависимости от стадии эмбрионального развития. Показано, что энергетические потребности бластоцисты десятикратно превышают таковые на стадии дробления. Поскольку около 50% потребляемой бластоцистой глюкозы путем аэробного гликолиза преобразуется в лактат, в настоящее время активно изучается его роль в процессе имплантации бластоцисты в эндометрий. Таким образом, консервативный метаболический механизм является основой преимплантационного развития эмбриона, однако роль

отдельных метаболитов в сигнальных путях, регуляции генетической активности и имплантации требует дальнейшего изучения [181].

Помимо того, что аэробный гликолиз способствует восполнению растущих метаболических потребностей на фоне активных процессов клеточной пролиферации, метаболиты данных биохимических реакций способствуют успешной имплантации бластоцисты, что представляет собой один из механизмов эмбриональной адаптации [188]. На эмбрионах животных показано, что начальные стадии имплантации эмбриона происходят в анаэробных условиях, что требует от него активации анаэробного метаболизма как единственного источника энергии. Таким образом, в течение эмбрионального развития наблюдается каскад взаимосвязанных друг с другом процессов, который в присутствии гликолитических ферментов обеспечивает метаболический переход от аэробного гликолиза на стадии бластоцисты до анаэробного на стадии имплантации [188]. Кроме того, лактат как мультифункциональная сигнальная молекула участвует в процессах инвазии, ангиогенеза и иммунной модуляции, что способствует улучшению рецептивности эндометрия и увеличению шансов на имплантацию бластоцисты. Изучение лактата как модулятора различных биологических процессов на границе между матерью и плодом показало, что посредством активации сигнальных путей транскрипционных факторов лактат способствует дифференцировке децидуальных макрофагов. В экспериментальном исследовании на моделях животных Gao L и соавторами показано, что ингибирование поступления лактата посредством активации иммунных механизмов способствует пролонгированию беременности [189].

Современные научные подходы позволяют расширить понимание взаимодействия генетических, эпигенетических и молекулярных процессов на эмбриогенез. В настоящее время предпринимаются первые попытки формирования эпигенетических карт человеческого эмбриогенеза, что открывает новые возможности для изучения эмбрионального потенциала [190]. Данные исследования могут стать основой для формирования стратегий ведения эмбрионального этапа, которые позволят обеспечить посредством влияния

на энергетический метаболизм эмбриона адекватную активацию собственного генома и формирование бластоцисты с высоким имплантационным потенциалом. Создание необходимого микроокружения для развития эмбриона возможно при модификации состава культуральных сред с учетом особенностей его метаболизма для каждой возрастной группы пациенток, что требует проведения дальнейших исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материал и дизайн исследования

Данная научная работа выполнена на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель отделения – доктор медицинских наук, профессор Калинина Е.А.) Института репродуктивной медицины (директор – доктор медицинских наук, профессор Назаренко Т.А.) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, профессор, доктор медицинских наук Сухих Г.Т.).

В период с 2022 по 2025 годы проведено двухэтапное исследование, в которое было включено 860 супружеских пар, обратившихся для преодоления бесплодия с применением ВРТ в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Принимая во внимание высокий риск неудачных исходов программ ЭКО у женщин старше 40 лет согласно данным общемировой литературы и клинического опыта, для выполнения поставленных задач и оценки эффективности различных эмбриональных этапов в зависимости от возраста женщин исследование было проведено с включением пациенток позднего репродуктивного возраста, которые были разделены на две возрастные группы – 35–39 и 40–42 лет. Всеми супружескими парами, включенными в исследование, было пройдено полное обследование согласно приказу Министерства здравоохранения России №803н от 31 июля 2020 года «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» и клиническим рекомендациям, утвержденным Министерством здравоохранения России. На проведение настоящего исследования было получено одобрение локального этического комитета федерального

государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовского Университета).

На первом этапе было проведено ретроспективное исследование, в которое вошли 200 супружеских пар с возрастом женщин от 35 до 39 лет, и 140 супружеских пар с возрастом женщин от 40 до 42 лет, которые проходили лечение бесплодия с применением методов ВРТ с 2020 по 2022 годы. В зависимости от среды культивирования эмбрионов группа женщин 35-39 лет была разделена на две подгруппы: подгруппа 1 (n=115), где применялась среда культивирования эмбрионов с пониженным лактатом CSCM-NX («Фуджифильм Ирвайн Сайнтифик, Инк.», США) и подгруппа 2 (n=85), где культивирование эмбрионов осуществлялось в одноэтапной классической среде G-TL («Витролайф», Швеция). Группа женщин в возрасте 40–42 лет – подгруппа 1 (n=70) проводилось культивирование эмбрионов в среде с пониженным содержанием лактата CSCM-NX («Фуджифильм Ирвайн Сайнтифик, Инк.», США) и подгруппа 2 (n=70), где культивирование эмбрионов осуществлялось в одноэтапной классической среде G-TL («Витролайф», Швеция). Конечными точками служили медианы и частоты клинико-анамнестических данных, показателей лабораторного обследования, параметров овариальной стимуляции и эмбриологического этапа, а также результаты исходов программ ЭКО – частоты наступления биохимической беременности, наступления клинической беременности, ранних гестационных потерь и живорождения при культивировании в классической среде и среде с пониженным содержанием лактата у женщин данных возрастных групп.

На втором этапе проведено проспективное исследование, включившее 520 супружеских пар с возрастом женщин от 40 до 42 лет, которые проходили лечение бесплодия в период с 2022 по 2024 годы [22]. Данная когорта случайным образом была также разделена на две подгруппы: подгруппа 1 (n=264), где использовалась среда с пониженным содержанием лактата CSCM-NX («Фуджифильм Ирвайн Сайнтифик, Инк.», США) и подгруппа 2 (n=256), в которой применялась

одноэтапная классическая среда G-TL («Витролайф», Швеция) [22]. Дизайн проспективного этапа исследования представлен на рисунке 2.



Рисунок 2 – Дизайн проспективного этапа исследования

Конечными точками данного этапа работы являлись следующие параметры: медианы и частоты клинико-анамнестических данных, медианы лабораторных показателей, медианы и частоты параметров овариальной стимуляции и эмбриогенеза (число полученных ОКК, число ооцитов стадии МП, частота оплодотворения, число полученных бластоцист хорошего и отличного качества на 5-е сутки культивирования), клинические результаты эффективности программ ЭКО (частоты наступления биохимической беременности, наступления клинической беременности, репродуктивных потерь и живорождения) при культивировании эмбрионов в классической среде и среде с пониженным содержанием лактата у женщин возрастной когорты 40–42 лет.

Критериями включения пациенток в исследование являлись:

- поздний репродуктивный возраст от 35 до 42 лет;
- применение программ ЭКО только с собственными ооцитами;
- нормальный кариотип супругов согласно результатам цитогенетического исследования;
- регулярная менструальная функция;
- значение базального уровня ФСГ в раннюю фолликулярную фазу не более 15 МЕ/мл;
- отсутствие врожденных пороков развития органов мочеполовой системы;
- получение не менее одного зрелого ооцита (стадии развития МП) при трансвагинальной пункции яичников;
- фертильная или субфертильная сперма партнера;
- подписанное информированное согласие на участие в данном научном исследовании.

Критерии невключения:

- наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ согласно приказу Министерства здравоохранения России №803н от 31 июля 2020 года «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»;

- выраженные формы нарушений сперматогенеза, в том числе оплодотворение сперматозоидами, полученными из биоптата ткани яичка;
- наружный генитальный эндометриоз III–IV стадии распространения.

Критерии исключения пациенток из исследования:

- отсутствие зрелых ооцитов в результате пункции яичников;
- отказ пациентов от дальнейшего участия в исследовании [22].

2.2. Методы исследования

Супружеские пары, включенные в исследование, прошли полное обследование согласно приказу Министерства здравоохранения России №803н от 31 июля 2020 года «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» и клиническим рекомендациям, утвержденным Министерством здравоохранения России. В случае выявления отклонений в результатах обследования или наличии других показаний, в том числе отягощенного соматического анамнеза, пациенток направляли на клиничко-лабораторное дообследование и консультации профильных специалистов.

2.2.1. Общеклинические методы исследования

На первичном приеме врача-акушера-гинеколога проводился полный сбор анамнеза женщин, в том числе особенностей развития, семейного анамнеза, жилищно-бытовых и трудовых условий, образа жизни, наличия профессиональных вредностей и вредных привычек. Были собраны сведения о проведенных вакцинациях, перенесенных заболеваниях, оперативных вмешательствах и травмах, а также уточнены аллергологический и соматический анамнезы. Гинекологический анамнез включал информацию об особенностях становления и характере менструальной функции, возрасте начала половой жизни, методах контрацепции и длительности их применения, гинекологических заболеваниях

(инфекции, передающиеся половым путем, воспалительные заболевания женских тазовых органов, патология шейки матки, гиперпластические процессы эндометрия и другие процессы в эндометрии, аденомиоз, наружный генитальный эндометриоз, образования яичников, миома матки, полиэндокринный метаболический овариальный синдром, заболевания молочных желез) [22, 41, 190]. Проводился сбор репродуктивного анамнеза, а именно уточнялось количество и исходы беременностей. Был проведен анализ структуры и длительности бесплодия, а также фиксировалась информация о проведенных ранее программах ЭКО и их исходах.

На первичном приеме проводили общую оценку состояния, физикальное обследование, определение антропометрических показателей с расчетом индекса массы тела (ИМТ) ($\text{ИМТ} = \text{масса тела, кг} / \text{рост, м}^2$).

При гинекологическом осмотре оценивали тип оволосения, состояние и особенности развития наружных половых органов, влагалища и шейки матки, при бимануальном влагалищном исследовании определяли положение, размеры и болезненность матки и придатков, оценивали своды влагалища.

Проводился сбор анамнеза мужчин, в том числе об особенностях семейного анамнеза, наличии соматических заболеваний, длительности бесплодия и методах лечения, а также наличии детей в прошлых браках.

2.2.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза

При подготовке к вступлению в программу ЭКО пациенткам выполнялась первичная инструментальная диагностика в объеме экспертного УЗИ органов малого таза трансвагинальным доступом в раннюю фолликулярную фазу. При проведении ультразвуковой диагностики определяли форму, размеры и положение матки и ее шейки, оценивали состояние миометрия, толщину и эхоструктуру эндометрия, а также измеряли размеры яичников с расчетом их объема и количества КАФ; верифицировали присутствие или отсутствие объемных новообразований в области малого таза.

При вступлении в протокол ЭКО на 2-3-й день менструального цикла повторно выполнялось трансвагинальное УЗИ органов малого таза. В случае исключения функциональных кист яичников и внутриматочной патологии, при условии наличия антральных фолликулов пациентке начиналась овариальная стимуляция. На 5-й или 6-й день инъекций препаратов Гн проводился ультразвуковой мониторинг для оценки размера растущих фолликулов, толщины и эхоструктуры эндометрия. При необходимости проводилась коррекция вводимых доз Гн, при диаметре лидирующих фолликулов 13-14 мм вводился препарат антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) для предотвращения преждевременной овуляции. С целью назначения триггера финального дозревания ооцитов ультразвуковой контроль осуществлялся каждые 2-3 дня до достижения фолликулами диаметра 16-18 мм [22, 190].

Трансвагинальная пункция фолликулов яичников и перенос бластоцисты в полость матки проводились под ультразвуковой навигацией, после чего через 21 день с целью диагностики клинической беременности в случае положительного теста бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) в сыворотке крови проводилось УЗИ органов малого таза.

2.2.3. Гормональное исследование

Перед вступлением в программу ЭКО с целью оценки функции репродуктивной системы и состояния овариального резерва женщинам назначалось гормональное исследование. На 2-3-й день менструального цикла проводилось определение уровней АМГ и ФСГ в сыворотке крови. Референсные значения концентрации гормонов в сыворотке крови представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Референсные значения концентрации гормонов

Показатель	Референсные значения для женщин репродуктивного возраста	Единицы измерения
АМГ	1,2-9,85	нг/мл
ФСГ	2,0-10,0	МЕ/л

2.2.4. Исследование параметров эякулята

При подготовке к программе ЭКО все партнеры пациенток проходили комплексное обследование, неотъемлемой частью которого являлось исследование эякулята. Материал собирали в стерильный контейнер, соблюдая период полового воздержания продолжительностью от 3 до 5 суток. Повторный сбор спермы осуществляли непосредственно в день ТВП. Полученные образцы анализировали согласно стандартам, изложенным в руководстве ВОЗ 2010 года (Таблица 2) [191].

Таблица 2 – Нормативные показатели спермограммы (ВОЗ, 2010 год) [191]

Показатель	Референсные значения	Единицы измерения
Общий объем эякулята	>1,5	мл
pH	≥7,2	-
Вязкость	0,1-2,0	см
Время разжижения	<60	мин
Концентрация лейкоцитов	<1	млн/мл
Концентрация сперматозоидов	>15	млн/мл
Общее количество сперматозоидов	>40	млн
Подвижность сперматозоидов, PR %	Общая подвижность сперматозоидов ≥40 Сперматозоиды с прогрессивным движением ≥32	%
Морфология	≥4	%
Жизнеспособность сперматозоидов	≥58	%
Агглютинация	Отсутствует	-
Клетки сперматогенеза	2-4	в поле зрения (x40)

Согласно данным рекомендациям, были выделены следующие патологические критерии спермограммы:

- аспермия – состояние, при котором эякулят отсутствует;

- азооспермия – состояние, при котором в эякуляте отсутствуют сперматозоиды;
- олигозооспермия – состояние, при котором отмечается снижение концентрации сперматозоидов менее 15 млн/мл;
- астенозооспермия – состояние, при котором наблюдается снижение показателей общей подвижности сперматозоидов менее 40% и сперматозоидов с прогрессивным движением менее 32%;
- тератозооспермия – состояние, при котором показатель сперматозоидов с дефектами морфологии превышает 96% [191].

2.2.5. Протокол овариальной стимуляции и проведение трансвагинальной пункции фолликулов яичников

На 2-3-й день менструального цикла начинали проведение овариальной стимуляции по протоколу с препаратами Гн и ант-ГнРГ. Подбор начальной дозы Гн проводился персонализированно с учетом возраста, ИМТ, показателей овариального резерва, особенностей гинекологического анамнеза, а также данных ответа на овариальную стимуляцию в предыдущих протоколах ЭКО (в случае, если пациентка ранее проходила лечение бесплодия с помощью ВРТ). Основанием для коррекции доз вводимых препаратов служили показатели фолликулометрии. На момент достижения доминантным фолликулом диаметра 13-14 мм с целью предотвращения преждевременного пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) подкожно назначали введение препарата ант-ГнРГ в дозе 0,25 мг в сутки. При достижении фолликулами диаметра 17-18 мм с целью финального дозревания ооцитов вводился триггер финального дозревания ооцитов – препарат человеческого хорионического гонадотропина (ХГЧ) в дозе 10000 МЕ [22, 190].

Через 35-36 часов после введения препарата ХГЧ с обеспечением анестезиологического пособия в объеме кратковременного внутривенного обезболивания в условиях малой операционной производилась ТВП одноразовой

иглой («Vitrolife», Швеция) под ультразвуковой навигацией. Полученную при аспирации фолликулярную жидкость направляли эмбриологу с целью определения количества полученных ОКК и последующей морфологической оценки ооцитов.

2.2.6. Морфологическая оценка ооцитов и анализ результатов оплодотворения

Аспирированные ОКК отмывали от примесей фолликулярной жидкости и форменных элементов крови, после чего переносили в стерильные планшеты, содержащие уравновешенную культуральную среду («G-IVF Plus», «VitroLife», Швеция), и помещали на предварительную инкубацию продолжительностью 2–3 часа. Денудацию ооцитов выполняли с использованием универсального HEPES-буфера (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) («Gamet Buffer», «Cook», Австралия). После проведения денудации с помощью инвертированного микроскопа проводилась качественная оценка морфологии и мейотической зрелости ооцитов:

GV (герминальный везикул) – незрелый ооцит, находящийся в профазе первого мейотического деления;

MI – незрелый ооцит в метафазе I, при визуализации которого не определяется ни полярное тельце, ни ядро;

MII – зрелый гаплоидный ооцит на стадии метафазы II, содержащий ядро и первое полярное тельце.

Проводили оплодотворение методом ИКСИ (инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита), для которого отбирались сперматозоиды с наилучшими морфологическими характеристиками. Данный метод оплодотворения был выбран для всех включенных в исследование супружеских пар в связи с высокой частотой мужского фактора бесплодия, а также планированием ПГТ-А у отдельных подгрупп в каждой возрастной когорте. Когда первое полярное тельце становилось видимым в положении на «6 часов» условного циферблата, ооцит фиксировали удерживающей пипеткой и проводили инъекцию сперматозоида. Разрыв оолеммы

выполнялся путем аспирации с помощью инъекционной микропипетки, затем сперматозоид медленно высвобождали в ооплазму. Инъекционную микропипетку осторожно извлекали, ооцит освобождали из удерживающей пипетки. Процедуру повторяли для каждого ооцита. Затем инъецированные ооциты помещали в предварительно подготовленную культуральную среду в соответствии с принадлежностью к группе исследования (подглава 2.2.7). Через 16–17 часов оценивали размер зиготы, размер и положение пронуклеусов. Оплодотворение расценивалось как нормальное при визуализации двух пронуклеусов (2PN), тогда как наличие одного или трех и более пронуклеусов служило критерием аномального оплодотворения. Отсутствие пронуклеусов расценивалось как признак несостоявшегося оплодотворения.

Для характеристики репродуктивного потенциала яичников проводилась оценка показателей, которые отражают их функциональный ответ на стимуляцию препаратами Гн. С этой целью были применены наиболее распространенные в настоящее время интегративные параметры овариального ответа: показатель фолликулярного выхода (FORT – follicle output rate), фолликуло-ооцитарный индекс (FOI – follicle-to-oocyte index), индекс чувствительности яичников (OSI – ovarian sensitivity index) [192]. Индекс FORT – это отношение числа преовуляторных фолликулов в день введения триггера овуляции к пулу антральных фолликулов ($\times 100\%$) [192, 193]. Индекс FOI определяют как процентное соотношение количества полученных ОКК к КАФ [192, 194]. Индекс OSI представляет собой отношение количества полученных ОКК к суммарной дозе введенных экзогенных Гн в протоколе овариальной стимуляции ($\times 100\%$) [192, 195].

2.2.7. Особенности эмбриологического этапа при культивировании эмбрионов в различных средах

Эмбрионы у супружеских пар из подгруппы 1 исследования культивировали в одношаговой среде с пониженным содержанием лактата Continuous Single Culture-NX (CSCM-NX) («Fujifilm Irvine Scientific», США), в подгруппе 2

проводили непрерывное культивирование эмбрионов в классической среде на основе бикарбоната G-TL («Vitrolife», Швеция). В обеих подгруппах эмбрионы культивировали в инкубаторе при температуре 37°C и концентрации CO² 6%.

Поскольку производители в официальных аннотациях не раскрывают подробный состав питательных сред, был проведен анализ литературы с поиском информации о концентрации лактата и других веществ в различных коммерческих культуральных средах. В работе Morbeck DE и соавторов был проведен масс-спектрометрический анализ состава одноступенчатых сред, который определил, что концентрация лактата в классической среде G-TL («Витролайф», Швеция) составляет 10,01 мМоль/мл, тогда как в низколактатной среде CSCM-NX («Фуджифильм Ирвайн Сайнтифик, Инк.», США) практически в два раза меньше – 5,71 мМоль/мл [196]. Кроме того, соотношение лактата к пирувату в данных средах является сопоставимым и отражает энергетические потребности эмбриона на разных стадиях его развития [196]. Таким образом, на основании официальной информации от производителей и результатов исследования Morbeck DE и соавторов данные среды были выбраны для культивирования эмбрионов в настоящем исследовании. Морфологическая оценка качества эмбрионов проводилась на 5-е сутки культивирования.

2.2.8. Морфологическая оценка эмбрионов на 5-е сутки культивирования

Морфологическая оценка качества эмбрионов производилась на 5-е сутки культивирования во всех группах согласно классификации Gardner D и соавторов (1999) и методическим рекомендациям РАРЧ (2021) по оценке ооцитов и эмбрионов [197, 198]. Оценка эмбрионов осуществлялась согласно следующим критериям: степень зрелости бластоцист, качество внутриклеточной массы, качество трофэктодермы.

Степень экспансии бластоцисты:

1 – ранняя бластоциста, бластоцель занимает менее 50% объема эмбриона;

- 2 – бластоцель занимает 50% и более объема эмбриона;
- 3 – полная бластоциста, бластоцель полностью заполняет эмбрион, блестящая оболочка не истончена;
- 4 – экспандированная бластоциста, блестящая оболочка истончена;
- 5 – вылупляющаяся бластоциста, трофэктодерма выходит через блестящую оболочку (хетчинг);
- 6 – вылупившаяся бластоциста, полностью освобождена от оболочки, готова к имплантации.

Внутренняя клеточная масса:

- А – большое количество клеток, формирующих плотную массу;
- В – среднее количество клеток, упакованы менее компактно;
- С – значительное снижение количества клеток или их отсутствие.

Трофэктодерма:

- А – плотный эпителий формируется из большого количества плотно прилегающих друг к другу одинаковых клеток округлой формы;
- В – рыхлый эпителий формируется из незначительного количества клеток различного размера;
- С – малое количество дегенеративных клеток.

Согласно морфологическим критериям эмбрионы были разделены на 3 группы:

- «отличного» качества: бластоцисты с внутренней клеточной массой категории А и качеством трофэктодермы категории А-В (эмбрионы 3АА и выше);
- «хорошего» качества: бластоцисты с внутренней клеточной массой категории В и качеством трофэктодермы категории В-С (эмбрионы 3-6 АВ, 3-6 ВА, 1-2 АА);
- «плохого» качества: ранние бластоцисты, бластоцисты с внутренней клеточной массой категории С и качеством трофэктодермы категории С.

В настоящем исследовании в полость матки осуществляли перенос только эмбрионов «отличного» и «хорошего» качества.

2.2.9. Перенос эмбрионов в полость матки.

Особенности ведения пострасферного периода

На 5-е сутки культивирования при отсутствии противопоказаний (отсутствие соматической и внутриматочной патологии, толщина эндометрия менее 7,0 мм) осуществлялся селективный перенос одного эмбриона «отличного» или «хорошего» качества в полость матки в асептических условиях под ультразвуковым контролем с помощью гибкого катетера («Cook», Австралия). Оставшиеся эмбрионы «хорошего» и «отличного» качества криоконсервировали. Кроме того, криоконсервации подвергались эмбрионы тех пациенток, у которых перенос был отменен в связи с наличием противопоказаний на этот момент.

Всем пациенткам начиная с дня проведения ТВП была рекомендована поддержка лютеиновой фазы микронизированным прогестероном в режиме 600 мг в день.

2.2.10. Диагностика наступления беременности и анализ ее исходов

С целью диагностики наступления биохимической беременности пациентки через две недели после переноса эмбриона в полость матки были направлены на лабораторное исследование для определения концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови. При значении показателя β -ХГЧ более 20 мМЕ/мл через три недели после переноса эмбриона для визуализации плодного яйца проводили ультразвуковое исследование. Клиническую беременность подтверждали на сроке 5–6 акушерских недель при определении сердцебиения плода по данным ультразвуковой диагностики [190]. Анализ течения беременности, частоты репродуктивных потерь и родов производился по телефонному звонку.

2.2.11. Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии

На проспективном этапе исследования в возрастной группе женщин 40–42 лет была выделена отдельная подгруппа для проведения дополнительного генетического исследования эмбрионов на анеуплоидии, что позволило провести более расширенный анализ эмбриологических исходов. На 5-е или 6-е сутки культивирования после рассечения лазером прозрачной оболочки (zona pellucida–ZP) бластоцисты производили биопсию от 5 до 10 клеток трофобласта. После биопсии выполняли криоконсервацию бластоцисты. Биоптат, предварительно помещенный в раствор фосфатного буфера, был транспортирован в лабораторию молекулярно-генетических исследований, где образцы содержали при температурных значениях $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. ПГТ-А проводилось методом NGS с применением наборов Ion ReproSeq PGS kits (Термо Фишер Сайнтифик Инк., США).

2.2.12. Статистический анализ полученных данных

Для статистической обработки результатов применялись стандартная программа Microsoft Excel и пакет статистических программ IBM SPSS Statistics v. 27.0.1.0. Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения проверяли согласно тесту Шапиро-Уилка. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные числа N и процентные доли от общего числа пациенток (%). При распределении признаков, отличающихся от нормального, применялись методы непараметрической статистики с указанием медианы, нижней (Q1) и верхней квартили (Q3) – Me [25-й; 75-й перцентили]. При сравнении количественных признаков был применен непараметрический U-критерий Манна-Уитни, а качественных признаков – тест χ^2 Пирсона [22]. Анализ корреляционных связей между качественными и количественными признаками выполнялся с помощью

рангового коэффициента Спирмена. Для оценки тесноты корреляционной связи применяли шкалу Чеддока, согласно которой абсолютные значения $r_{xy} < 0,3$ свидетельствуют о слабой связи, от 0,3 до 0,7 – о связи средней тесноты, $r_{xy} > 0,7$ – о сильной связи. Для определения тесноты связи между бинарными данными определяли отношение шансов (ОШ) и его доверительный интервал (ДИ). Величину порогового уровня значимости p-value принимали равной 0,05 [22].

С целью оценки прогностической значимости параметров овариальной стимуляции FORT, FOI и OSI был проведен ROC-анализ с расчетом площади под кривой (AUC) и 95% доверительного интервала, а также определением чувствительности и специфичности разработанной модели в точке порогового значения. Значение $AUC \geq 0,7$ указывало на хорошую прогностическую ценность. Пороговое значение выбиралось по критерию максимальной суммарной чувствительности и специфичности [192].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Настоящая работа представляет собой двухэтапное исследование с включением пациенток двух возрастных когорт. Для решения задач и достижения поставленной цели на первом этапе было выполнено ретроспективное исследование, на основании результатов которого была сформирована структура проспективного этапа. В клинических исследованиях, посвященных эффективности программ ВРТ, наблюдается выраженная гетерогенность результатов, обусловленная в первую очередь возрастом женщин. Как известно, поздний репродуктивный возраст ассоциирован с неблагоприятными исходами программ ВРТ. Принимая во внимание существенное возрастание риска неудач ЭКО у женщин старше 40 лет, в данном исследовании было проведено разделение пациенток условно на две возрастные группы: 35–39 лет и 40–42 лет. Подобное разделение позволяет учесть особенности репродуктивного потенциала женщин разных возрастных когорт и оценить эффективность модификации эмбрионального этапа для каждой группы.

Первый этап представляет собой ретроспективное исследование, в которое были включены 340 супружеских пар: 200 пар с возрастом женщин от 35 до 39 и 140 пар от 40 до 42 лет, проходивших лечение бесплодия с применением программ ВРТ. В зависимости от выбора среды культивирования эмбрионов в обеих возрастных когортах было проведено разделение на две подгруппы: с применением среды культивирования эмбрионов с пониженным лактатом CSCM-NX («Фуджифильм Ирвайн Сайнтифик, Инк.», США) и одноэтапной классической среды G-TL («Витролайф», Швеция).

Второй этап представляет собой проспективное исследование, в которое вошли 520 супружеских пар с возрастом женщин от 40 до 42 лет, проходивших лечение бесплодия. Случайным образом супружеские пары были разделены на две подгруппы: подгруппа 1 (n=264), где использовалась среда с пониженным содержанием лактата CSCM-NX, и подгруппа 2 (n=256) – одноэтапная классическая среда G-TL [22].

3.1. Результаты ретроспективного этапа исследования с включением женщин позднего репродуктивного возраста

Ретроспективный этап исследования состоял из анализа клинико-анамнестических характеристик, результатов эмбриологического этапа и клинических исходов у пациенток в возрасте от 35 до 42 лет, которые были разделены на две группы в зависимости от возраста – 35–39 и 40–42 лет и культуральной среды, в которой проводилось культивирование эмбрионов.

3.1.1. Клинико-анамнестическая характеристика, включенных в исследование пациенток возрастной группы 35–39 лет

Анализ клинико-анамнестических характеристик пациенток возраста 35–39 лет был начат с оценки возраста и антропометрических характеристик, которая не выявила различий для женщин в обеих подгруппах.

Таблица 3 – Возраст и антропометрические характеристики пациенток группы 35–39 лет

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Возраст, лет	37 [37; 39]	37 [38; 38]	0,77
Рост, см	165 [163; 170]	165 [163; 170]	0,59
Масса тела, кг	61,00 [56,00; 68,00]	62,00 [57,50; 70,00]	0,61
ИМТ, кг/м ²	22,00 [20,00; 24,00]	23,00 [21,00; 25,00]	0,65
Примечание: Me [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни			

Возраст включенных в исследование женщин составил 37 [37; 39] лет для подгруппы 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) и 37 [38; 38] для 2-й подгруппы с классической средой культивирования ($p=0,77$). Не было выявлено статистически значимых различий и в показателях ИМТ (индекс массы тела): для

подгруппы 1 медиана ИМТ равнялась 22,00 [20,00; 24,00], для подгруппы 2–23,00 [21,00; 25,00] ($p=0,65$) (Таблица 3).

Данные о соматической патологии женщин, включенных в исследование, были получены при сборе анамнеза, анализе результатов дополнительных обследований и консультаций врача-терапевта и врачей смежных специальностей при наличии показаний (Таблица 4).

Таблица 4 – Структура соматической заболеваемости пациенток 35–39 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Аллергологический анамнез	11,3% (13/115)	9,4% (8/85)	0,67
Болезни желудочно-кишечного тракта	10,4% (12/115)	8,2% (7/85)	0,62
Болезни дыхательной системы	5,2% (6/115)	3,5% (3/85)	0,57
Болезни сердечно-сосудистой системы	3,5% (4/115)	5,9% (5/85)	0,43
Болезни мочевыделительной системы	2,6% (3/115)	7,1% (6/85)	0,14
Болезни эндокринной системы	18,3% (21/115)	34,1% (29/85)	0,01
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

При анализе соматической заболеваемости пациенток обеих подгрупп выявлены статистически значимые различия по частоте заболеваний эндокринной системы. Так, в подгруппе 2 у 34,1% пациенток анамнез был отягощен заболеваниями эндокринной системы, в частности, патологиями щитовидной железы, тогда как в подгруппе 1 этот показатель составил 18,3% ($p=0,01$). Данные показатели не имеют существенного влияния на исходы ВРТ, так как перед вступлением в программу пациентками было пройдено обследование у профильного специалиста, который не выявил противопоказаний для лечения бесплодия методами ВРТ на основании осмотра и лабораторных показателей. У 10,4% пациенток из подгруппы 1 зарегистрированы заболевания пищеварительной системы (хронический гастрит, синдром раздраженного

кишечника), в подгруппе 2 – у 8,2% ($p=0,62$). Структура заболеваемости сердечно-сосудистой системы представлена такими патологиями как неосложненная варикозная болезнь нижних конечностей и пролапс митрального клапана и не продемонстрировала значимых различий между сравниваемыми группами ($p=0,43$). Хронический цистит наблюдался у трех женщин из подгруппы 1 и у шести женщин из подгруппы 2 ($p=0,14$). Отягощенный аллергоанамнез наблюдался в 11,3% случаев в подгруппе 1 и в 9,4% случаев в подгруппе 2 ($p=0,67$).

Сравнительный анализ параметров менструальной функции и начала половой жизни у исследуемых групп показал отсутствие статистически значимых различий (Таблица 5).

Таблица 5 – Характеристики менструальной функции и начала половой жизни женщин 35–39 лет

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Возраст менархе, лет	13 [13; 14]	13 [12; 14]	0,32
Продолжительность менструального цикла, дни	28 [28; 30]	28 [27; 30]	0,89
Длительность менструальных выделений, дни	5 [4; 5]	5 [4; 5]	0,29
Возраст начала половой жизни	18 [18; 20]	19 [18; 20]	0,10
Примечание: Me [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни			

Возраст менархе не различался в обеих подгруппах и составил 13 лет ($p=0,32$). Были сопоставимы продолжительность и длительность менструального цикла для подгруппы 1 и подгруппы 2. Так, продолжительность менструального цикла для обеих подгрупп составила 28 дней ($p=0,89$), а длительность менструальных выделений – 5 дней ($p=0,29$). Возраст начала половой жизни в подгруппе 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) равен 18 [18; 20], для подгруппы 2 (классическая культуральная среда) – 19 [18; 20] ($p=0,10$).

В обеих подгруппах наблюдалось равномерное распределение частоты выявления гинекологических заболеваний в анамнезе. Частота патологии молочной железы (диффузная кистозная мастопатия, фиброаденома) не различалась в обеих подгруппах, составив 14,8% и 21,2% соответственно ($p=0,24$). В подгруппе 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) инфекции, передающиеся половым путем, в анамнезе имели 15,7% женщин, тогда как в подгруппе 2 (классическая культуральная среда) – 16,5% ($p=0,88$). На основании данных гистологического и иммуногистохимического исследования частота подтвержденного хронического эндометрита составила 14,8% в подгруппе 1 и 9,4% в подгруппе 2 ($p=0,26$). В обеих подгруппах миома матки и миомэктомия в анамнезе оказались наиболее распространенными патологиями в равной степени: частота их встречаемости составила 36,5% в подгруппе с пониженным содержанием лактата и 24,7% в подгруппе с классическим культивированием ($p=0,08$). Частота выявления наружного генитального эндометриоза так же была сопоставимой в обеих подгруппах: 26,1% в подгруппе 1 и 21,2% в подгруппе 2 ($p=0,42$). Частота выявления диффузного аденомиоза I–II степени не имела достоверных межгрупповых различий и равнялась 20,0% у пациенток первой подгруппы (культуральная среда с пониженным лактатом) и 17,6% – у второй (классическая культуральная среда) ($p=0,68$). Наименее распространенными заболеваниями, выявленными в равной степени в обеих подгруппах были цервикальная интраэпителиальная неоплазия, доброкачественные образования яичников и гиперплазия эндометрия (Таблица 6).

Таблица 6 – Гинекологические заболевания у пациенток 35–39 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Патология молочной железы	14,8% (17/115)	21,2% (18/85)	0,24
Инфекции, передающиеся половым путем в анамнезе	15,7% (18/115)	16,5% (14/85)	0,88

Продолжение Таблицы 6

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Хронический эндометрит	14,8 % (17/115)	9,4% (8/85)	0,26
Миома матки, миомэктомия в анамнезе	36,5% (42/115)	24,7% (21/85)	0,08
Наружный генитальный эндометриоз	26,1% (30/115)	21,2% (18/85)	0,42
Диффузный аденомиоз I-II стадии	20,0% (23/115)	17,6% (15/85)	0,68
Доброкачественные образования яичников	5,2% (6/115)	2,4% (2/85)	0,31
Гиперплазия эндометрия	5,2% (6/115)	2,4% (2/85)	0,31
Цервикальная интраэпителиальная неоплазия	5,2% (6/115)	4,7% (4/85)	0,87

Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона

Не было установлено статистически значимых различий в распространенности тех или иных оперативных вмешательств на органах малого таза в анамнезе у женщин исследуемых подгрупп (Таблица 7). Была выявлена высокая частота диагностической гистероскопии в обеих подгруппах, которая проводилась при подозрении на внутриматочную патологию при подготовке пациенток к программе ЭКО. Так, в подгруппе 1 этот показатель составил 51,3%, в подгруппе 2 – 48,2% ($p = 0,67$). Проведение внутриматочного вмешательства с целью полипэктомии отмечено в 33,0% в 1 подгруппе (культуральная среда с пониженным лактатом) и в 27,1% в подгруппе 2 (классическая среда культивирования) ($p=0,36$). У 17,4% пациенток из подгруппы 1 и 14,1% пациенток из подгруппы 2 в анамнезе имелись оперативные вмешательства в объеме резекции яичников или цистэктомии ($p=0,53$).

Таблица 7 – Перенесенные оперативные вмешательства по поводу гинекологических заболеваний у пациенток 35–39 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Диагностическая гистероскопия в анамнезе	51,3% (59/115)	48,2% (41/85)	0,67
Полипэктомия в анамнезе	33,0% (38/115)	27,1% (23/85)	0,36
Оперативные вмешательства на яичниках в анамнезе	17,4% (20/115)	14,1% (12/85)	0,53
Одно- и/или двусторонняя тубэктомия в анамнезе	22,6% (26/115)	12,9% (11/85)	0,08
Сальпингоовариолизис в анамнезе	0,9% (1/115)	2,4% (2/85)	0,39
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

По результатам гистологического исследования образования яичников были классифицированы как доброкачественные. Подгруппы были сопоставимы по частоте встречаемости одно- и/или двусторонней тубэктомии в анамнезе ($p=0,08$). Сальпингоовариолизис с целью разрешения спаечного процесса проводился лишь у одной пациентки из подгруппы 1 и у двух пациенток из подгруппы 2 ($p=0,39$) (Таблица 7).

В ходе анализа репродуктивного анамнеза достоверных различий между исследуемыми группами не было обнаружено (Таблица 8).

Таблица 8 – Репродуктивный анамнез пациенток 35–39 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Самопроизвольные выкидыши	13,9% (16/115)	5,9% (5/85)	0,07
Эктопическая беременность	16,5% (19/115)	8,2% (7/85)	0,08
Неразвивающаяся беременность	20,0% (23/115)	20,0% (17/85)	1,00

Продолжение Таблицы 8

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Роды в анамнезе	18,3% (21/115)	27,1% (23/85)	0,14
Медицинский аборт	22,6% (26/115)	16,5% (14/85)	0,28
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Отмечено, что 19 пациенток из подгруппы 1 (16,5%) и 7 пациенток из подгруппы 2 (8,2%) имели в анамнезе эктопическую беременность ($p=0,08$). В обеих подгруппах была выявлена высокая частота неразвивающейся беременности, составившая 20,0% для обеих подгрупп ($p=1,00$). Самопроизвольное прерывание беременности было в 13,9% случаев в подгруппе 1 и в 5,9% в подгруппе 2 ($p=0,07$), частота искусственного прерывания беременности в анамнезе – в 22,6% и в 16,5% соответственно ($p=0,28$). Частота родов в подгруппе 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) составила 18,3%, в подгруппе 2 (классическая среда культивирования) – 27,1% ($p=0,14$) (Таблица 8).

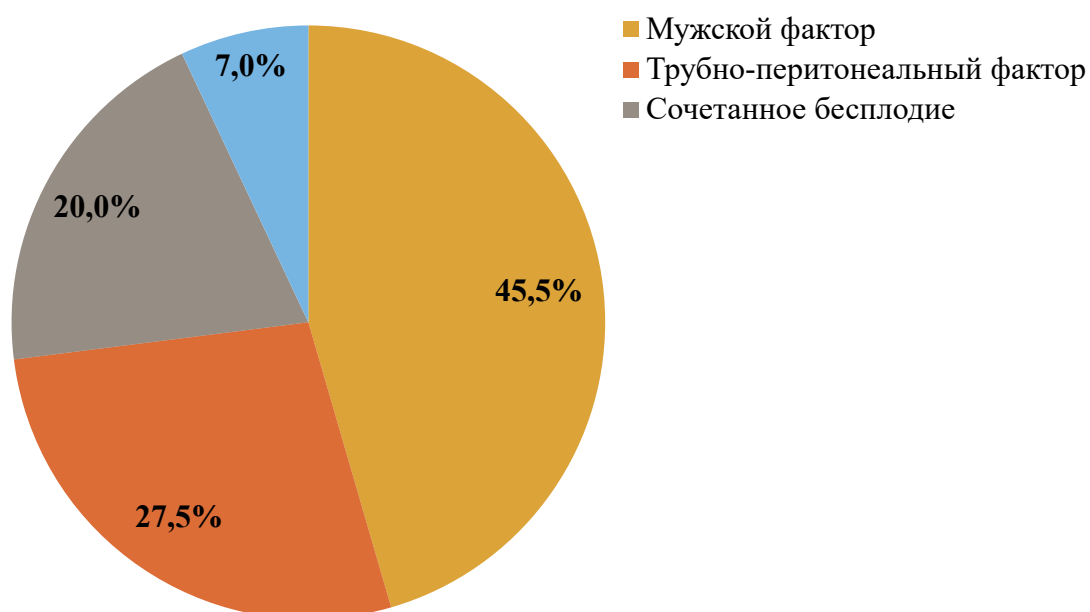


Рисунок 3 – Факторы бесплодия супружеских пар в возрастной группе женщин 35–39 лет

В структуре бесплодия обеих подгрупп данной возрастной когорты преобладали мужской (45,5%) и трубно-перитонеальный (27,5%) факторы, сочетание различных факторов было отмечено в 20% случаев, а доля бесплодия неясного генеза составила 7,0% (Рисунок 3).

При межгрупповом анализе факторов бесплодия среди исследуемых групп не было выявлено статистически значимых различий. Согласно полученным данным мужской фактор бесплодия составил 42,6% в подгруппе 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) и 49,4% в подгруппе 2 (классическая культуральная среда) ($p=0,34$). Трубно-перитонеальный фактор был выявлен в 32,2% случаев в подгруппе 1 и в 21,2% случаев в подгруппе 2 ($p=0,09$), бесплодие неясного генеза – в 6,1% и 8,2% соответственно ($p=0,56$). Сочетание нескольких факторов бесплодия встречалось у 22 пациенток из 1 подгруппы (19,1%) и у 18 пациентов из 2 подгруппы (21,2%) (Таблица 9).

Таблица 9 – Факторы бесплодия супружеских пар в возрастной группе женщин 35–39 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Трубно-перитонеальный фактор	32,2% (37/115)	21,2% (18/85)	0,09
Мужской фактор	42,6% (49/115)	49,4% (42/85)	0,34
Неясный генез	6,1% (7/115)	8,2% (7/85)	0,56
Сочетанное бесплодие	19,1% (22/115)	21,2% (18/85)	0,72
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Анализ длительности бесплодия показал, что медианное значение в подгруппе с пониженным лактатом (подгруппа 1) составляет 6 лет [3;10], а в группе с классической средой (подгруппа 2) – 5 лет [3;7,5] ($p=0,13$). При этом в обеих группах преобладающим являлось вторичное бесплодие. В подгруппе 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) первичное бесплодие выявлено у 39,1%, вторичное – у 60,9% женщин. Для подгруппы 2 (классическая среда

культивирования) первичное и вторичное бесплодие составили 47,1% и 52,9% соответственно (Рисунок 4).

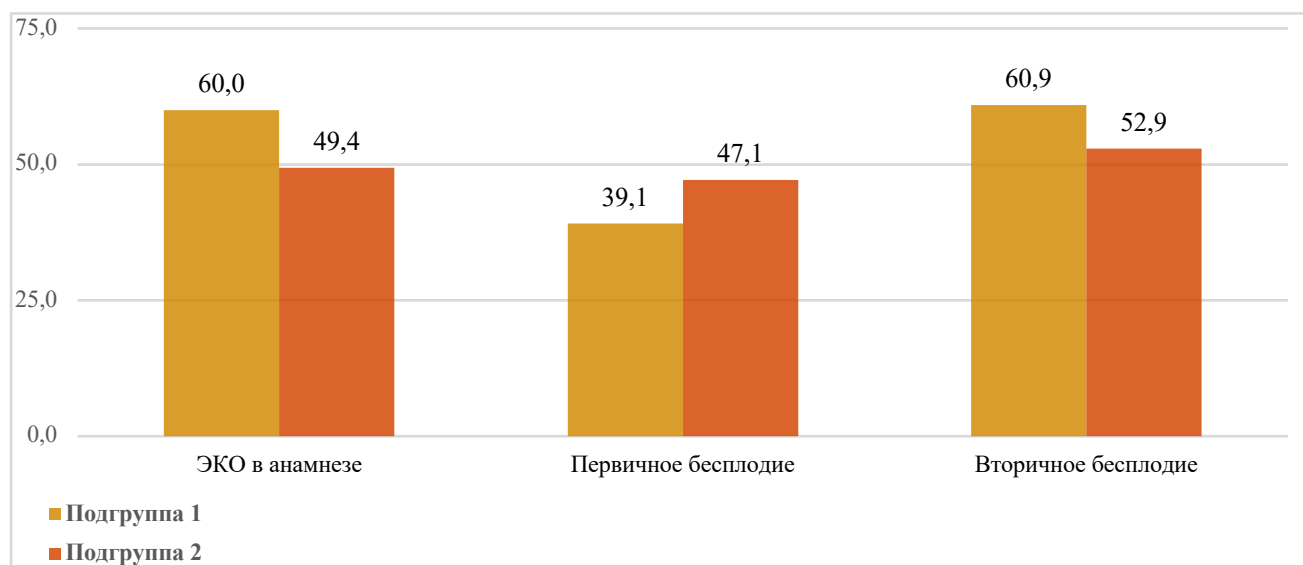


Рисунок 4 – Структура и продолжительность бесплодия в исследуемых подгруппах у пациенток 35–39 лет, включенных в исследование

Ранее лечение бесплодия с помощью ЭКО в подгруппе 1 проходили 60,0% (69/115) женщин, в то время как во второй подгруппе – 49,4% (42/85) женщин (Таблица 10).

Таблица 10 – Анализ структуры и продолжительности бесплодия у пациенток 35–39 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Длительность бесплодия, лет *	6 [3; 10]	5 [3; 7,5]	0,13
Первичное бесплодие**	39,1% (45/115)	47,1% (40/85)	0,26
Вторичное бесплодие**	60,9% (70/115)	52,9% (45/85)	0,26
Попытки ЭКО в анамнезе**	60,0% (69/115)	49,4% (42/85)	0,14
Примечание: * Me [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни, **абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Овариальный резерв оценивали по концентрациям АМГ, ФСГ и числу КАФ. Статистического различия между подгруппами по уровням АМГ и ФСГ

не обнаружено ($p=0,62$ и $p=0,88$ соответственно). КАФ также не имел значимых межгрупповых расхождений ($p=0,77$) (Таблица 11).

Таблица 11 – Показатели овариального резерва пациенток 35–39 лет

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
АМГ, нг/мл	1,56 [1,15; 2,60]	1,60 [1,05; 2,55]	0,62
ФСГ, ЕД/л	7,40 [5,87; 8,63]	7,20 [6,00; 8,68]	0,88
КАФ	8,0 [6,0; 11,0]	8,0 [6,00; 10,0]	0,77
Примечание: Ме [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни			

3.1.2. Клинико-anamнестическая характеристика включенных в исследование пациенток возрастной группы 40–42 лет

Анализ клинико-anamнестических характеристик пациенток возрастной когорты 40–42 лет был начат с оценки возраста и антропометрических показателей. В таблице 12 представлены антропометрические характеристики женщин, включенных в исследование.

Таблица 12 – Возраст и антропометрические характеристики пациенток 40–42 лет

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
Возраст, лет	41 [40; 41]	41 [40; 42]	0,28
ИМТ, кг/м ²	22,85 [21,50; 24,61]	22,82 [20,88; 24,54]	0,74
Примечание: Ме [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни			

Возраст женщин основной и контрольной подгруппы исследования достоверно не различался ($p=0,28$). ИМТ был сопоставим для обеих подгрупп, и составил для 1 подгруппы 22,85 [21,50; 24,61] и 22,82 [20,88; 24,54] для

подгруппы 2. В ходе анализа данных по соматической заболеваемости значимых отличий между исследуемыми подгруппами выявлено не было. Наибольший удельный вес приходился на болезни эндокринной системы – у 17,1% пациенток из подгруппы 1 и у 15,7% из подгруппы 2, однако межгрупповая разница не достигала порогового уровня значимости ($p=0,82$). Структура заболеваемости эндокринной системы была представлена гипотиреозом и аутоиммунным тиреоидитом, которые были медикаментозно компенсированы. Второе место по распространенности занимали заболевания пищеварительной системы, которые были диагностированы у 7,1% пациенток в подгруппе 1 и 8,6% женщин во подгруппе 2 ($p=0,75$) (Таблица 13).

Таблица 13 – Структура соматической заболеваемости пациенток 40–42 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
Аллергологический анамнез	12,9% (9/70)	12,9% (9/70)	1,00
Болезни желудочно-кишечного тракта	7,1% (5/70)	8,6% (6/70)	0,75
Болезни дыхательной системы	1,4% (1/70)	2,9% (2/70)	0,56
Болезни сердечно-сосудистой системы	1,4% (1/70)	1,4% (1/70)	1,00
Болезни мочевыделительной системы	4,3% (3/70)	7,1% (5/70)	0,45
Болезни эндокринной системы	17,1% (12/70)	15,7% (11/70)	0,82
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

У пациенток обеих подгрупп отсутствовали статистически значимые различия параметров менструального цикла. Продолжительность менструального цикла для обеих подгрупп составила 28 дней ($p=0,52$), длительность менструальных выделений – 5 дней ($p=0,82$) (Таблица 14).

Таблица 14 – Характеристики менструальной функции и начала половой жизни пациенток 40–42 лет

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
Возраст менархе, лет	13 [12; 14]	13 [12; 14]	0,93
Продолжительность менструального цикла, дни	28 [27; 28,25]	28 [27,75; 28]	0,52
Длительность менструальных выделений, дни	5 [4; 5]	5 [4; 5]	0,82
Возраст начала половой жизни	19 [18; 20]	19 [18; 20]	0,71
Примечание: Me [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни			

При изучении анамнестических данных не было выявлено различий в частоте встречаемости гинекологических заболеваний между двумя подгруппами.

Таблица 15 – Гинекологические заболевания у пациенток 40–42 лет (%, n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
Патология молочной железы	22,9% (16/70)	17,1% (12/70)	0,40
Инфекции, передающиеся половым путем в анамнезе	15,1% (11/70)	8,6% (6/70)	0,20
Хронический эндометрит	10,0% (7/70)	12,9% (9/70)	0,60
Миома матки, миомэктомия в анамнезе	35,7% (25/70)	40,0% (28/70)	0,60
Наружный генитальный эндометриоз	14,3% (10/70)	14,3% (10/70)	1,00
Диффузный аденомиоз I-II стадии	21,4% (15/70)	14,3% (10/70)	0,27
Доброкачественные образования яичников	2,9% (2/70)	1,4% (1/70)	0,56
Гиперплазия эндометрия	4,3% (3/70)	2,9% (2/70)	0,65
Цервикальная интраэпителиальная неоплазия	1,4% (1/70)	2,9% (2/70)	0,56
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

При сравнении частоты гинекологических заболеваний между подгруппами статистически значимых различий не обнаружено. Так, распространенность инфекций, передаваемых половым путем, оказалась сопоставимой ($p=0,20$). Хронический эндометрит по данным гистологического исследования верифицирован у 10% женщин из подгруппы 1 и у 12,9% – подгруппы 2 ($p=0,60$), а гиперплазия эндометрия зарегистрирована лишь у трех и двух пациенток соответственно ($p=0,65$). По частоте встречаемости преобладала миома матки и миомэктомия в анамнезе: 35,7% для подгруппы 1 и 40,0% для подгруппы 2 ($p=0,60$). Доброкачественные заболевания молочных желез ранее диагностированы у 22,9% женщин из подгруппы 1 и у 17,1% из подгруппы 2 ($p=0,40$). Диффузный аденомиоз I–II стадии встречался чаще в подгруппе 1 (21,4%), чем в подгруппе 2 (14,3%), однако различие не достигло статистической значимости ($p=0,27$). Наружный генитальный эндометриоз имел одинаковую частоту в обеих группах – 14,3%. Детальная информация о перенесенных гинекологических заболеваниях представлена в таблице 15.

Так как все участницы исследования проходили более тщательное гинекологическое обследование с целью диагностики причин бесплодия по сравнению с женщинами, реализовавшими репродуктивную функцию, закономерным наблюдением было то, что в обеих подгруппах наблюдалась высокая частота диагностической гистероскопии ($p=0,53$). Около четверти пациенткам в каждой подгруппе производилось внутриматочное вмешательство с целью полипэктомии ($p=0,70$). Оперативные вмешательства на яичниках (резекция яичников или цистэктомия) по поводу доброкачественных образований были проведены у 11,4% пациенток из 1 подгруппы, и у 14,3% пациенток из 2 подгруппы ($p=0,61$). Тубэктомия в связи с наличием гидросальпинкса или трубной беременностью в подгруппе 1 перенесли 9, а в подгруппе 2 – 13 женщин ($p=0,35$). С целью восстановления проходимости маточных труб сальпинговариолизис был проведен лишь трем женщинам из подгруппы 2, и двум женщин из 1 подгруппы ($p=0,65$) (Таблица 16).

Таблица 16 – Перенесенные оперативные вмешательства по поводу гинекологических заболеваний у пациенток 40–42 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
Диагностическая гистероскопия в анамнезе	22,9% (16/70)	18,6% (13/70)	0,53
Полипэктомия в анамнезе	27,1% (19/70)	24,3% (17/70)	0,70
Оперативные вмешательства на яичниках в анамнезе	11,4% (8/70)	14,3% (10/70)	0,61
Одно- и/или двусторонняя тубэктомия в анамнезе	12,9% (9/70)	18,6% (13/70)	0,35
Сальпингоовариолизис в анамнезе	2,9% (2/70)	4,3% (3/70)	0,65
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Наиболее частым исходом беременностей в изучаемых подгруппах были роды, которые наблюдались у 31,4% и 28,6% женщин из подгруппы 1 и подгруппы 2 соответственно ($p=0,71$) (Таблица 17).

Таблица 17 – Репродуктивный анамнез у пациенток 40–42 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
Самопроизвольные выкидыши	11,4% (8/70)	5,7% (4/70)	0,23
Эктопическая беременность	7,1% (5/70)	8,6% (6/70)	0,75
Неразвивающаяся беременность	18,6% (13/70)	25,7% (18/70)	0,31
Роды в анамнезе	31,4% (22/70)	28,6% (20/70)	0,71
Медицинский аборт	18,6% (13/70)	27,1% (19/70)	0,23
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Была выявлена высокая частота неразвивающейся беременности в обеих подгруппах (18,6% и 25,7% соответственно $p=0,31$). К искусственному прерыванию беременности обращались 18,6% женщин из подгруппы 1 и 27,1%

женщин из подгруппы 2 ($p=0,23$). Самопроизвольные выкидыши в анамнезе были отмечены у 8 из 70 пациенток из подгруппы 1, и лишь у 4 из 70 подгруппы 2, но статистических различий получено не было ($p=0,23$). Частота трубной беременности для 1 и 2 подгрупп составила 7,1% и 8,6% соответственно ($p=0,75$) (Таблица 17).

При обобщении данных о частоте встречаемости различных факторов бесплодия не обнаружено достоверных различий. Бесплодие, связанное с нарушением мужской фертильности, оказалось наиболее распространенным среди обеих подгрупп и составило 45,7% для 1 подгруппы и 35,7% для подгруппы 2 ($p=0,23$). Частота трубно-перитонеального фактора оказалась сопоставимой в обеих подгруппах: 27,1% против 31,4% ($p=0,58$). Сочетанное бесплодие встречалось в 20,0% и 22,9% случаев соответственно. Бесплодие неясного генеза диагностировалось реже остальных – у 7,1% женщин первой группы и у 10,0% второй ($p=0,55$) (Таблица 18).

Таблица 18 – Факторы бесплодия супружеских пар в возрастной группе женщин 40–42 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
Трубно-перитонеальный фактор	27,1% (19/70)	31,4% (22/70)	0,58
Мужской фактор	45,7% (32/70)	35,7% (25/70)	0,23
Неясный генез	7,1% (5/70)	10,0% (7/70)	0,55
Сочетанное бесплодие	20,0% (14/70)	22,9% (16/70)	0,68
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Структура всех причин бесплодия у включенных в исследование супружеских пар отражена на рисунке 5.

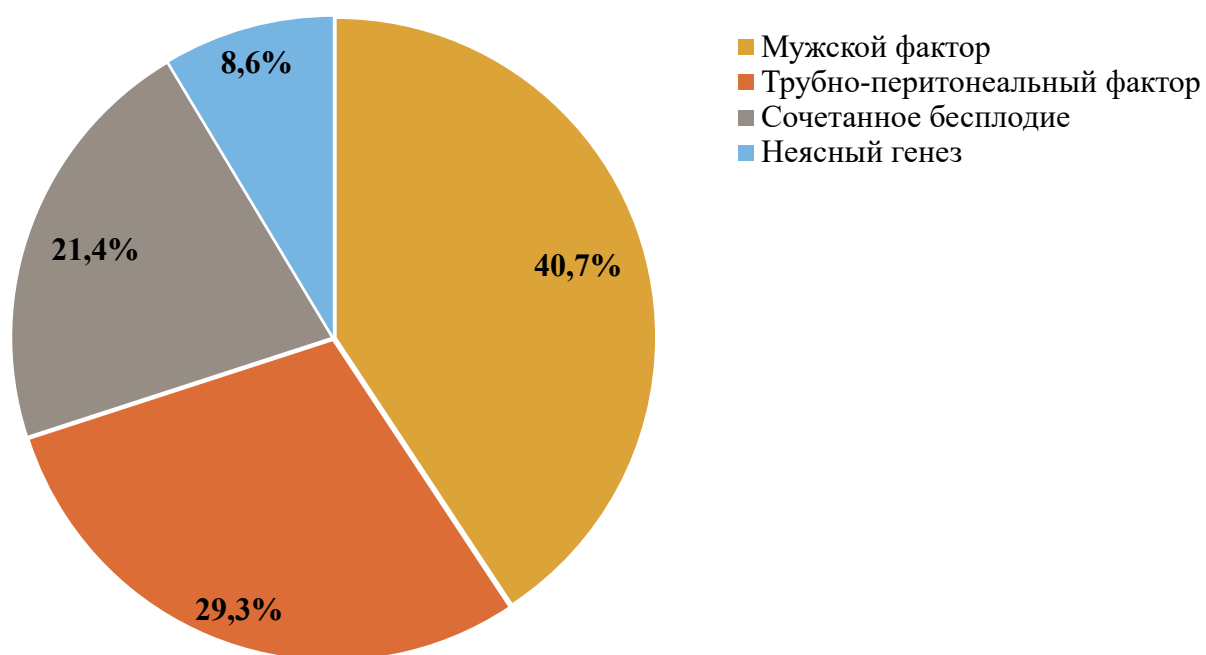


Рисунок 5 – Факторы бесплодия супружеских пар в возрастной группе женщин 40–42 лет

Анализ структуры и продолжительности бесплодия в обеих подгруппах представлен в таблице 19.

Таблица 19 –Анализ структуры и продолжительности бесплодия у пациенток 40–42 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
Длительность бесплодия, лет *	5 [3; 9,25]	4 [2; 7]	0,28
Попытки ЭКО в анамнезе**	52,9% (37/70)	61,4% (43/70)	0,31
Беременность в анамнезе, наступившая после ЭКО**	4,3% (3/70)	12,9% (9/70)	0,07
Первичное бесплодие**	38,6% (27/70)	44,3% (31/70)	0,49
Вторичное бесплодие**	61,4% (43/70)	55,7% (39/70)	0,49
Примечание: * Ме [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни, **абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Длительность бесплодия была сопоставима между двумя подгруппами ($p=0,28$). Процент вторичного бесплодия преобладал над первичным в обеих подгруппах, составив 61,4% для подгруппы 1 и 55,7% для подгруппы 2. К лечению бесплодия с помощью программ ЭКО прибегали 52,9% пациенток из 1 подгруппы. В подгруппе 2 программы ЭКО в анамнезе были проведены у 61,4% женщин (Рисунок 6).

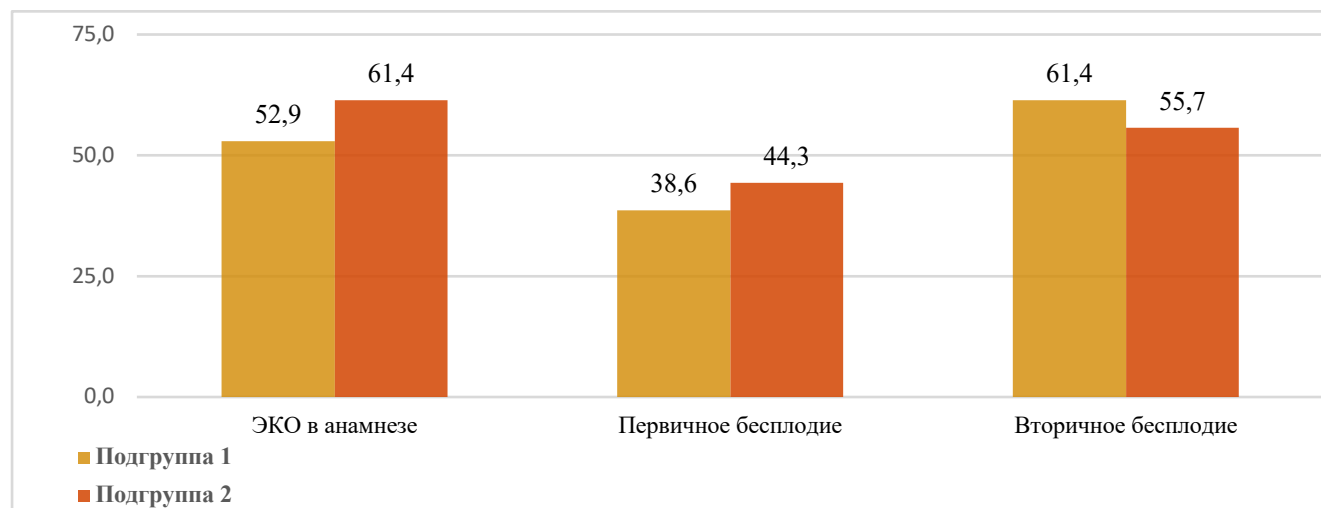


Рисунок 6 – Структура и продолжительность бесплодия в исследуемых подгруппах у пациенток 40–42 лет

Между исследуемыми подгруппами был проведен сравнительный анализ параметров гормонального профиля, который не выявил достоверных различий (Таблица 20).

Таблица 20 – Показатели овариального резерва пациенток 40–42 лет

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
АМГ, нг/мл	1,4 [0,95; 2,01]	1,3 [0,8; 2,6]	0,92
ФСГ, МЕ/л	7,6 [6,1; 9,6]	7,25 [6,3; 9,2]	0,74
КАФ	6,0 [5,0; 9,0]	7,0 [5,0; 9,0]	0,42
Примечание: Me [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни			

3.1.3. Результаты клинического и эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин возрастной группы 35–39 лет

Данные, полученные в ходе анализа клинико-анамнестических параметров, позволили перейти к сравнению показателей овариальной стимуляции и эмбриологического этапа между исследуемыми группами в группе женщин в возрасте 35–39 лет (Таблица 21).

Таблица 21 – Показатели результатов овариальной стимуляции и эмбриологического этапа у пациенток 35–39 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Количество дней овариальной стимуляции*	9 [8; 10]	9 [8; 10]	0,16
Суммарная доза гонадотропинов в протоколе овариальной стимуляции, МЕ*	1800 [1425; 2025]	1650 [1412; 2100]	0,75
Количество ОКК*	5 [4; 9]	5 [4; 7]	0,98
Количество МП*	4 [3; 6]	4 [3; 6]	0,65
Количество 2pN*	3 [2; 5]	4 [2; 5]	0,61
% зрелых клеток МП*	83,3 [66,7; 100,0]	83,3 [66,7; 100,0]	0,72
% бластуляции*	50,0 [33,3; 66,7]	50,0 [33,3; 66,7]	0,60
Количество бластоцист*	2 [1; 3]	2 [1; 3]	0,46
Криоконсервация бластоцист**	51,3% (59/115)	56,5% (48/85)	0,47
Примечание: * Ме [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни, **абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Длительность овариальной стимуляции не имела статистически значимых различий между подгруппами и составила 9 [8; 10] дней ($p=0,16$). Суммарная доза препаратов Гн в протоколе овариальной стимуляции для 1 подгруппы

(культуральная среда с пониженным лактатом) составила 1800 [1425; 2025], для подгруппы 2 (классическая культуральная среда) – 1650 [1412; 2100] ME ($p=0,75$). В среднем в подгруппе 1 было получено 5 [4; 9] ОКК, как и в подгруппе 2 – 5 [4; 7] ($p=0,98$). Количество полученных ооцитов на стадии развития МП было равным для обеих подгрупп и составило 4 [3; 6] ($p=0,65$). Процент полученных зрелых ооцитов, число зигот 2pN и частота бластуляции также статистически не различались между двумя подгруппами. В обеих подгруппах исследования был получен одинаковый средний показатель количества бластоцист, составивший 2 [1; 3]. Частота криоконсервации бластоцист была высокой в обеих подгруппах и составила 51,3% (59/115) в первой подгруппе и 56,5% (48/85) во второй подгруппе ($p=0,47$) (Таблица 21).

3.1.4. Результаты клинического и эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин возрастной группы 40–42 лет

В таблице 22 представлены сравнительные данные показателей овариальной стимуляции и эмбриологического этапа между исследуемыми подгруппами женщин возрастной когорты 40–42 лет. Продолжительность овариальной стимуляции была сопоставима между двумя подгруппами исследования, составив 9 [8; 10] дней ($p=0,92$). Суммарная доза Гн в протоколе овариальной стимуляции была также сопоставима: для подгруппы 1 она составила 2175 [1800; 2718,75], а для подгруппы 2 – 2100 [1743,75; 2700] ME ($p=0,46$). При сравнительном анализе числа полученных ОКК, ооцитов МП, зигот 2pN в обеих подгруппах достоверных различий получено не было. В подгруппе культивирования с пониженным содержанием лактата наблюдалось статистически значимое увеличение частоты бластуляции по сравнению с подгруппой с традиционным культивированием ($p=0,04$). При сопоставлении подгрупп выявлено статистически значимое

увеличение количества бластоцист ($p=0,046$), а также более высокая частота их криоконсервации в подгруппе 1 по сравнению с подгруппой 2 ($p=0,04$).

Таблица 22 – Показатели результатов овариальной стимуляции эмбриологического этапа у пациенток 40-42 лет

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
Количество дней овариальной стимуляции*	9 [8; 10]	9 [8; 10]	0,92
Суммарная доза гонадотропинов в протоколе овариальной стимуляции, МЕ*	2175 [1800; 2718,75]	2100 [1743,75; 2700]	0,46
Количество ОКК*	4 [3; 7]	5 [3; 7]	0,53
Количество МП*	4 [2; 6]	4 [2; 5]	0,98
Количество 2pN*	3 [2; 4]	3 [2; 4]	0,96
% зрелых клеток МП*	88,19 [75,00; 100,0]	83,3 [66,7; 100,0]	0,26
% бластуляций*	66,67 [50,00; 100,00]	50,0 [36,46; 76,25]	0,04
Количество бластоцист*	2 [1; 2]	1 [1; 2]	0,046
Криоконсервация бластоцист**	58,6% (41/70)	41,4% (29/70)	0,04
Примечание: * Ме [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни, **абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

3.1.5. Сравнительный анализ соматического и гинекологического анамнеза, частоты оперативных вмешательств, параметров овариального резерва и результатов эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у женщин 35–39 и 40–42 лет

При сравнении двух возрастных когорт не было выявлено различий в распространенности соматических и гинекологических заболеваний. При анализе гинекологического анамнеза было выявлено, что частота проведенных гистероскопий в группе женщин 35–39 лет была выше по сравнению с пациентками

40–42 лет ($<0,01$). Были выявлены статистически значимо более высокие показатели овариального резерва у пациенток более молодого возраста, что является предсказуемым результатом. Уровень АМГ составил 1,6 [1,1; 2,6] нг/мл у пациенток 35–39 лет и 1,4 [0,9; 2,5] нг/мл у пациенток 40–42 лет ($p=0,008$). Статистически значимой разницы в уровне ФСГ среди обеих возрастных групп получено не было ($p=0,26$). При ультразвуковом исследовании органов малого таза было отмечено закономерно большее КАФ в группе женщин 35–39 лет, которое составило 8,0 [6,0; 10,0] по сравнению с группой женщин 40–42 лет, где этот показатель равнялся 7,0 [5,0; 9,0] ($p<0,01$). При анализе результатов эмбриологического этапа в группе 1 по сравнению с группой 2 было получено статистически значимо большее количество ОКК, зрелых ооцитов и зигот 2pN ($p=0,02$, $p=0,04$ и $p<0,01$ соответственно) и количество бластоцист ($p=0,048$) (Таблица 23).

Таблица 23 – Результаты сравнительного анализа соматического и гинекологического анамнеза, показателей овариального резерва и эмбриологического этапа у пациенток 35–39 лет и 40–42 лет

Параметр	Группа 1 (пациентки 35-39 лет) n=200	Группа 2 (пациентки 40-42 лет) n=140	p-value
Болезни желудочно-кишечного тракта	9,5% (19/200)	7,9% (11/140)	0,60
Болезни дыхательной системы	4,5% (9/200)	2,1% (3/140)	0,25
Болезни сердечно-сосудистой системы	4,5% (9/200)	1,4% (2/140)	0,12
Болезни мочевыделительной системы	4,5% (9/200)	5,7% (8/140)	0,61
Болезни эндокринной системы	25,0% (50/200)	16,4% (23/140)	0,06
Патология молочной железы	17,5% (35/200)	20,0% (28/140)	0,56
Инфекции, передающиеся половым путем в анамнезе	16,0% (32/200)	12,1% (17/140)	0,32
Хронический эндометрит	12,5% (25/200)	11,4% (16/140)	0,77

Продолжение Таблицы 23

Параметр	Группа 1 (пациентки 35-39 лет) n=200	Группа 2 (пациентки 40-42 лет) n=140	p-value
Миома матки, миомэктомия в анамнезе	31,5% (63/200)	37,9% (53/140)	0,22
Наружный генитальный эндометриоз	24,0% (48/200)	14,3% (20/140)	0,03
Диффузный аденомиоз I-II стадии	19,0% (38/200)	17,9% (25/140)	0,79
Доброкачественные образования яичников	4,0% (8/200)	2,1% (3/140)	0,34
Гиперплазия эндометрия	4,0% (8/200)	3,6% (5/140)	0,84
Цервикальная интраэпителиальная неоплазия	5,0% (10/200)	2,1% (3/140)	0,18
Гистероскопия в анамнезе	50,0% (100/200)	20,7% (29/140)	<0,01
Полипэктомия в анамнезе	30,5% (61/200)	25,7% (36/140)	0,34
Оперативные вмешательства на яичниках в анамнез	16,0% (32/200)	12,9% (18/140)	0,42
Одно- и/или двусторонняя тубэктомия в анамнезе	18,5% (37/200)	15,7% (22/140)	0,50
Сальпингоовариолизис в анамнезе	1,5% (3/200)	3,6% (5/140)	0,21
АМГ, нг/мл	1,6 [1,1; 2,6]	1,4 [0,9; 2,5]	<0,01
ФСГ, МЕ/л	7,4 [5,9; 8,7]	7,4 [6,3; 9,3]	0,26
КАФ	8,0 [6,0; 10,0]	7,0 [5,0; 9,0]	<0,01
Количество ОКК	5 [4; 8]	5 [3; 7]	0,02
Количество МП	4 [3; 6]	4 [2; 5]	0,04
Количество 2pN	4 [2; 5]	3 [2; 4]	<0,01
Количество бластоцист	2 [1; 3]	1 [1; 2]	0,048
Примечание: Me [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни			

3.1.6. Исходы программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин возрастной группы 35–39 лет

Перенос эмбрионов был выполнен 115 пациенткам из подгруппы 1 (культуральная среда с пониженным лактатом), в подгруппе 2 (классическая культуральная среда) – 85. При культивировании в среде с пониженным содержанием лактата (подгруппа 1) частота биохимических беременностей, которые не состоялись клинически и которые можно расценивать как преимплантационные потери, составила 7,0% (8/115), при традиционном культивировании – 4,7% (4/85), однако полученные данные статистически сопоставимы ($p=0,51$) (Таблица 24).

Таблица 24 – Клинические исходы лечения бесплодия методами ВРТ у пациенток 35–39 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=115	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=85	p-value
Частота клинической беременности расчете на перенос эмбриона	43,5% (50/115)	32,9% (28/85)	0,13
Частота ранних репродуктивных потерь в расчете на перенос эмбриона	15,7% (18/115)	7,1% (6/85)	0,06
Частота живорождения в расчете на перенос эмбриона	27,8% (32/115)	25,9% (22/85)	0,76
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Статистически значимых различий по частоте наступления клинической беременности между подгруппами не выявлено: 43,5% в группе 1 и 32,9% в группе 2 ($p=0,13$). Частота ранних репродуктивных потерь в подгруппе 1 оказалась незначительно выше, чем в подгруппе 2 (15,7% и 7,1% соответственно), при этом различия также не были достоверными ($p=0,06$). Частота живорождения из расчета

на перенос эмбриона в обеих подгруппах не имела статистически значимых различий. В первой подгруппе родами завершились 32 программы из 115, что составило 27,8%, в то время как во второй подгруппе роды произошли в 22 из 85 циклов переноса, что соответствует 25,9% ($p=0,76$) (Таблица 24).

3.1.7. Исходы программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин возрастной группы 40–42 лет

Перенос эмбриона был выполнен всем 140 участницам обеих подгрупп. Исходы программ ВРТ у исследуемых подгрупп представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Клинические исходы лечения бесплодия у пациенток 40–42 лет (% , n)

Параметр	Подгруппа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=70	Подгруппа 2 (классическая культуральная среда) n=70	p-value
Частота клинической беременности расчете на перенос эмбриона	15,7% (11/70)	10,0% (7/70)	0,31
Частота ранних репродуктивных потерь в расчете на перенос эмбриона	4,3% (3/70)	4,3% (3/70)	1,00
Частота живорождения в расчете на перенос эмбриона	11,4% (8/70)	5,7% (4/70)	0,23
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

При сравнении клинических исходов программ ЭКО между исследуемыми подгруппами пациенток возрастной когорты 40–42 лет не было обнаружено статистически значимых различий. Частота биохимической беременности не различалась и составила 4,3% (3/70) и 5,7% (4/70) для подгрупп 1 и 2 соответственно ($p=0,70$). Однако стоит отметить, что у пациенток из 1 подгруппы (культуральная среда с пониженным лактатом) частота наступления клинической

беременности была выше в 1,5 раза, чем у женщин подгруппы 2 (классическая культуральная среда) (15,7% против 10,0%). Также при культивировании эмбрионов в среде с пониженным содержанием лактата частота живорождения из расчета на перенос была вдвое выше по сравнению с традиционным культивированием (11,4% против 5,7%).

Таким образом, на ретроспективном этапе настоящего исследования был проведен анализ результатов программ ВРТ у пациенток разных возрастных когорт. Было установлено, что применение культуральной среды с пониженным лактатом приводило к улучшению показателей эмбриологического этапа у пациенток 40–42 лет, но не влияло на исходы у пациенток 35–39 лет. Полученные результаты явились основанием для проведения проспективного исследования.

3.2. Результаты проспективного этапа исследования

Анализ ретроспективного этапа с получением достоверной разницы в результатах эмбриологического этапа и клинических исходов в группе женщин 40–42 лет при модификации эмбрионального этапа стал основой для проведения проспективного этапа настоящего исследования с включением 520 супружеских пар с возрастом женщин 40–42 лет, проходивших лечение бесплодия с применением программы ЭКО [22]. Случайным образом супружеские пары были разделены на две группы: группа 1 (n=264), в которой использовалась среда с пониженным содержанием лактата CSCM-NX, и группа 2 (n=256) – одноэтапная классическая среда G-TL. Для оценки эффективности культивирования эмбрионов в среде с пониженной концентрацией лактата был проведен анализ клинико-анамнестических параметров, показателей овариальной стимуляции и клинических исходов программ ЭКО [22].

3.2.1. Клинико-anamнестическая характеристика пациенток, участвующих в проспективном этапе исследования

Возраст женщин не различался в обеих группах исследования и составил 41 [40; 42] год ($p=0,18$). Антропометрические данные также оказались сопоставимы: ИМТ в группе 1 составил 23 [22; 24], в группе 2–22,7 [21; 24] ($p=0,65$) (Таблица 26).

Таблица 26 – Возраст и антропометрические характеристики пациенток 40-42 лет, включенных в проспективный этап исследования

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
Возраст, лет	41 [40; 42]	41 [40; 42]	0,18
ИМТ, кг/м ²	23 [22; 24]	22,7 [21; 24]	0,65
Примечание: Me [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни			

При анализе соматического анамнеза не было получено статистически значимых различий в частоте заболеваний дыхательной и эндокринной систем ($p=0,15$ и $0,22$). Статистически значимые различия получены в частоте заболеваний сердечно-сосудистой, пищеварительной и мочевыделительной систем. В группе 1 не выявлено случаев заболеваний сердечно-сосудистой системы, тогда как во второй группе у 5 пациенток наблюдалось неосложненная варикозная болезнь нижних конечностей ($p=0,02$). Заболевания пищеварительной системы, представленные хроническим гастритом, статистически чаще встречались у пациенток из групп 2 ($p=0,04$). Следует подчеркнуть, что с наибольшей частотой в обеих группах встречались заболевания эндокринной системы, обусловленные гипотиреозом, узловым и диффузным зобом и аутоиммунным тиреоидитом (Таблица 27).

Таблица 27 – Структура соматической заболеваемости пациенток 40–42 лет, включенных в проспективный этап исследования (% , n)

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
Аллергологический анамнез	4,5% (12/264)	7% (18/256)	0,22
Болезни желудочно-кишечного тракта	4,5% (12/264)	9% (23/256)	0,04
Болезни дыхательной системы	0% (0/264)	0,8% (2/256)	0,15
Болезни сердечно-сосудистой системы	0% (0/264)	2% (5/256)	0,02
Болезни мочевыделительной системы	3% (8/264)	7,8% (20/256)	0,02
Болезни эндокринной системы	14,8% (39/264)	18,8% (48/256)	0,22
Примечание: Данные представлены в виде абсолютного числа пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Возраст менархе и возраст начала половой жизни были сопоставимы в обеих группах ($p=0,59$ и $0,68$ соответственно). Для группы 1 продолжительность цикла составляла 28 [27; 28] дней, для группы 2 также – 28 [26; 28] ($p=0,07$). Длительность менструальных выделений была одинаковой и составила 5 [4; 5] дней (Таблица 28).

Таблица 28 – Характеристики менструальной функции и начала половой жизни женщин 40–42 лет, включенных в проспективный этап исследования

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
Возраст менархе, лет	13 [12; 14]	13 [13; 14]	0,59
Продолжительность менструального цикла, дни	28 [27; 28]	28 [26; 28]	0,07
Длительность менструальных выделений, дни	5 [4; 5]	5 [4; 5]	0,37
Возраст начала половой жизни	19 [18; 20]	19 [18; 20]	0,68
Примечание: Данные представлены в виде абсолютного числа пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Анализ гинекологического анамнеза пациенток, включенных в исследование, выявил преобладание миомы матки и случаев миомэктомии в обеих группах. В 1 группе миома матки и миомэктомия в анамнезе были отмечены у 99 пациенток (37,5%), в то время как в группе 2 – у 113 участниц (44,1%) ($p=0,12$). Доброкачественные болезни молочной железы выявлялись в 22,3% случаев в группе 1 и в 19,1% – в группе 2 ($p=0,37$). Хронический эндометрит, подтвержденный гистологическим и иммуногистохимическим исследованием, встречался с одинаковой частотой в обеих группах ($p=0,10$). Инфекции, передающиеся половым путем, в анамнезе были выявлены у 25 из 264 женщин в группе 1 и у 38 из 256 в группе 2 ($p=0,12$). Наружный генитальный эндометриоз встречался в равной степени в обеих группах, составив 12,9% и 14,8% соответственно ($p=0,52$). Диффузный аденомиоз I-II степени распространенности встречался статистически значимо чаще в первой группе, составив 24,2% (64/264), в то время как во второй группе этот показатель составил лишь 15,6% (40/256) ($p=0,01$) (Таблица 29).

Таблица 29 – Гинекологические заболевания у пациенток 40–42 лет, включенных в проспективный этап исследования (% , n)

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
Патология молочной железы	22,3% (59/264)	19,1% (49/256)	0,37
Инфекции, передающиеся половым путем в анамнезе	9,5% (25/264)	14,8% (38/256)	0,12
Хронический эндометрит	9,5% (25/264)	14,1% (36/256)	0,10
Миома матки, миомэктомия в анамнезе	37,5% (99/264)	44,1% (113/256)	0,12
Наружный генитальный эндометриоз	12,9% (34/264)	14,8% (38/256)	0,52
Диффузный аденомиоз I-II стадии	24,2% (64/264)	15,6% (40/256)	0,01

Продолжение Таблицы 29

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
Доброкачественные образования яичников	3,0% (8/264)	2,7% (7/256)	0,84
Гиперплазия эндометрия	4,5% (12/264)	2,3% (6/256)	0,17
Цервикальная интраэпителиальная неоплазия	1,1% (3/264)	3,1% (8/256)	0,11
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Цервикальная интраэпителиальная неоплазия встречалась лишь у 3 из 264 пациенток из 1 группы и у 8 из 256 пациенток из 2 группы. Наименее распространенными заболеваниями, наблюдаемыми в обеих группах, были доброкачественные образования яичников и гиперплазия эндометрия, частота которых была сопоставима ($p=0,84$ и $p=0,17$ соответственно) (Таблица 29).

При анализе данных о перенесенных оперативных вмешательствах на органах малого таза обращает на себя внимание высокая частота встречаемости полипэктомии: в группе 1 показатель составил 26,5%, а в группе 2–23,8% ($p=0,47$). Резекция яичников по поводу доброкачественных новообразований была выполнена у 12,5% из группы 1 и 14,5% из группы 2 ($p=0,51$). Гистероскопии с диагностической целью ранее проводилась у 17,0% женщин в группе 1 и 21,5% в группе 2 ($p=0,20$). Частота тубэктомии в группе 2 была статистически значимо выше по сравнению с группой 1, где данный показатель составил 12,5% ($p=0,03$). Сальпингоовариолизис продемонстрировал наименьшую распространенность в структуре оперативных вмешательств в обеих группах, составив 2,3% в группе 1 и 5,5% в группе 2 ($p=0,06$). В таблице 30 представлены данные о перенесенных оперативных вмешательствах в обеих группах.

Таблица 30 – Перенесенные оперативные вмешательства по поводу гинекологических заболеваний у пациенток 40–42 лет, включенных в проспективный этап исследования (% , n)

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
Гистероскопия в анамнезе	17,0% (45/264)	21,5% (55/256)	0,20
Полипэктомия в анамнезе	26,5% (70/264)	23,8% (61/256)	0,47
Резекция яичников в анамнезе	12,5% (33/264)	14,5% (37/256)	0,51
Одно- и/или двусторонняя тубэктомия в анамнезе	12,5% (33/264)	19,5% (50/256)	0,03
Сальпингоовариолизис в анамнезе	2,3% (6/264)	5,5% (14/256)	0,06

Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона

Анализ репродуктивного анамнеза выявил наличие родов у 33,3% пациенток из группы 1 и у 29,7% из группы 2 ($p=0,37$). Частота наступления беременностей в анамнезе после ЭКО составила 8% и 12,5% для группы 1 и 2 соответственно ($p=0,09$). Искусственное прерывание беременности статистически чаще встречалось во 2 группе (28,5% против 20,5%, $p=0,03$). Сопоставимые данные были получены для неразвивающейся беременности – 23,5% и 24,2% для 1 и 2 групп соответственно ($p=0,84$) и самопроизвольного прерывания беременности – 6,1% и 9% для 1 и 2 групп соответственно ($p=0,21$). У 10,5% (27/256) женщин из группы 2 в анамнезе была эктопическая беременность, тогда как в 1 группе этот показатель был ниже и составил 6,1% (16/264) (Таблица 31).

Таблица 31 – Репродуктивный анамнез пациенток 40–42 лет, включенных в проспективный этап исследования (% , n)

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
Самопроизвольные выкидыши	6,1% (16/264)	9% (23/256)	0,21
Эктопическая беременность	6,1% (16/264)	10,5% (27/256)	0,06
Неразвивающаяся беременность	23,5% (62/264)	24,2% (62/256)	0,84
Роды в анамнезе	33,3% (88/264)	29,7% (76/256)	0,37
Медицинский аборт	20,5% (54/264)	28,5% (73/256)	0,03
Беременности, наступившие после ЭКО	8,0% (21/264)	12,5% (32/256)	0,09
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

Анализ структуры бесплодия в двух группах не показал статистически значимых различий. В структуре факторов бесплодия преобладал мужской фактор, который встречался с одинаковой частотой в обеих группах: 46,2% в группе 1 и 47,3% в группе 2 ($p=0,81$). На втором месте по распространенности находился трубно-перитонеальный фактор бесплодия, составив 20,8% и 22,7% для групп 1 и 2 соответственно ($p=0,61$). Частота сочетания мужского и трубно-перитонеального факторов бесплодия была незначительно выше в группе 1 по сравнению с группой 2 (17,4% против 13,3%, $p=0,19$). Бесплодие неясного генеза встречалось в 10,6% случаев в 1 группе и в 11,7% в 2 группе ($p=0,69$). Наименьшую распространенность имел эндокринный фактор бесплодия, который был зарегистрирован лишь у 4,9% пациенток первой группы и 5,1% второй группы ($p=0,94$) (Таблица 32, Рисунок 7).

Таблица 32 – Факторы бесплодия супружеских пар, включенных в проспективный этап исследования (% , n)

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
Мужской фактор	46,2% (122/264)	47,3% (121/256)	0,81
Трубно-перитонеальный фактор	20,8% (55/264)	22,7% (58/256)	0,61
Сочетанное бесплодие	17,4% (46/264)	13,3% (34/256)	0,19
Неясный генез	10,6% (28/264)	11,7% (30/256)	0,69
Эндокринный фактор	4,9% (13/264)	5,1% (13/256)	0,94
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

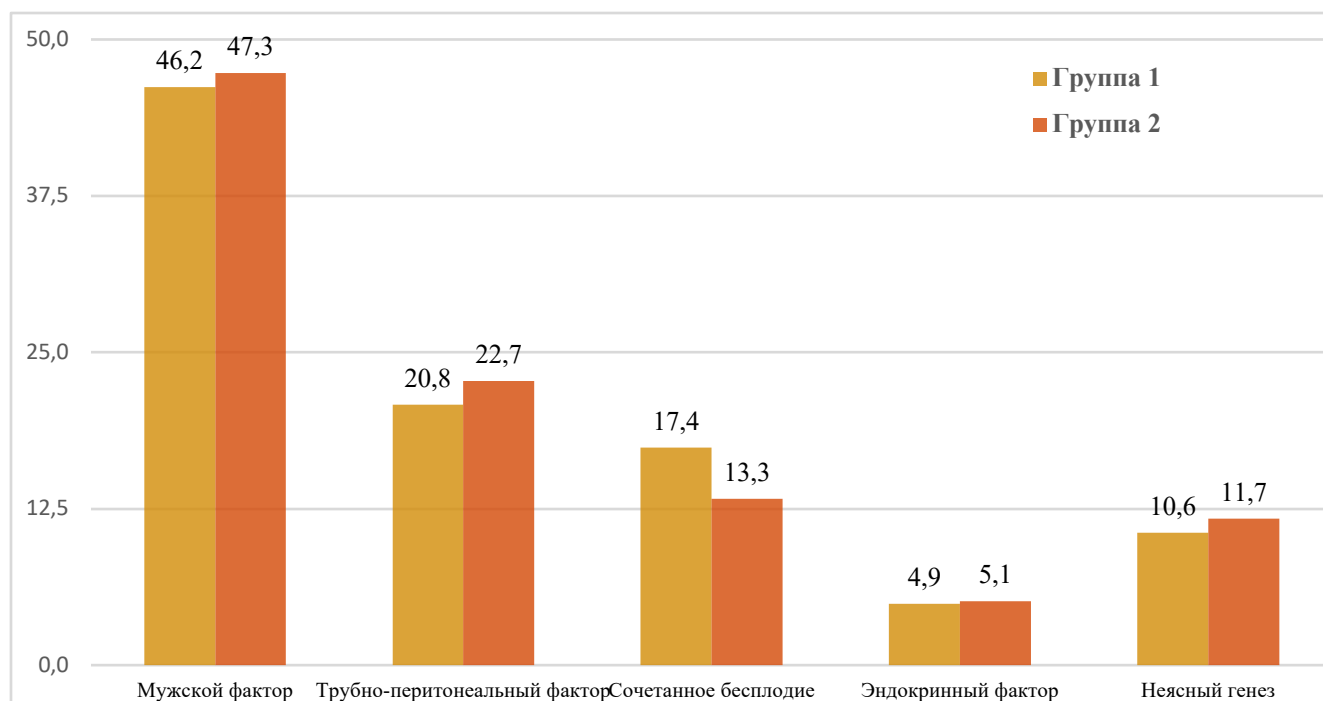


Рисунок 7 – Факторы бесплодия супружеских пар, включенных в проспективный этап исследования

Продолжительность бесплодия была сопоставима в обеих группах исследования ($p=0,11$). В анамнезе у 59,5% пациенток первой группы и у 60,9% пациенток второй группы имелись программы ЭКО ($p=0,73$). При этом в среднем у каждой пациентки в обеих группах было по 2 [1; 3] попытки ЭКО ($p=0,77$).

Частота вторичного бесплодия среди женщин обеих групп была выше, чем частота первичного бесплодия (61,9% против 38,1%) (Таблица 33, Рисунок 8).

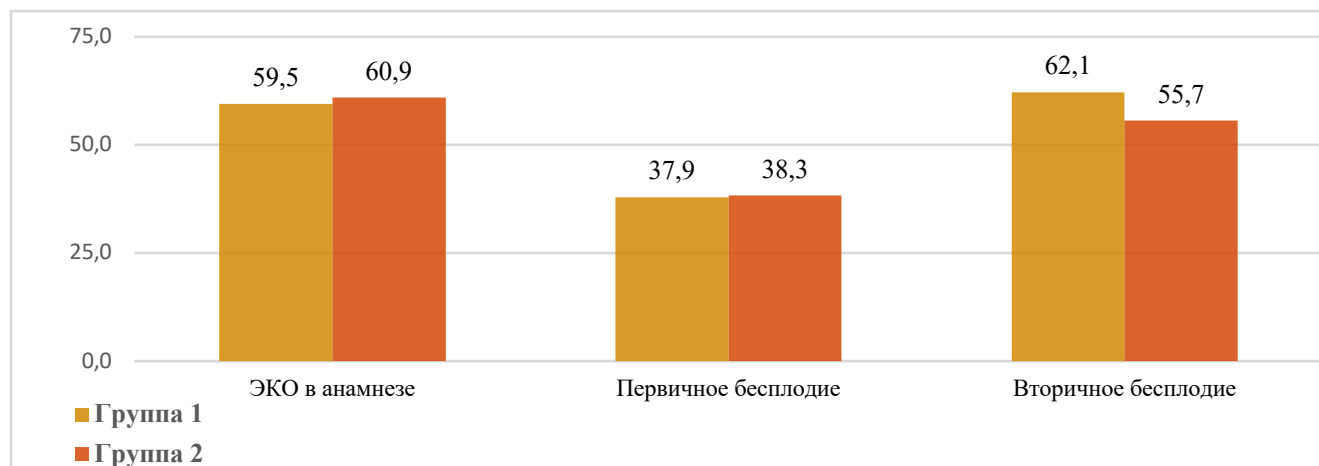


Рисунок 8 – Структура и продолжительность бесплодия у пациенток 40–42 лет, включенных в проспективный этап исследования

Таблица 33 – Анализ структуры и продолжительности бесплодия у пациенток 40–42 лет, включенных в проспективный этап исследования (% , n)

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
Длительность бесплодия, лет *	5 [2,13; 8]	4 [2; 7]	0,11
Количество попыток ЭКО*	2 [1; 3]	2 [1; 3]	0,77
Попытки ЭКО в анамнезе**	59,5% (157/264)	60,9% (156/256)	0,73
Первичное бесплодие**	37,9% (100/264)	38,3% (98/256)	0,93
Вторичное бесплодие**	62,1% (164/264)	61,7% (158/256)	0,93
Примечание: * Me [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни, **абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

При изучении гормональных показателей овариального резерва были получены статистически сопоставимые данные (Таблица 34).

Таблица 34 – Показатели овариального резерва пациенток 40–42 лет, включенных в проспективный этап исследования

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
АМГ, нг/мл	1,1 [0,7; 2,2]	1,2 [0,6; 2,0]	0,50
ФСГ, МЕ/л	8,0 [6,2; 9,5]	7,5 [6,4; 9,1]	0,50
КАФ	6,0 [4,0; 9,0]	6,0 [5,0; 8,0]	0,63
Примечание: Ме [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни			

Уровень АМГ составил 1,1 [0,7; 2,2] и 1,2 [0,6; 2,0] нг/мл для 1 и 2 групп соответственно ($p=0,50$). В группе 1 уровень ФСГ был равен 8,0 [6,2; 9,5] МЕ/л, в группе 2 – 7,5 [6,4; 9,1] МЕ/л ($p=0,50$). КАФ статистически не различалось в группах, составив 6,0 [4,0; 9,0] для группы 1 и 6,0 [5,0; 8,0] для группы 2 ($p=0,63$).

3.2.2. Результаты клинического и эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин, участвующих в проспективном этапе исследования

Следующим этапом после подробного анализа клинико-анамнестических данных было изучение результатов овариальной стимуляции и эмбриологического этапа при культивировании эмбрионов в классической культуральной среде и среде с пониженным содержанием лактата в когорте женщин позднего репродуктивного возраста. Длительность овариальной стимуляции статистически значимо не различалась – 9 [8; 10] дней в обеих группах ($p=0,19$). Суммарная доза препаратов Гн не различалась между группами и составила для группы 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) 2050 [1800; 2475] МЕ, для группы 2 (классическая культуральная среда) – 2100 [1800; 2625] МЕ ($p=0,72$). Не было получено статистически значимых различий в количестве ОКК, которое составило 4 [2; 8] в группе 1 и 4 [2; 7] в группе 2 ($p=0,14$). Количество зрелых ооцитов

не различалось в обеих группах и составило 3 [2; 6] ($p=0,08$). Анализ количества зигот 2pN и частоты зрелых ооцитов не выявил различий в обеих группах ($p=0,20$ и $p=0,49$ соответственно) (Таблица 35).

Таблица 35 – Показатели результатов овариальной стимуляции и эмбриологического этапа у пациенток 40-42 лет, включенных в проспективный этап исследования (% , n)

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value
Количество дней овариальной стимуляции*	9 [8; 10]	9 [8; 10]	0,19
Суммарная доза гонадотропинов в протоколе овариальной стимуляции, МЕ*	2050 [1800; 2475]	2100 [1800; 2625]	0,72
Количество ОКК*	4 [2; 8]	4 [2; 7]	0,14
Количество МП*	3 [2; 6]	3 [2; 6]	0,08
Количество 2pN*	3 [2; 5]	3 [1; 5]	0,20
% зрелых клеток МП*	83,7 [70,2; 100,0]	92,3 [66,7; 100,0]	0,49
% оплодотворения*	62,3% [53,1; 70,5]	60,8% [50,7; 84,1]	0,09
% бластуляции*	39,0 [31,0; 62,8]	31,1 [28,6; 43,4]	0,045
Количество бластоцист*	1 [1; 3]	1 [1; 2]	0,04
Криоконсервация бластоцист**	28,0% (74/264)	14,1% (36/256)	<0,01
Примечание: * Ме [Q25-Q75], U-критерий Манна-Уитни, **абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона			

В группе 1, где культивирование эмбрионов проводилось в среде с пониженным содержанием лактата, процент бластуляции был статистически значимо выше и составил 39,0% [31,0; 62,8], тогда как в группе 2 – 31,1% [28,6; 43,4] ($p=0,045$). Анализ показал достоверное увеличение количества бластоцист «хорошего» и «отличного» качества в группе 1 по сравнению с группой 2 ($p=0,04$). Культивирование эмбрионов в культуральной среде с пониженным содержанием лактата было ассоциировано с повышением частоты криоконсервации бластоцист

в 2 раза по сравнению с группой 2 ($p < 0,01$) [22]. Оценка остальных исходов эмбриологического этапа не выявила статистически значимых различий при культивировании в обеих средах. Аномальное оплодотворение было отмечено у 2,3% пациенток в группе 1 и у 1,6% в группе 2 ($p = 0,56$). В условиях культивирования в среде с пониженным лактатом были получены эмбрионы «низкого» качества у 5,3% (14/264) пациенток, в классической среде – у 3,1% (8/256) ($p = 0,22$) (Таблица 35).

На следующем этапе исследования с целью углубленного анализа репродуктивного потенциала пациенток возраста 40–42 лет была проведена оценка параметров овариального резерва, параметров овариальной стимуляции и функциональных индексов овариальной стимуляции с определением их прогностической значимости в отношении живорождения путем ROC-анализа (Таблица 36, Рисунок 9).

Таблица 36 – Прогностическая ценность показателей овариального резерва, параметров овариальной стимуляции, индексов FORT, FOI и OSI в отношении живорождения у пациенток 40-42 лет, включенных в проспективный этап исследования

Параметр	AUC	95% ДИ	Порог	Чувствительность	Специфичность
Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264					
АМГ	0,68	0,57-0,80	0,54	94,7	82,4
ФСГ	0,38	0,26-0,49	4,51	84,2	93,9
КАФ	0,70	0,58-0,82	3,50	94,7	83,2
Количество преовуляторных фолликулов	0,74	0,64-0,84	3,50	94,7	63,4
FOI	0,66	0,48-0,76	0,45	94,7	84,7
FORT	0,74	0,66-0,83	0,69	100	77,1
OSI	0,62	0,48-0,76	0,78	94,7	85,5

Продолжение Таблицы 36

Параметр	AUC	95% ДИ	Порог	Чувствительность	Специфичность
Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256					
АМГ	0,65	0,49-0,81	0,75	91,7	76,8
ФСГ	0,45	0,28-0,61	5,35	83,3	90,9
КАФ	0,67	0,52-0,82	4,40	91,7	82,9
Количество преовуляторных фолликулов	0,73	0,62-0,85	4,50	91,7	62,2
FOI	0,66	0,53-0,78	0,41	91,7	82,3
FORT	0,84	0,72-0,96	0,73	91,7	79,3
OSI	0,69	0,55-0,84	1,25	91,7	70,1
Примечание: AUC – площадь под кривой, ДИ – доверительный интервал					

Согласно проведенному анализу было показано, что индекс FORT обладал достаточно высокой точностью в прогнозировании живорождения в обеих группах (Рисунок 9) [192].

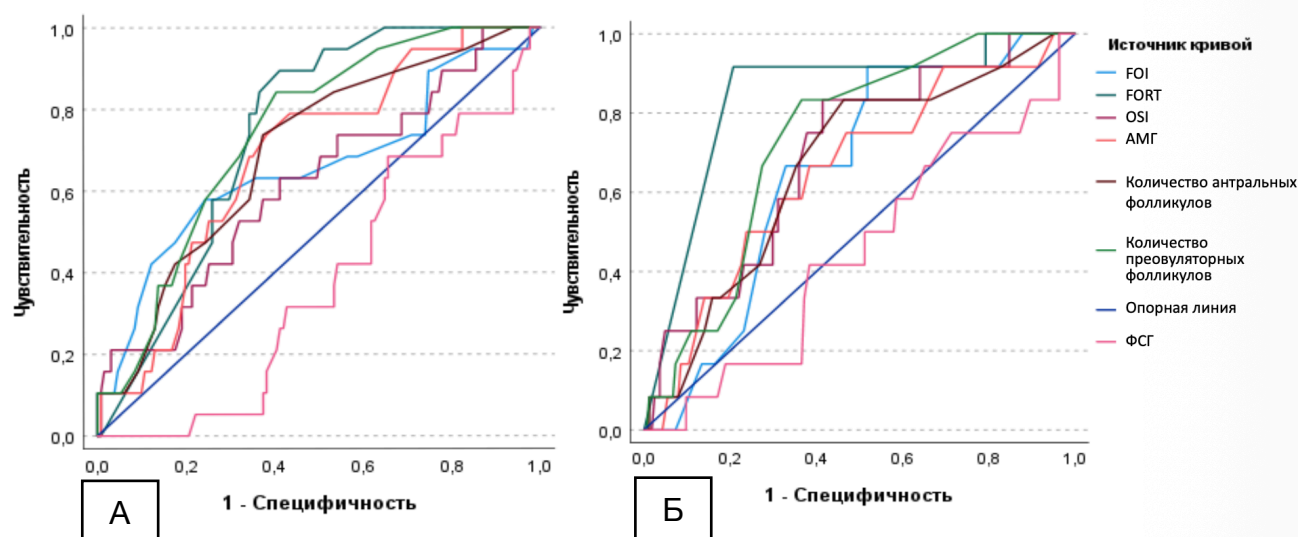


Рисунок 9 – Прогнозирование живорождения в результате программ ВРТ у пациенток 40-42 лет из группы 1 (9А) и группы 2 (9Б)

В группе 1 площадь под ROC-кривой составила 0,74 (95% ДИ 0,66-0,83), при пороговом значении данного параметра 0,69 чувствительность составила – 100%, специфичность – 77,1% (Рисунок 9А). В группе 2 площадь под ROC-кривой составила 0,84 (95% ДИ 0,72-0,96), при пороговом значении данного параметра 0,73 чувствительность составила – 91,7%, специфичность – 79,3% (Рисунок 9Б). В то же время остальные параметры не показали высокой ценности в прогнозировании живорождения у пациенток 40–42 лет, включенных в исследование (Таблица 36) [192].

Таким образом, анализ эмбриологического этапа показал, что применение среды культивирования с пониженным лактатом у пациенток позднего репродуктивного возраста 40–42 лет приводит к достоверному увеличению частоты формирования бластоцист и увеличению их количества по сравнению с классической средой.

3.2.3. Исходы программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от среды культивирования эмбрионов у женщин, участвующих в проспективном этапе исследования

Всего было осуществлено 312 переносов эмбрионов в полость матки из 520 отобранных супружеских пар, из них 136 переносов выполнены в группе 1, где культивирование эмбрионов проводилось в среде с низким содержанием лактата, и 176 – в группе 2 с применением классической культуральной среды. Частота отмены переноса эмбриона в полость матки по причине остановки его в развитии в группе 2 составила 24,2%, а в группе 1 лишь 14,7% ($p < 0,01$). Частота наступления клинической беременности в расчете на цикл ЭКО в группе 1 была статистически значимо выше по сравнению с группой 2 ($p = 0,02$; ОШ=1,88; 95% ДИ: 1,07; 3,31). При этом преимплантационные потери были зарегистрированы у 5 пациенток в группе 1 и у 4 – в группе 2 ($p = 0,46$). Частота живорождения в расчете на цикл овариальной стимуляции в группе 1 составила 7,2%, а в группе 2 – 4,7%, однако

значимые различия отсутствовали ($p=0,22$; ОШ=1,58; 95% ДИ: 0,75; 3,32) (Таблица 37, Рисунок 10).

Таблица 37 – Исходы лечения бесплодия методами ВРТ у пациенток 40–42 лет, включенных в проспективный этап исследования (% , n)

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value	ОШ (95% ДИ)
Частота отмены переноса по причине остановки эмбрионов в развитии, %	14,7% (39/264)	24,2% (62/256)	<0,01	0,54 (95% ДИ:0,35; 0,85)
Частота клинической беременности в расчете на цикл овариальной стимуляции, %	14,4% (38/264)	8,2% (21/256)	0,02	1,88 (95% ДИ:1,07; 3,31)
Частота живорождения в расчете на наступление беременности, %	50% (19/38)	57,1% (12/21)	0,59	0,75 (95% ДИ:0,26; 2,19)
Частота живорождения в расчете на цикл овариальной стимуляции	7,2% (19/264)	4,7% (12/256)	0,22	1,58 (95% ДИ:0,75; 3,32)
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона, ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал				

При оценке конечных точек исследования было отмечено статистически значимое увеличение частоты наступления клинической беременности при культивировании эмбрионов в низколактатной культуральной среде до 27,9% по сравнению с классической средой в расчете на перенос эмбриона (11,9%, $p<0,01$). Частота ранних репродуктивных потерь в расчете на перенос эмбриона была статистически выше в группе 1 и составила 14,0% против 5,1% ($p<0,01$). Были получены статистически значимые различия в частоте родов в расчете на перенос эмбриона с их увеличением в группе 1, где культивирование эмбрионов проводилось в среде с пониженным содержанием лактата, до 14,0% (19/136) по сравнению с группой 2 (классическая среда культивирования), где данный показатель составил лишь 6,8% ($p<0,01$) (Таблица 38, Рисунок 10) [22].

Таблица 38 – Анализ результатов лечения бесплодия методами ВРТ у пациенток 40-42 лет, включенных в проспективный этап исследования (% , n)

Параметр	Группа 1 (культуральная среда с пониженным лактатом) n=264	Группа 2 (классическая культуральная среда) n=256	p-value	ОШ (95% ДИ)
Частота клинической беременности в расчете на перенос эмбриона	27,9% (38/136)	11,9% (21/176)	<0,01	2,86 (95% ДИ: 1,59; 5,16)
Частота ранних репродуктивных потерь в расчете на перенос эмбриона	14,0% (19/136)	5,1% (9/176)	<0,01	3,01 (95% ДИ: 1,32; 6,89)
Частота живорождения в расчете на перенос эмбриона	14,0% (19/136)	6,8% (12/176)	<0,01	2,22 (95% ДИ: 1,04; 4,75)
Примечание: абсолютное число пациенток и доля от общего числа пациенток в %, тест χ^2 Пирсона, ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал				

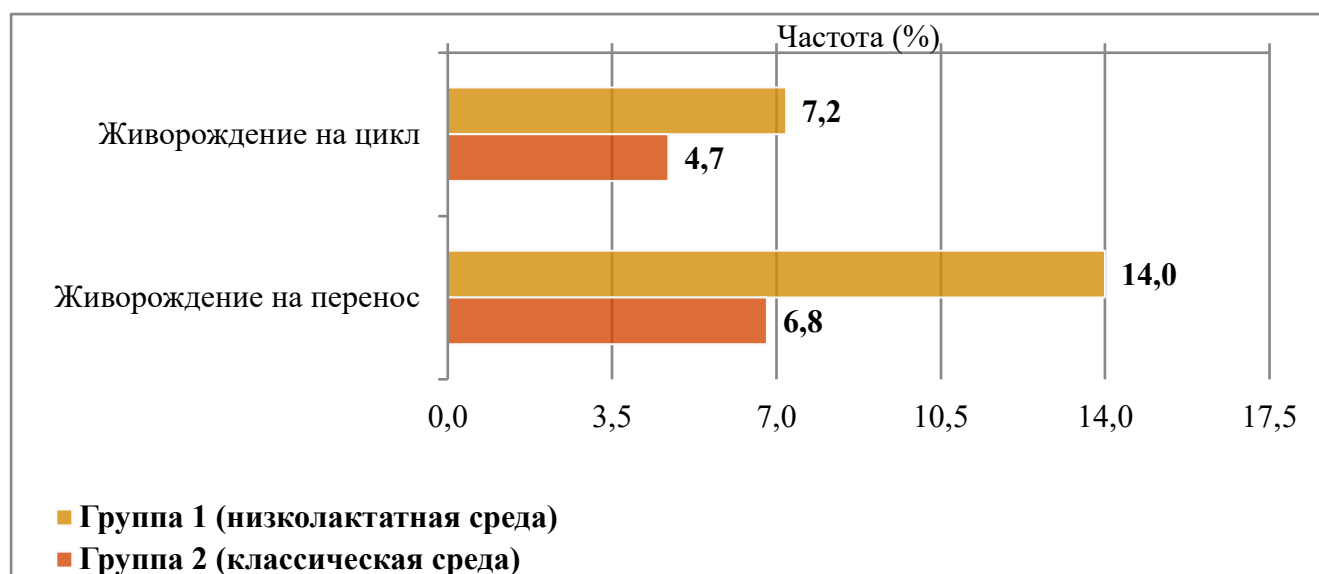


Рисунок 10 – Анализ исходов ВРТ при культивировании эмбрионов у пациенток 40–42 лет, включенных в проспективный этап исследования

Таким образом, анализ клинических исходов ВРТ показал, что культивирование эмбрионов в среде с пониженным содержанием лактата у женщин 40–42 лет приводит к статистически значимому повышению частоты наступления клинической беременности в расчете как на цикл овариальной стимуляции, так

и на перенос эмбриона, а также достоверному повышению частоты живорождения в расчете на перенос эмбриона.

3.2.4. Корреляционный анализ параметров эмбриологического этапа с параметрами овариальной стимуляции и исходами программ вспомогательных репродуктивных технологий у женщин позднего репродуктивного возраста

Для оценки вклада показателей овариального резерва в исходы программ ЭКО у пациенток обеих возрастных когорт был проведен расчет коэффициента корреляции показателя АМГ, как статистически значимого критерия, с клиническими исходами с использованием непараметрического метода ранговой корреляции по Спирмену. По результатам анализа была получена прямая положительная связь уровня АМГ с частотой наступления клинической беременности ($r=0,14$, $p<0,01$). При этом анализ не выявил связи между уровнем данного гормона с другими клиническими исходами.

С целью оценки роли показателей овариальной стимуляции на эмбриологический этап был проведен общий корреляционный анализ в обеих группах с применением непараметрического метода ранговой корреляции по Спирмену. Согласно полученным результатам, была определена прямая корреляционная связь длительности овариальной стимуляции с количеством полученных ОКК ($r=0,32$, $p<0,01$), зрелых ооцитов ($r=0,33$, $p<0,01$), зигот 2pN ($r=0,33$, $p<0,01$) и бластоцист ($r=0,25$, $p<0,01$). Подобные, но более слабые положительные корреляционные связи, были получены при изучении взаимосвязи общей дозы препаратов в протоколе овариальной стимуляции с количеством полученных ОКК ($r=0,22$, $p<0,01$), зрелых ооцитов ($r=0,27$, $p<0,01$), зигот 2pN ($r=0,30$, $p<0,01$) и бластоцист ($r=0,17$, $p<0,01$).

3.2.5. Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии

На этапе морфологической оценки бластоцисты «хорошего» и «отличного» качества у 74 (28,0%) пациенток из группы 1 и у 36 (14,0%) пациенток из группы 2 были подвергнуты криоконсервации. Из них 32 пациенткам из группы 1 и 29 пациенткам из группы 2 было проведено ПГТ-А. Согласно проведенному генетическому исследованию статистически значимых различий в частоте получения эуплоидных эмбрионов в зависимости от среды культивирования у пациенток в возрасте 40–42 лет получено не было. Так, в группе 1, где культивирование эмбрионов проводилось в низколактатной культуральной среде, из 32 исследованных эмбрионов было получено 8 (25,0%) эуплоидных, в группе 2 из 29 протестированных эмбрионов – 7 (24,1%) ($p=0,94$).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Возрастное снижение женской фертильности является результатом сложного взаимодействия множества биологических факторов, которое может приводить к неудачам на разных этапах проведения программ ЭКО. Связь между количеством ооцитов, полученных в результате овариальной стимуляции, и частотой живорождения является хорошо изученной. Кумулятивная частота живорождения подразумевает количество родов в расчете на 100 циклов овариальной стимуляции в программах ВРТ, в которых произведен перенос свежих или размороженных эмбрионов. Так, в исследовании Bahadur G и соавторов было показано, что при получении 16-25 ооцитов частота живорождения составляет 35,3%, а в случае аспирации ≤ 5 ооцитов данный показатель снижается до 17,2% [199]. Аналогичные данные представлены в исследовании Wang P и соавторов, которые установили зависимость частоты наступления клинической беременности и живорождения от возраста пациенток путем проведения многофакторного регрессионного анализа. Согласно результатам исследования, если в возрасте ≤ 35 лет кумулятивная частота клинической беременности составляла 74,9%, а живорождения 68,3%, то в возрасте ≥ 36 лет показатели снижались до 45% и 34,4% соответственно [200]. Тем не менее, наиболее критическое снижение эффективности ВРТ наблюдается после 40 лет. Так, в исследовании Liu M и соавторов было показано, что после одного цикла овариальной стимуляции у женщин старшего репродуктивного возраста кумулятивная частота живорождения в среднем составляет 32,31% для 38–39 лет, 26,99% – для 40–41 лет, 14,4% – для 42–43 лет и всего 3,44% – для женщин ≥ 44 лет ($p < 0,001$) [201].

Помимо возраста важное клиническое значение имеет оценка роли других немодифицируемых и модифицируемых факторов, что позволяет оптимизировать протоколы ведения и обеспечивает условия персонифицированного подхода для каждой пациентки. На ретроспективном этапе настоящего исследования был проведен анализ клинико-anamнестических данных в когортах пациенток 35–39 лет и 40–42 лет с целью оценки их значимости как потенциальных конфаундеров

исходов программ ВРТ. Среди пациенток возрастной когорты 35–39 лет в 1 подгруппе, где на этапе культивирования эмбрионов использовалась классическая среда G-TL, частота встречаемости заболеваний щитовидной железы была выше на 15,8% ($p=0,01$), чем во 2 подгруппе, в которой применялась среда с пониженным содержанием лактата. Вклад данных патологий в исходы не представляется существенным, поскольку до вступления в программу ВРТ пациентками была достигнута стойкая ремиссия и получено соответствующее заключение врача-эндокринолога об отсутствии противопоказаний для проведения овариальной стимуляции и переноса эмбрионов в полость матки. Частота встречаемости других соматических патологий была сопоставима. Анализ гинекологического и репродуктивного анамнеза также не выявил разницы между подгруппами данной возрастной когорты. Согласно проведенному на 2-3-й день менструального цикла обследованию пациентки обеих подгрупп не различались по количеству антральных фолликулов, а также уровням АМГ и ФСГ в сыворотке крови. При оценке показателей эмбриологического этапа у женщин 35–39 лет было установлено, что использование одношаговой среды с пониженным уровнем лактата не приводит к увеличению частоты формирования эмбрионов 5-х суток развития и количества бластоцист по сравнению с культивированием в классической культуральной среде ($p=0,60$ и $p=0,46$ соответственно). Анализ клинических исходов программ ВРТ в возрастной группе женщин от 35 до 39 лет показал, что применение среды с пониженным содержанием лактата и классической культуральной среды не сопровождалось статистически значимыми межгрупповыми различиями по частоте наступления клинической беременности, частоте живорождения в расчете на цикл овариальной стимуляции и перенос эмбриона.

На ретроспективном этапе исследования среди пациенток возраста 40–42 лет был произведен аналогичный набор в две подгруппы в зависимости от среды культивирования эмбрионов. Частота встречаемости соматической патологии, гинекологических заболеваний, а также паритет родов, структура и длительность бесплодия были сопоставимы между пациентками обеих подгрупп. Статистически

значимой разницы в показателях овариального резерва также не было выявлено в обеих подгруппах. Сопоставимые параметры анамнеза и результатов клинико-лабораторного обследования позволили исключить их влияние на исходы программ ВРТ с применением классической культуральной среды и среды с пониженным содержанием лактата. Анализ исходов эмбриологического этапа показал статистически значимое повышение количества blastocysts до 2 [1; 2] и частоты формирования эмбрионов 5-х суток развития до 66,67 [50,00; 100,00]% при культивировании эмбрионов в низколактатной среде по сравнению с классической средой (1 [1; 2] ($p=0,04$) и 50,00 [33,46; 76,25]% ($p=0,04$) соответственно). При сравнении клинических результатов программ ЭКО у пациенток возрастной когорты 40–42 лет было отмечено увеличение на 5,7% частоты клинической беременности ($p=0,31$) и частоты живорождения ($p=0,23$) в расчете на перенос эмбриона при культивировании в одношаговой среде с пониженной концентрацией лактата по сравнению с классической средой.

С целью оценки роли возрастного фактора в исходах программ ВРТ было проведено сравнительное исследование показателей овариального резерва и результатов эмбриологического этапа двух возрастных групп – 35–39 лет и 40–42 года. Для изучения вклада соматических и гинекологических заболеваний в исходы программ ВРТ был выполнен анализ в обеих возрастных когортах, который не выявил межгрупповых различий. Полученные результаты снизили вероятность влияния соматического статуса и гинекологической заболеваемости на исходы проведенной работы. Анализ показателей овариального резерва выявил достоверно более высокие значения АМГ ($p=0,008$) и КАФ ($p<0,01$) у женщин возрастной группы 35–39 лет, что является закономерным результатом. Известно, что уровень АМГ коррелирует с возрастом пациентки [202, 203], однако при прогнозировании эффективности программ ВРТ возрастной критерий обладает большей прогностической значимостью по сравнению с маркерами овариального резерва [45, 46, 204]. В исследовании Bayefsky MJ и соавторов было показано, что у женщин до 35 лет КАФ не влияло на кумулятивную частоту живорождения в отличие от пациенток позднего возраста. При этом кумулятивная частота

живорождения в группе 35–40 лет при КАФ 1-3 составляла менее 20%, а при КАФ 4-5 – 25-40%. У женщин старше 41 года данный показатель значительно снижался, составляя менее 5% при КАФ 1-3 и менее 15% при КАФ 4-5 [205]. Как известно, овариальный резерв и возраст женщины являются наиболее важными предикторами получения бластоцист в одном цикле овариальной стимуляции. В настоящем исследовании при анализе показателей эмбриологического этапа было выявлено достоверное повышение количества ОКК, зрелых ооцитов, числа зигот 2pN ($p=0,02$, $p=0,04$ и $p<0,01$ соответственно) и количества бластоцист ($p=0,048$) у женщин 35–39 лет по сравнению с женщинами группы 40–42 лет. В исследовании La Marca А и соавторов было показано, что при АМГ 1 нг/мл вероятность получения хотя бы одного эуплоидного эмбриона у 30-летней женщины составляет 28%, тогда как в 40 лет данный показатель снижается до 18% [206]. В исследовании Ezoe К и соавторов было показано негативное влияние старения женщины на процессы формирования бластоцист [88]. Romanski Р и соавторы в своей работе выявили линейную связь между количеством полученных ооцитов, зигот 2pN и пригодных для переноса бластоцист с увеличением возраста женщины [207].

Таким образом, в результате сравнительного анализа уровней АМГ и ФСГ, количества антральных фолликулов, параметров эмбриологического этапа была продемонстрирована значимая роль возрастного фактора в снижении эффективности лечения бесплодия методами ВРТ. В настоящем исследовании показано критическое снижение показателей овариального резерва и раннего эмбриогенеза при переходе пациенток из группы 35–39 лет в возрастную когорту 40–42 лет. Так, возраст женщины старше 40 лет ассоциирован с более низкими показателями эмбриологического этапа, и, следовательно, живорождения. На ретроспективном этапе настоящего исследования было получено повышение показателей эмбриологического этапа при его модификации с применением низколактатной культуральной среды в группе пациенток 40–42 лет. Статистически значимых различий при оценке исходов программ ВРТ среди пациенток возрастной когорты 35–39 лет получено не было. При этом выявленные

тенденции к увеличению клинических исходов среди пациенток 40–42 лет позволили перейти к проспективному этапу настоящей работы для оценки эффективности данной модификации эмбриологического этапа.

На проспективном этапе исследования анализ клинико-анамнестических данных пациенток возрастной когорты 40–42 лет выявил статистически значимые различия по соматическому статусу, а именно по заболеваниям пищеварительной, сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем в группе 2, где для культивирования эмбрионов применялась классическая среда. Наиболее часто встречались такие соматические заболевания, как варикозное расширение вен нижних конечностей, хронический гастрит, хронический цистит, мочекаменная болезнь в стадии стойкой ремиссии. До начала проведения программ ЭКО пациентками было пройдено полное клинико-лабораторное обследование и соответствующая терапия согласно рекомендациям профильных специалистов, что исключает возможное влияние данных заболеваний на исходы лечения бесплодия. Достоверных различий среди других соматических заболеваний получено не было.

При анализе гинекологической заболеваемости отмечено повышение частоты диффузного аденомиоза I-II степени распространенности в группе 1 до 24,2% по сравнению с группой 2 (15,6%, $p=0,01$). Широко известно об отрицательном вкладе аденомиоза в клинические исходы программ ВРТ [208, 209, 210]. В систематическом обзоре и мета-анализе, охватывающих 22 исследования, Cozzolino M с соавторами установлено, что у пациенток с аденомиозом частота наступления клинической беременности и живорождения в циклах ЭКО статистически значимо ниже, чем у женщин без данной патологии [209]. Однако авторами отмечалось, что большинством исследователей не выполнялось разделение на очаговую и диффузную форму заболевания. Позднее в мета-анализе Wang X и соавторы показали отрицательное влияние диффузной формы аденомиоза на клинические исходы ВРТ в виде снижения частоты наступления клинической беременности и живорождения, а также обратили внимание на отсутствие исследований, сфокусированных на изучении

исключительно очагового аденомиоза [210]. Однако в настоящем исследовании у женщин из группы с культивированием в низколактатной среде одновременно были значимо выше частота встречаемости диффузного аденомиоза I-II степени и частота успешной имплантации по сравнению с группой женщин с культивированием в классической среде. Подобные результаты свидетельствуют о том, что решающим фактором в наступлении беременности является жизнеспособность бластоцисты, которую возможно повысить при модификации эмбрионального этапа.

Анализ репродуктивного анамнеза, структуры и продолжительности бесплодия не выявил статистически значимых различий между включенными в исследование пациентками обеих групп за исключением увеличения частоты искусственного прерывания беременности в группе 2 ($p=0,03$). Связь наличия в анамнезе медицинского аборта с неудачами программ ВРТ является спорной. Несмотря на то, что в некоторых исследованиях показано негативное влияние искусственного прерывания беременности на исходы программ ЭКО, в последних более крупных исследованиях получены противоположные данные [211, 212]. Так, в ретроспективном исследовании Männistö J и соавторов, которое включило более 88 тысяч женщин, было показано, что бесплодие после искусственного прерывания беременности является редким явлением, а исходы после аборта не связаны с повышением частоты применения ЭКО для лечения бесплодия в будущем [213]. В большом ретроспективном когортном исследовании Martinez S и соавторов, в которое вошли почти 11 000 пациенток, были получены данные о том, что частота наступления беременности и живорождения в программах ВРТ была выше у женщин, имеющих в анамнезе беременности, в том числе завершившиеся ее прерыванием [214]. Исходя из этого, в настоящем исследовании наличие искусственного прерывания беременности в анамнезе у пациенток группы 2 не представляется значимым в исходах ВРТ. По результатам лабораторного и ультразвукового обследования было установлено, что показатели овариального резерва были сопоставимы в обеих группах. Таким образом, анализ частоты встречаемости соматических и гинекологических заболеваний, а также оценка

репродуктивного потенциала женщин обеих групп, включенных в исследование, позволили исключить вмешивающиеся факторы, которые могли повлиять на клинические исходы программ ВРТ.

На следующем этапе был проведен анализ параметров стимулированного цикла и эмбриогенеза в обеих группах. Совершенствование терапевтических стратегий и протоколов на различных этапах ВРТ, в особенности у женщин позднего репродуктивного возраста, является актуальной задачей специалистов области репродуктивной медицины. Внедрение персонифицированного подхода с применением модифицированных протоколов стимуляции функции яичников, возможностью применения дозревания ооцитов *in vitro*, преимплантационного генетического тестирования, витрификации эмбрионов являются перспективными методами, которые могут улучшить исходы ВРТ у пациенток данной возрастной когорты. В настоящее время исследования зависимости исходов ВРТ от длительности и доз используемых препаратов Гн при стимуляции функции яичников противоречивы. Так, в исследовании Shuai J и соавторов было показано отсутствие зависимости количества полученных эуплоидных эмбрионов от общей дозы Гн при овариальной стимуляции [215]. Однако авторами было отмечено снижение количества эуплоидных бластоцист в группе пациенток позднего репродуктивного возраста по сравнению с другими возрастными когортами, что является вполне логичным исходом [215]. Более глубокий анализ был проведен Shen X и соавторами, в исследовании которых изучались исходы ВРТ в зависимости от дозы Гн с учетом возраста и уровня АМГ [216]. Согласно полученным результатам, в группе позднего репродуктивного возраста (35–42 лет) с увеличением дозы Гн вне зависимости от овариального резерва отмечалось снижение количества бластоцист, в том числе бластоцист отличного качества. При этом такие клинические показатели как частота имплантации, клинической беременности и живорождения снижались с увеличением дозы Гн во всех возрастных группах, что может быть связано с нарушением естественных процессов отбора и созревания ооцитов, в том числе хромосомных перестроек в мейозе, а также снижением способности фолликулов реагировать на стимуляцию

препаратами Гн [216]. Противоречивые данные были получены в исследовании Cozzolino М и соавторов, которые показали отсутствие статистически значимых различий зависимости скорости бластуляции и частоты анеуплоидий при применении высоких доз Гн в протоколах овариальной стимуляции [217]. В систематическом обзоре и мета-анализе Bordewijk ЕМ и соавторов было показано отсутствие связи между дозой различных Гн в циклах ЭКО с показателями живорождения [218]. Кроме того, с увеличением доз Гн при «бедном» ответе на овариальную стимуляцию не наблюдается улучшения показателей живорождения [219, 220]. В настоящем исследовании не было получено статистически значимой разницы между суммарной дозой Гн и продолжительностью овариальной стимуляции в исследуемых группах, что имеет важное значение для оценки эффективности модификации эмбрионального этапа. Кроме того, проведенный корреляционный анализ не выявил взаимосвязи между продолжительностью и суммарной дозой препаратов при стимуляции функции яичников с частотой наступления клинической беременности в группе женщин позднего репродуктивного возраста, что совпадает с результатами других более крупных исследований [216, 217, 218]. Таким образом, несмотря на совершенствование протоколов стимуляции, эффективность программ ВРТ в данной возрастной когорте продолжает оставаться низкой, что обусловлено процессами биологического старения яичников, которое ассоциировано со снижением не только овариального резерва, но и качества ооцитов и, соответственно, качества и жизнеспособности эмбрионов [140, 221].

В связи с вышеизложенным, особую актуальность в настоящее время приобретают исследования, направленные на разработку и внедрение эффективных инструментов прогнозирования клинических исходов программ ВРТ. На проспективном этапе настоящего исследования была проведена оценка прогностической ценности индексов овариального ответа среди пациенток 40–42 лет – группы с наиболее неблагоприятными ожидаемыми клиническими исходами. Анализ прогностических возможностей индексов FORT, FOI и OSI для

прогнозирования клинической беременности и живорождения установил, что наиболее информативным предиктором живорождения является индекс FORT.

Принимая во внимание, что данный индекс отражает отношение числа преовуляторных фолликулов в день введения триггера овуляции к пулу антральных фолликулов, выявленные закономерности представляются обоснованными [192]. Результаты ранее проведенных исследований позволили охарактеризовать индекс FORT как перспективный показатель, позволяющий количественно и качественно оценивать ответ яичников на стимуляцию, что повысило его потенциал для применения в повседневной клинической практике [222, 223, 224, 225]. В более крупных исследованиях было показано, что FORT может быть использован для оценки взаимосвязи между овариальным резервом и эффективностью ответа на стимуляцию яичников в качестве дополнительного критерия при выборе дальнейшей тактики ведения, включая персонализацию протоколов овариальной стимуляции [195, 225]. Тем не менее, доказательная база практической ценности данного индекса остается недостаточно убедительной, что во многом обусловлено неоднородностью опубликованных исследований, различиями в характеристиках включенных групп пациенток, а также отсутствием единообразия в выборе оцениваемых конечных точек. В настоящем исследовании с помощью ROC-анализа было показано, что индекс FORT обладает наиболее высокой прогностической ценностью у женщин возрастной когорты 40–42 года в отношении живорождения по сравнению с уровнем АМГ, ФСГ, количеством антральных и преовуляторных фолликулов, индексами FOI и OSI, что позволяет рассматривать его внедрение в клиническую практику [192].

Одним из важнейших этапов в программах ВРТ является морфологическая оценка ооцитов, качество которых оказывает непосредственное влияние на эмбриональное развитие. Успех овариальной стимуляции зависит от получения достаточного количества ооцитов МП, обладающих высоким потенциалом к оплодотворению и имплантации [226]. Количество полученных в результате овариальной стимуляции ооцитов признано значимым прогностическим фактором живорождения [200, 227]. На ретроспективном этапе настоящего исследования

была обнаружена существенная разница в количестве ОКК и зрелых ооцитов между возрастными когортами 35–39 и 40–42 года. Согласно результатам крупных многоцентровых исследований, получение большего числа ооцитов связано с увеличением кумулятивной частоты живорождения в расчете на цикл [200, 227]. Однако в настоящее время взаимосвязь между данными показателями считается спорной. Так, в некоторых исследованиях показано, что после получения определенного числа ооцитов показатель живорождения достигает плато [228, 229]. Разнородность имеющихся данных во многом связана с возрастным фактором. Так, в систематическом обзоре Neves AR и соавторов показано, что количество ооцитов положительно коррелирует с кумулятивной частотой живорождения при возрасте старше 35 лет [230]. У женщин старше 44 лет кумулятивная частота живорождения остается стабильно низкой вне зависимости от результатов овариальной стимуляции и не превышает 3-4% [201, 227, 230, 231]. В исследовании Havrljenko J и соавторов было показано значительное снижение частоты наступления клинической беременности и живорождения ($p < 0,001$) с увеличением возраста женщины [232]. Кроме того, в когорте женщин позднего репродуктивного возраста была отмечена более высокая частота самопроизвольных выкидышей, что может быть связано не только с увеличением частоты анеуплоидий, но и снижением потенциала эмбрионов к имплантации [232]. Таким образом, в возрастной когорте женщин от 35 до 44 лет существует необходимость получения большего количества ооцитов при овариальной стимуляции с целью повышения шансов получения эмбрионов, пригодных для переноса или криоконсервации [233]. Отмечается прямая связь между количеством ОКК и результатами оплодотворения, что закономерно, учитывая, что координированное взаимодействие между кумулюсными клетками и ооцитами имеет важное значение для эмбриональной морфокинетики [234]. Как известно, кумулюсные клетки предоставляют метаболические субстраты для поддержания энергетического баланса ооцитов, которые, в свою очередь, продуцируют факторы, способствующие их пролиферации [134, 235]. Выполняя энергетическую, защитную и антиоксидантную функции, клетки кумулюса обеспечивают

созревание ооцита и благоприятное течение процессов раннего эмбриогенеза [234, 236]. При этом овариальное старение ассоциировано с генетическими, эпигенетическими и транскриптомными изменениями, которые влекут за собой метаболические реакции, дисбаланс окислительно-восстановительных процессов и повышенный апоптоз в микроокружении ооцита [237, 238]. Тем не менее, точные механизмы регуляции этих связей изучены недостаточно и требуют дальнейшего углубленного анализа, в том числе с целью разработки новых подходов к культивированию эмбрионов. Таким образом, отсутствие статистически значимой разницы в результатах овариальной стимуляции в обеих группах в возрастной когорте 40–42 лет позволило исключить их влияние на клинические исходы в зависимости от среды культивирования.

Сравнительный анализ результатов эмбриологического этапа и клинических исходов ВРТ в группе женщин 40–42 лет выявил достоверные различия при культивировании эмбрионов в различных культуральных средах. При культивировании эмбрионов в среде с пониженным содержанием лактата было получено статистически значимое повышение числа бластоцист до 1 [1; 3] и частоты формирования эмбрионов 5-х суток развития до 39,0 [31,0; 62,8] % по сравнению с культивированием в классической среде (1 [1; 2] ($p=0,04$) и 31,1 [28,6; 43,4] % ($p=0,045$) соответственно). Кроме того, наблюдалось повышение частоты криоконсервации бластоцист в возрастной группе женщин 40–42 лет до 28,0% при их культивировании в низколактатной среде, что вдвое превышало данный показатель группы 2, где данный показатель составил 14,1% ($p<0,01$). Важное значение имеют результаты, связанные с частотой отмены переноса эмбриона в полость матки по причине остановки его развития, которая составила 14,7% при культивировании в среде с пониженным лактатом, тогда как в классической среде данный показатель достиг 24,2% ($p<0,01$). Сравнительный анализ клинических исходов у пациенток 40–42 лет выявил не только достоверное улучшение показателей эмбриологического этапа, но и увеличение частоты наступления клинической беременности в расчете на цикл овариальной стимуляции до 14,4% по сравнению с культивированием в классической среде, где

данный показатель составил 8,2% ($p=0,02$, ОШ 1,88 (95% ДИ: 1,07; 3,31)). Наиболее важное клиническое значение имела частота живорождения, которая в расчете на цикл овариальной стимуляции не различалась в группах и составляла 7,2 и 4,7% в группе 1 и группе 2 соответственно ($p=0,22$). Однако оценка данного показателя в расчете на перенос эмбриона выявила его статистически значимое повышение до 14,0% при культивировании эмбрионов в среде с пониженной концентрацией лактата по сравнению с классической средой, где он составил 6,8% ($p<0,01$, ОШ 2,22 (95% ДИ: 1,04; 4,75)).

Несмотря на непрерывное совершенствование сред культивирования эмбрионов, единого мнения относительно их оптимального состава не достигнуто [144, 145]. В настоящее время нет убедительных доказательств в пользу преимуществ определенных сред культивирования над другими [239]. Поскольку современные тренды диктуют необходимость персонификации подходов к лечению бесплодия, выбор определенных условий эмбрионального этапа в зависимости от возраста, овариального резерва, репродуктивного анамнеза может улучшить исходы программ ВРТ. В данном исследовании с целью улучшения результатов лечения бесплодия методами ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста применялась одноэтапная культуральная среда с низким содержанием лактата [22]. Культивирование в одноэтапной среде проводится согласно принципу «пусть эмбрион выбирает», который предполагает обеспечение эмбриона всеми необходимыми условиями для роста в единой системе [149]. В связи с тем, что информация о точных концентрациях различных компонентов в культуральных средах в большинстве случаев является коммерческой тайной и не раскрывается производителями в полном объеме, в настоящем исследовании были учтены результаты работы Morbeck DE и соавторов, в которой представлены подробные составы культуральных сред, в том числе включенных в настоящее исследование. Согласно полученным результатам, концентрация лактата в классической культуральной среде равнялась 10,01 мМоль/мл, тогда как в культуральной среде с пониженной концентрацией лактата она была практически вдвое ниже и составляла 5,71 мМоль/мл [196].

Метаболические пути эмбриогенеза являются эволюционно сложившимися механизмами, которые характеризуются пластичностью, направленной на обеспечение высоких энергетических потребностей эмбриона и его благополучное развитие. Изучение условий раннего эмбриогенеза позволяет предположить, что пониженные концентрации лактата являются более естественными для развития эмбриона. Несмотря на существующие ограничения в изучении эмбриогенеза человека, современные технологии культивирования, а также экспериментальные исследования позволяют расширить знания о ранних этапах развития. Так, в исследовании Utsunomiya T и соавторов показано снижение концентрации пирувата и лактата в маточных трубах в лютеиновую фазу менструального цикла, что может быть связано с повышенным потреблением глюкозы для направленного движения ресничек эпителия маточных труб после овуляции, а также превращением глюкозы в лактат кумулюсными клетками [187]. Полученные данные подтверждают результаты более ранних исследований метаболических условий раннего эмбриогенеза, которые были проведены Gardner DK и соавторами [147]. Продукция энергии с ранних этапов эмбриогенеза происходит за счет гликолитической системы, которая состоит из последовательных биохимических реакций, в результате которых образуются две молекулы пирувата [184, 240]. Пируват является одним из ключевых энергетических субстратов для преимплантационного эмбриона [240]. При этом сложные взаимодействия между ооцитом и клетками кумулюса обеспечивают необходимый энергетический баланс. Так, ооциты активируют гликолиз в кумулюсных клетках и используют продуцируемый ими пируват [240]. В результате окислительного декарбоксилирования пирувата образуется ацетил-КоА, который поступает в цикл трикарбоновых кислот и становится источником АТФ. В случае недостатка кислорода наблюдается обратимое превращение пирувата в лактат в присутствии ЛДГ. Важно, что при высоких концентрациях лактата отмечается снижение активности ЛДГ и последующая конверсия лактата в пируват становится невозможной. Подобное подавление метаболизма пирувата в условиях высоких концентраций лактата может формировать критические

условия для жизнедеятельности эмбрионов [185, 241]. Кроме того, овариальное старение характеризуется закономерными изменениями метаболического профиля ооцитов со снижением активности ЛДГ [242]. Таким образом, повышение концентрации лактата при реализации овариального старения может выступать в качестве дополнительного усугубляющего фактора нарушения энергетического баланса. Последнее подтверждается результатами исследований, в которых определялись достаточно низкие концентрации лактата в окружающих преимплантационный эмбрион физиологических условиях [186, 187].

Развитие преимплантационного эмбриона, безусловно, зависит от окружающих его условий. Однако наибольший вклад в благоприятное течение эмбриогенеза вносят нормальный хромосомный набор гамет, энергетический метаболизм ооцитов, баланс между оксидативно-восстановительными реакциями и другие молекулярные механизмы, которые поддерживают репродуктивный потенциал. Принимая во внимание, что в позднем репродуктивном возрасте большинство патологических процессов являются необратимыми и сопряженными с биологическим старением, адаптация преимплантационных условий может компенсировать последствия ряда патологических процессов. Изучение обменных процессов раннего эмбриогенеза в физиологических условиях позволило предположить, что обеспечение низких концентраций лактата на преимплантационном этапе способно компенсировать метаболический стресс и повысить жизнеспособность эмбриона, в частности, в позднем репродуктивном возрасте. Культивирование эмбрионов в классической среде, при которой отмечаются повышенные концентрации лактата, приводит к снижению активности ЛДГ и, соответственно, уменьшению его конверсии в пируват, что впоследствии приводит к снижению синтеза АТФ [185, 243]. Применение низколактатной среды предотвращает избыточное накопление лактата и способствует его беспрепятственному превращению в пируват. Это, в свою очередь, приводит к увеличению синтеза АТФ, что является необходимым условием для поддержания нормальных клеточных функций и высокой интенсивности метаболических процессов, необходимых для активного дробления клеток. Высокие концентрации

пирувата приводят к увеличению концентрации кофактора НАД⁺ и, соответственно, повышению метаболизма в гликолитической системе [25]. Кроме того, низкие концентрации лактата способны компенсировать снижение энергетического потенциала в ооцит-кумулюсных комплексах. Так, в исследовании Kobanawa M и соавторов было показано, что преимплантационное культивирование в среде с пониженным содержанием лактата позволяет повысить энергетический потенциал ооцитов и кумулюсных клеток, а значит, обеспечить достаточное количество АТФ для благоприятного эмбрионального развития [25]. Таким образом, оптимизация концентрации лактата в культуральной среде является важным фактором для обеспечения оптимального метаболического состояния клеток, в особенности, при высоком уровне метаболического стресса.

Показано, что для эмбрионов, развитие которых останавливается на ранних стадиях, характерно замедление поглощения пирувата в отличие от тех, которые достигают стадии бластоцисты [244]. В настоящее время существует предположение, что изменение метаболического окружения преимплантационного эмбриона может оказывать пагубное воздействие на процессы сборки веретена деления и сегрегации хромосом в активно делящихся клетках, тем самым приводя к остановке его развития. В исследовании VerMilyea M и соавторов было продемонстрировано, что культивирование эмбрионов до стадии бластоцисты в среде с пониженным содержанием лактата, в сравнении с использованием стандартной культуральной среды, сопровождается статистически значимым увеличением числа эуплоидных эмбрионов на 10% по данным ПГТ-А, выполненного методом NGS [245]. Противоположные результаты получены в работе Urich M и соавторов, которые не выявили значимых различий в частоте эуплоидии эмбрионов при их культивировании в низколактатной среде [23]. В настоящем исследовании в группе пациенток позднего репродуктивного возраста 40–42 лет также не было получено достоверных различий в частоте формирования эуплоидных эмбрионов в зависимости от среды культивирования ($p=0,94$) [22]. Отсутствие статистически значимой разницы согласно результатам проведенного ПГТ-А во многом связано с поздним репродуктивным возрастом пациенток,

который составлял 40–42 года. По всей видимости, в данной возрастной когорте улучшение исходов ВРТ при применении культуральной среды с пониженным содержанием лактата связано с компенсацией метаболических изменений и повышением энергетического потенциала активно развивающегося эмбриона, но не воздействием на его хромосомный набор.

В ходе настоящего исследования было установлено, что культивирование эмбрионов в одношаговой среде с пониженной концентрацией лактата приводит к улучшению клинических исходов программ ЭКО по сравнению с культивированием в классической среде у женщин 40–42 лет. При этом у женщин возрастной когорты 35–39 лет результативность программ ЭКО при применении обеих культуральных сред была сопоставима. Поскольку с увеличением возраста наблюдается нарушение баланса в энергетическом обмене, результаты настоящего исследования позволяют предположить, что избыточные уровни лактата могут оказывать наиболее негативное воздействие в тех условиях, когда компенсаторные механизмы организма неэффективны для установления баланса между данными процессами [246, 247]. Кроме того, результатом каскада биохимических процессов, которые поддерживают метаболизм ооцита и преимплантационного эмбриона, является ряд мультифункциональных сигнальных молекул. Глубинное изучение этих процессов еще предстоит изучить, однако уже сейчас известно, что данные сигнальные молекулы обеспечивают не только созревание ооцитов, но и благополучный эмбриогенез.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бесплодие в браке остается одной из наиболее значимых медико-социальных проблем современности. Согласно общемировым эпидемиологическим данным, распространенность бесплодия варьируется от 16,5% в странах с низким и средним уровнем дохода до 17,8% в странах с высоким уровнем дохода. Поскольку последние десятилетия под влиянием социально-экономических факторов произошло значительное изменение возрастного профиля рождаемости – все больше женщин откладывают деторождение на поздний репродуктивный возраст, работа специалистов в области репродуктивной медицины существенно усложняется.

На протяжении последних лет исследовательский фокус смещен в сторону анализа метаболической функции лактата в раннем эмбриогенезе. После оплодотворения происходят адаптивные изменения концентрации лактата и других метаболитов, необходимые для удовлетворения возрастающих энергетических потребностей активно развивающегося эмбриона. Наряду с этим лактат проявляет свойства сигнального регулятора, влияя на процессы эмбриогенеза. Данные научных исследований свидетельствуют, что пониженное содержание лактата стимулирует энергообеспечение кумулюсных клеток, поддерживает продукцию АТФ в критические периоды эмбрионального роста. Следовательно, современная стратегия культивирования эмбрионов предполагает использование сред с уменьшенной концентрацией лактата, и этот подход наиболее востребован у пациенток позднего репродуктивного возраста, для которых характерна высокая степень метаболического стресса на клеточном уровне. В позднем репродуктивном периоде большинство патологических процессов носят необратимый характер и тесно связаны с возрастным старением. В этих условиях адаптация параметров преимплантационного культивирования может отчасти компенсировать последствия таких изменений. Изучение физиологического метаболизма на этапе раннего эмбриогенеза позволяет предположить, что пониженное содержание лактата на доимплантационном этапе снижает метаболический стресс

и положительно влияет на выживаемость эмбриона – в первую очередь у женщин старше 35 лет.

В настоящей работе была проведена модификация эмбрионального этапа путем использования культуральной среды с пониженным содержанием лактата у пациенток позднего репродуктивного возраста. Применение низколактатной культуральной среды в группе женщин 40–42 лет продемонстрировало свою эффективность в виде достоверного улучшения как эмбриологических, так и клинических показателей. Наиболее важными клиническими результатами настоящей работы было статистически значимое повышение частоты наступления клинической беременности из расчета на цикл овариальной стимуляции и живорождения из расчета на перенос эмбриона при культивировании в среде с пониженным содержанием лактата, что может быть связано с формированием особого метаболического окружения для развития эмбриона. Известно, что с первых дней беременности реализуются механизмы эпигенетического наследования, зависящие от уровня биологически активных метаболитов. Подобная метаболическая среда, создаваемая на преимплантационном этапе, напрямую определяет характер этих эпигенетических модификаций. Поскольку для женщин старше 40 лет характерно прогрессирующее снижение овариального резерва и ухудшение эпигенетического контроля эмбриогенеза, что клинически проявляется снижением кумулятивной частоты живорождения, результаты данного исследования приобретают особую практическую значимость для ведения пациенток этой возрастной когорты.

Таким образом, применение культуральной среды с пониженным содержанием лактата может быть рекомендовано в качестве приоритетной для женщин позднего репродуктивного возраста 40–42 лет с целью улучшения исходов программ ЭКО.

ВЫВОДЫ

1. Клинико-анамнестическими особенностями женщин позднего репродуктивного возраста являются высокая распространенность миомы матки, наружного генитального эндометриоза и диффузного аденомиоза I-II стадии; преобладание мужского и трубно-перитонеального фактора бесплодия. У женщин 35–39 лет отмечаются более высокий уровень АМГ 1,6 [1,1; 2,6] нг/мл по сравнению с женщинами 40–42 лет, где данный показатель равен 1,4 [0,9; 2,5] нг/мл ($p<0,01$).

2. Для женщин возрастной когорты 40–42 лет характерны снижение КАФ фолликулов ($p<0,01$), ОКК ($p=0,02$), зрелых ооцитов ($p=0,04$) по сравнению с женщинами возраста 35–39 лет.

3. Применение среды культивирования с пониженным лактатом у женщин 35–39 лет не влияет на параметры эмбриологического этапа по сравнению с классической средой. Применение среды культивирования с пониженным лактатом у женщин позднего репродуктивного возраста 40–42 лет улучшает параметры эмбриологического этапа по сравнению с классической средой.

4. Применение среды культивирования с пониженным лактатом у женщин 35–39 лет не влияет на исходы программ ВРТ по сравнению с классической средой. Применение среды культивирования с пониженным лактатом у женщин 40–42 лет значительно улучшает клинические исходы: частота наступления клинической беременности в расчете на цикл овариальной стимуляции составила 14,4% против 8,2% ($p=0,02$), в расчете на перенос эмбриона – 27,9% против 11,9% ($p<0,01$) по сравнению с классической средой. При культивировании эмбрионов в низколактатной среде частота живорождения в расчете на перенос эмбриона была достоверно выше, чем в классической среде, составив 14,0% против 6,8% ($p<0,01$).

5. Индекс FORT обладает достаточно высокой точностью в прогнозировании живорождения у женщин 40–42 лет как при культивировании эмбрионов в низколактатной, так и классической среде.

6. Культивирование эмбрионов в среде с пониженным лактатом у женщин 40–42 лет не приводит к статистически значимому повышению частоты эуплоидных эмбрионов по сравнению с культивированием в классической среде ($p=0,94$).

7. Женщинам позднего репродуктивного возраста 40–42 лет с целью улучшения исходов ВРТ рекомендована модификация эмбриологического этапа с применением культуральной среды с пониженным лактатом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1) На амбулаторном этапе необходимо информировать женщин о негативном влиянии возраста на репродуктивные исходы, в том числе при применении программ ВРТ, в особенности в группе женщин позднего репродуктивного возраста.

2) Применение среды с пониженным содержанием лактата для культивирования эмбрионов в рамках программ лечения бесплодия методом ВРТ требует стратификации по возрасту женщин.

3) Пациенткам позднего репродуктивного возраста 40–42 лет для улучшения эмбриологических показателей и клинических исходов лечения целесообразно рекомендовать применение среды с пониженным содержанием лактата в программах лечения бесплодия методами ВРТ.

4) Пациенткам 35–39 лет не рекомендовано применение среды с пониженным содержанием лактата в программах лечения бесплодия методами ВРТ, так как это не приводит к улучшению показателей эмбриологического этапа и не повышает шансы на наступление клинической беременности и живорождения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМГ – антимюллеров гормон

антГнРГ – антагонисты гонадотропин – рилизинг гормона

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранен

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

Гн – гонадотропин

ГнРГ – гонадотропин – рилизинг гормон

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мтДНК – митохондриальная ДНК

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

ИМТ – индекс массы тела

КАФ – количество антральных фолликулов

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛГ – лютеинизирующий гормон

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфата

НГЭ – наружный генитальный эндометриоз

ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс

ПГТ-А – преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии

РАРЧ – Российская Ассоциация Репродукции Человека

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТВП – трансвагинальная пункция яичников

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЭКО – экстракорпорального оплодотворения

aCGH – array comparative genomic hybridization, микроматричная сравнительная геномная гибридизация

β -ХГЧ – бета-субъединица хорионического гонадотропина человека

Cdkn1a – cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, внутриклеточной белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 1A

Cdkn2a – cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, внутриклеточной белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 2A

D-лактат – D-молочная кислота

FOI – follicle-to-oocyte index, фолликуло-ооцитарный индекс

FORT – follicle output rate, показатель фолликулярного выхода

FOXP1 – forkhead box protein P1

GV – germinal vesicle, герминативный пузырек

Hmgb1 – high-mobility group protein B1, белок высокомолекулярной группы 1

IGFBP-4 – insulin-like growth factor binding protein 4, белок, связывающего инсулиноподобный фактор роста человека 4 типа

L-лактат – L-молочная кислота

MI – первое мейотическое деление

MII – второе мейотическое деление

NGS – next generation sequencing, секвенирование нового поколения

OSI – ovarian sensitivity index, индекс чувствительности яичников

PAI-1 – plasminogen activator inhibitor-1, ингибитор активации плазминогена 1 типа

POSEIDON – Patient-Oriented Strategies compassing Individualized Oocyte Number

SASP – senescence-associated secretory phenotype, секреторный фенотип, ассоциированный со старением

TIMP2 – tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2, тканевый ингибитор металлопротеиназы 2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медико-социальные факторы бесплодия в России / И. Е. Корнеева, Т. А. Назаренко, С. Г. Перминова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2023. – № 3. – С. 65-72.
2. Методические подходы к оценке эффективности применения вспомогательных репродуктивных технологий на региональном уровне / А. И. Малышкина, Н. В. Долгушина, О. Н. Песикин, М. В. Кулигина // Акушерство и гинекология. – 2022. – № 11. – С. 148-154.
3. Global, regional, and national prevalence and trends of infertility among individuals of reproductive age (15-49 years) from 1990 to 2021, with projections to 2040 / Y. Liang, J. Huang, Q. Zhao [et al.] // Human Reproduction. – 2025. – Vol. 40. – № 3. – P. 529-544.
4. World Health Organization: official website. Infertility prevalence estimates, 1990–2021. (WHO, 2023) [Electronic resource] – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/978920068315> (дата обращения 05.03.2025).
5. Сухих, Г. Т. Бесплодие в позднем репродуктивном возрасте: реалии и перспективы / Г. Т. Сухих, Т. А. Назаренко. – Москва : Издательство «Медком-Про», 2024. – 560 с. – Текст : непосредственный.
6. Назаренко, Т. А. Бесплодный брак: клинические задачи и их решение : пособие для врачей / Т. А. Назаренко; – Москва : МЕДпресс-информ, 2024. – 144 с. – Текст : непосредственный.
7. Перспективы лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у женщин старше 40 лет с собственными ооцитами / Л. В. Хачатрян, Н. П. Макарова, А. П. Калинин, В. Ю. Смольникова // Акушерство и гинекология. – 2023. – № 4. – С. 12-19.
8. Hanevik, H. I. IVF and human evolution / H. I. Hanevik, D. O. Hessen // Human Reproduction Update. – 2022. – Vol. 28. – № 4. – P. 457-479.
9. Declining global fertility rates and the implications for family planning and family building: an IFFS consensus document based on a narrative review of the literature

/ B. C. J. M. Fauser, G. D. Adamson, J. Boivin [et al.] // Human Reproduction Update. – 2024. – Vol. 30. – № 2. – P. 153-173.

10. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014† / G. M. Chambers, S. Dyer, F. Zegers-Hochschild [et al.] // Human Reproduction – 2021. – Vol. 36. – № 11. – P. 2921-2934.

11. Embryos derived from single pronucleus are suitable for preimplantation genetic testing / O. Lebovitz, M. Noach-Hirsh, S. Taieb [et al.] // Fertility and Sterility. – 2024. – Vol. 122. – № 4. – P. 598-606.

12. Li, S. Effect of chronological age of patients with diminished ovarian reserve on in vitro fertilization outcome / S. Li, L. Hu, C. Zhang // Journal of Obstetrics and Gynaecology. – 2022. – Vol. 42. – № 4. – P. 654-657.

13. Fine-tuning IVF laboratory key performance indicators of the Vienna consensus according to female age / C. Zacà, G. Coticchio, V. Vigiliano [et al.] // Journal of assisted reproduction and genetics. – 2022. – Vol. 39. – № 4. – P. 945-952.

14. Park, S. U. Mechanisms of ovarian aging / S. U. Park, L. Walsh, K. M. Berkowitz // Reproduction. – 2021. – Vol. 162. – № 2. – P. R19-R33.

15. Mizrachi, Y. Embryo transfer success: It is in our hands / Y. Mizrachi, D. B. McQueen // Fertility and Sterility. – 2022. – Vol. 118. – № 5. – P. 815-819.

16. Sehring, J. Human implantation: The complex interplay between endometrial receptivity, inflammation, and the microbiome / J. Sehring, A. Beltsos, R. Jeelani // Placenta. – 2022. – Vol. 117. – P. 179-186.

17. Strom, D. Embryo transfer – the who, what, when, how, and why does it matter? / D. Strom, E.C. Feinberg // Fertility and Sterility. – 2022. – Vol. 118. – № 5. – P. 813-814.

18. Use of mineral oil in IVF culture systems: physico-chemical aspects, management, and safety / C. Scarica, A. Monaco, A. Borini [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2022. – Vol. 39. – № 4. – P. 883-892.

19. The composition of human preimplantation embryo culture media and their stability during storage and culture / M. Tarahomi, F. M. Vaz, J. P. van Straalen [et al.] // *Human Reproduction*. – 2019. – Vol. 34. – № 8. – P. 1450-1461.
20. Cytokines in culture media of preimplantation embryos during in vitro fertilization: Impact on embryo quality / I. Lee, S. H. Ahn, H. I. Kim [et al.] // *Cytokine*. – 2021. – Vol. 148. – P. 155714.
21. Murine blastocysts generated by in vitro fertilization show increased Warburg metabolism and altered lactate production / S. H. Lee, X. Liu, D. Jimenez-Morales, P. F. Rinaudo // *Elife*. – 2022. – Vol. 11. – P. e79153.
22. Оценка результатов лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток старше 40 лет с собственными ооцитами при применении культуральной среды с пониженным лактатом / Л. В. Хачатрян, В. Ю. Смольникова, Н. П. Макарова, А. П. Сысоева, Е. В. Кулакова, Е. А. Калинина // *Акушерство и гинекология*. – 2025. – №4. – С. 71-78.
23. Comparison of two culture media on morphokinetics and ploidy status of sibling embryos / M. Urich, M. R. Ugur, F. Li [et al.] // *Zygote*. – 2022. – Vol. 30. – № 3. – P. 410-415.
24. A microenvironment of high lactate and low pH created by the blastocyst promotes endometrial receptivity and implantation / K. H. Gurner, J. Evans, J. C. Hutchison [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2022. – Vol. 44. – № 1. – P. 14-26.
25. Kobanawa, M. Fertilization, embryo culture, and clinical results using low lactate embryo culture medium for pre-culture, insemination, and beyond / M. Kobanawa // *Reproductive Medicine and Biology*. – 2022. – Vol. 21. – № 1. – P. e12458.
26. Спиридонов, Д. В. Феномен отложенного материнства и вспомогательные репродуктивные технологии: социально-экономические и демографические аспекты / Д. В. Спиридонов, И. Г. Полякова // *Мир России. Социология. Этнология*. – 2024. – Т. 33. – № 3. – С.75-98.
27. Burden of female infertility in 204 countries and territories, 1990-2021: results from the Global Burden of Disease Study 2021 / Y. Wei, Z. Lin, Q. Huang [et al.]

// Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology. – 2025. – Vol. 46. – № 1. – P. 2459618.

28. Trends in the burden of female infertility among adults aged 20-49 years during 1990-2019: an analysis of data from the Global Burden of Disease Study 2019 / Y. Wang, W. Wang, H. Li, Q. Du // BMJ Open. – 2024. – Vol. 14. – № 7. – P. e084755.

29. Depression, anxiety, quality of life, and infertility: a global lens on the last decade of research / A. M. Braverman, T. Davoudian, I. K. Levin [et al.] // Fertility and Sterility. – 2024. – Vol. 121. – № 3. – P. 379-383.

30. Wang, Y. Infertility-why the silence? / Y. Wang // Lancet Global Health. – 2022. – Vol. 10. – № 6. – P. e773.

31. Guidelines informing counseling on female age-related fertility decline: a systematic review / E. Trawick, J. Pecoriello, G. Quinn, K. N. Goldman // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2021. – Vol. 38. – № 1. – P. 41-53.

32. Can repeat IVF/ICSI cycles compensate for the natural decline in fertility with age? an estimate of cumulative live birth rates over multiple IVF/ICSI cycles in Chinese advanced-aged population / F. Gu, S. Ruan, C. Luo [et al.] // Aging (Albany NY). – 2021. – Vol. 13. – № 10. – P. 14385-14398.

33. Obstetric and maternal outcomes of IVF and oocyte donation pregnancies among women ages 40-45-a large cohort study / R. Rahav-Koren, H. Shalev-Ram, E. Haikin-Herzberger [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2024. – Vol. 41. – № 6. – P. 1569-1575.

34. Risk of adverse pregnancy outcomes of late- and postterm pregnancies in advanced maternal age: A national cohort study / J. C. Kortekaas, B. M. Kazemier, J. K. J. Keulen [et al.] // Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica. – 2020. – Vol. 99. – № 8. – P. 1022-1030.

35. Российская Ассоциация Репродукции Человека. Регистр ВРТ, отчет за 2022 год [Электронный ресурс]. – URL: https://www.rahr.ru/d_registry_reports/RegistrVRT_2022.pdf (дата обращения: 05.03.2025).

36. Yildiz, S. The Role of Anti-Müllerian Hormone in Ovarian Function / S. Yildiz, L. M. E. Moolhuijsen, J. A. Visser // *Seminars in Reproductive Medicine*. – 2024. – Vol. 42. – № 1. – P. 15-24.
37. Potential therapeutic applications of human anti-Müllerian hormone (AMH) analogues in reproductive medicine / V. A. Kushnir, D. B. Seifer, D. H. Barad [et al.] // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2017. – Vol. 34. – № 9. – P. 1105-1113.
38. Anti-Müllerian hormone: biology and role in endocrinology and cancers / M. Gowkielewicz, A. Lipka, W. Zdanowski [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1468364.
39. Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles / D. B. Seifer, D. T. MacLaughlin, B. P. Christian [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2002. – Vol. 77. – № 3. – P. 468-471.
40. Comparison of anti-Müllerian hormone and antral follicle count in the prediction of ovarian response: a systematic review and meta-analysis / Y. Liu, Z. Pan, Y. Wu, J. Song // *Journal of Ovarian Research*. – 2023. – Vol. 16. – № 1. – P. 117.
41. Заковряшин, Е.А. Оптимизация программы экстракорпорального оплодотворения у пациенток со сниженным овариальным резервом на основании оценки метаболомного профиля фолликулярной жидкости: специальность 3.1.4 «Акушерство и гинекология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Заковряшин Евгений Алексеевич; ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова Минздрава России. – Москва, 2025. – 165 с.
42. Association of serum AMH levels with the number of oocytes retrieved in adolescent and young adult women undergoing controlled ovarian stimulation for fertility preservation / S. W. Kim, H. J. Son, J. Y. Han [et al.] // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. – 2025. – Vol. 311. – № 3. – P. 811-818.
43. The predictive value of serum concentrations of anti-Müllerian hormone for oocyte quality, fertilization, and implantation / E. Borges, D. P. A. F. Braga, A. Setti [et al.] // *JJBRA Assisted Reproduction*. – 2017. – Vol. 21. – № 3. – P. 176-182.

44. Using serum anti-Müllerian hormone levels to predict the chance of live birth after spontaneous or assisted conception: a systematic review and meta-analysis / M. Peigné, V. Bernard, L. Dijols [et al.] // *Human Reproduction*. – 2023. – Vol. 38. – № 9. – P. 1789-1806.
45. IVF outcomes of women with discrepancies between age and serum anti-Müllerian hormone levels / B. Zhang, Y. Meng, X. Jiang [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2019. – Vol. 17. – № 1. – P. 58.
46. AMH has no role in predicting oocyte quality in women with advanced age undergoing IVF/ICSI cycles / X. Dai, Y. Wang, H. Yang [et al.] // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 19750.
47. Anti-müllerian hormone as a predictor for live birth among women undergoing IVF/ICSI in different age groups: an update of systematic review and meta-analysis / N. J. Li, Q. Y. Yao, X. Q. Yuan [et al.] // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. – 2023. – Vol. 308. – № 1. – P. 43-61.
48. Maternal age affects the relationship of basal FSH and anti-Müllerian hormone concentrations with post-ICSI/IVF live birth / J. Buratini, M. Dal Canto, E. De Ponti [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2021. – Vol. 42. – № 4. – P. 748-756.
49. Low antimüllerian hormone (AMH) is associated with decreased live birth after in vitro fertilization when follicle-stimulating hormone and AMH are discordant / S. Ligon, M. Lustik, G. Levy, B. Pier // *Fertility and sterility*. – 2019. – Vol. 112. – № 1. – P. 73-81.e1.
50. Oocyte matched follicular fluid anti-Müllerian hormone is an excellent predictor of live birth after fresh single embryo transfer / P. Ciepiela, A. J. Dulęba, A. Kario [et al.] // *Human Reproduction*. – 2019. – Vol. 34. – № 11. – P. 2244-2253.
51. Follicle Stimulating Hormone (FSH) as a Predictor of Decreased Oocyte Yield in Patients with Normal Anti-Müllerian Hormone (AMH) and Antral Follicle Count (AFC) / C. M. Miller, R. E. M. Melikian, T. L. Jones [et al.] // *Journal of Reproduction & Infertility*. – 2023. – Vol. 24. – № 3. – P. 181-187.

52. Diminished ovarian reserve is associated with reduced euploid rates via preimplantation genetic testing for aneuploidy independently from age: evidence for concomitant reduction in oocyte quality with quantity / E. G. Jaswa, C. E. McCulloch, R. Simbulan [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2021. – Vol. 115. – № 4. – P. 966-973.

53. Serum antimüllerian hormone levels are independently related to miscarriage rates after in vitro fertilization-embryo transfer / B. Tarasconi, T. Tadros, J. M. Ayoubi [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2017. – Vol. 108. – № 3. – P. 518-524.

54. Diminished ovarian reserve and poor response to stimulation in patients <38 years old: a quantitative but not qualitative reduction in performance / S. J. Morin, G. Patounakis, C. R. Juneau [et al.] // *Human Reproduction*. – 2018. – Vol. 33. – № 8. – P. 1489-1498.

55. Seifer, D. B. Cumulative live birth rates with autologous oocytes plateau with fewer number of cycles for each year of age > 42 / D. B. Seifer, S. F. Wang, D. Frankfurter // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 94.

56. IVF in women aged 43 years and older: a 20-year experience / A. M. Fernandez, P. Drakopoulos, J. Rosetti [et al.] // *Reproductive biomedicine online*. – 2021. – Vol. 42. – № 4. – P. 768-773.

57. Update on the management of poor ovarian response in IVF: the shift from Bologna criteria to the Poseidon concept / P. Drakopoulos, E. Bardhi, L. Boudry [et al.] // *Therapeutic advances in reproductive health*. – 2020. – Vol. 14. – P. 2633494120941480.

58. The impact of age and number of oocytes retrieved on the cumulative live birth rate in women with poor ovarian response: A 15-year study / L. Polanski, Y. Beebejaun, S. El-Toukhy, T. El-Toukhy // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2025. – Vol. 305. – P. 5-10.

59. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria / A. P. Ferraretti, A. La Marca, B. C. Fauser [et al.] // *Human reproduction*. – 2011. – Vol. 26. – № 7. – P. 1616-24.

60. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept / C. Alviggi, C.Y. Andersen, K. Buehler [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2016. – Vol. 105. – № 6. – P. 1452-1453.
61. Cumulative live birth rates in more than 3, 000 patients with poor ovarian response: a 15-year survey of final in vitro fertilization outcome / B. Xu, Y. Chen, D. Geerts [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2018. – Vol. 109. – № 6. – P. 1051-1059.
62. Younger poor ovarian response women achieved better pregnancy results in the first three IVF cycles / Y. Yang, X. Sun, L. Cui [et al.] // *Reproductive biomedicine online*. – 2016. – Vol. 32. – № 5. – P. 532-7.
63. Editorial: POSEIDON's Stratification of 'Low Prognosis' Patients in ART: The WHY, the WHAT, and the HOW / S. C. Esteves, C. Y. Andersen, R. Fischer [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 12. – P. 719647.
64. Alviggi, C. Impact of mutations and polymorphisms of gonadotrophins and their receptors on the outcome of controlled ovarian stimulation. In: Ghumman S editor. *Principles and Practice of Controlled Ovarian Stimulation in ART* / C. Alviggi, A. Conforti, S. C. Esteves // New Delhi: Springer India. – 2015. – P. 147-156.
65. Reig, A. Bologna vs. POSEIDON criteria as predictors of the likelihood of obtaining at least one euploid embryo in poor ovarian response: an analysis of 6, 889 cycles / A. Reig, J. A. Garcia-Velasco, E. Seli // *Fertility and Sterility*. – 2023. – Vol. 120. – № 3 Pt 2. – P. 605-614.
66. Growth hormone ameliorates the age-associated depletion of ovarian reserve and decline of oocyte quality via inhibiting the activation of Fos and Jun signaling / C. Liu, S. Li, Y. Li [et al.] // *Aging (Albany NY)*. – 2021. – Vol. 13. – № 5. – P. 6765-6781.
67. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization / G. L. Harton, S. Munné, M. Surrey [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2013. – Vol. 100. – № 6. – P. 1695-703.
68. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15, 169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive

chromosomal screening / J. M. Franasiak, E. J. Forman, K. H. Hong [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2014. – Vol. 101. – № 3. – P. 656-663.e1.

69. What is new in the management of poor ovarian response in IVF? / A. Vaiarelli, D. Cimadomo, N. Ubaldi [et al.] // *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. – 2018. – Vol. 30. – №. 3. – P. 155-162.

70. Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation / A. H. Handyside, M. Montag, M. C. Magli [et al.] // *European Journal of Human Genetics*. – 2012. – Vol. 20. – № 7. – P. 742-7.

71. Relationship between paternal factors and embryonic aneuploidy of paternal origin / M. L. Bonus, D. B. McQueen, R. Ruderman [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2022. – Vol. 118. – № 2. – P. 281-288.

72. Charalambous, C. Aneuploidy in mammalian oocytes and the impact of maternal ageing / C. Charalambous, A. Webster, M. Schuh // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2023. – Vol. 24. – № 1. – P. 27-44.

73. Viotti, M. Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements / M. Viotti // *Genes (Basel)*. – 2020. – Vol. 11. – № 6. – P. 602.

74. Wasielek-Politowska, M. Chromosome Segregation in the Oocyte: What Goes Wrong during Aging / M. Wasielek-Politowska, P. Kordowitzki // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 5. – P. 2880.

75. Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes / M. Tsutsumi, R. Fujiwara, H. Nishizawa [et al.] // *PLOS One*. – 2014. – Vol. 9. – № 5. – P. e96710.

76. Single-oocyte transcriptome analysis reveals aging-associated effects influenced by life stage and calorie restriction / T. Mishina, N. Tabata, T. Hayashi [et al.] // *Aging Cell*. – 2021. – Vol. 20. – № 8. – P. e13428.

77. Смирнова, А. А. Возрастные изменения и риск хромосомных аномалий в ооцитах человека (обзор литературы) / А. А. Смирнова, Н. А. Зыряева, М. Б. Аншина // *Проблемы репродукции*. – 2019. – Т. 25. – № 2. – С. 16-26.

78. Age-dependent loss of cohesion protection in human oocytes / B. P. Mihalas, G. H. Pieper, M. Aboelenain [et al.] // *Current Biology*. – 2024. – Vol. 34. – № 1. – P. 117-131.e5.
79. Age-dependent integrity of the meiotic spindle assembly checkpoint in females requires Aurora kinase B / C. S. Blengini, A. L. Nguyen, M. Aboelenain, K. Schindler // *Aging Cell*. – 2021. – Vol. 20. – № 11. – P. e13489.
80. Solovova, O. A. Genetics of Oocyte Maturation Defects and Early Embryo Development Arrest / O. A. Solovova, V. B. Chernykh // *Genes (Basel)*. – 2022. – Vol. 13. – № 11. – P. 1920.
81. Deleterious mtDNA mutations are common in mature oocytes / H. Ma, T. Hayama, C. Van Dyken [et al.] // *Biology of reproduction*. – 2020. – Vol. 102. – № 3. – P. 607-619.
82. Maintaining mitochondrial DNA copy number mitigates ROS-induced oocyte decline and female reproductive aging / S. Long, Y. Zheng, X. Deng [et al.] // *Communications Biology*. – 2024. – Vol. 7. – № 1. – P. 1229.
83. Mitochondria in Ovarian Aging and Reproductive Longevity / J. L. Chiang, P. Shukla, K. Pagidas [et al.] // *Ageing research reviews*. – 2020. – Vol. 63. – P. 101168.
84. Zhang, W. Effects of adverse fertility-related factors on mitochondrial DNA in the oocyte: a comprehensive review / W. Zhang, F. Wu // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 27.
85. Perturbations of morphogenesis at the compaction stage affect blastocyst implantation and live birth rates / G. Coticchio, K. Ezoe, C. Lagalla [et al.] // *Human Reproduction*. – 2021. – Vol. 36. – № 4. – P. 918-928.
86. Mechanics of human embryo compaction / J. Firmin, N. Ecker, D. Rivet Danon [et al.] // *Nature*. – 2024. – Vol. 629. – № 8012. – P. 646-651.
87. Alternative patterns of partial embryo compaction: prevalence, morphokinetic history and possible implications / C. Lagalla, G. Coticchio, R. Sciajno [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2020. – Vol. 40. – № 3. – P. 347-354.

88. Maternal age affects pronuclear and chromatin dynamics, morula compaction and cell polarity, and blastulation of human embryos / K. Ezoe, T. Miki, H. Akaike [et al.] // *Human Reproduction*. – 2023. – Vol. 38. – № 3. – P. 387-399.
89. Zhu, Z. Ovarian aging: mechanisms and intervention strategies / Z. Zhu, W. Xu, L. Liu // *Medical Review*. – 2022. – Vol. 2. – № 6. – P. 590-610.
90. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities / R. Di Micco, V. Krizhanovsky, D. Baker [et al.] // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2021. – Vol. 22. – № 2. – P. 75-95.
91. Mitochondria: the epigenetic regulators of ovarian aging and longevity / S. Mani, V. Srivastava, C. Shandilya [et al.] // *Frontiers in endocrinology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1424826.
92. Cellular hallmarks of aging emerge in the ovary prior to primordial follicle depletion / V. A. Ansere, S. Ali-Mondal, R. Sathiaselan [et al.] // *Mechanisms of ageing and development*. – 2021. – Vol. 194. – P. 111425.
93. CDKN1A/p21 in Breast Cancer: Part of the Problem, or Part of the Solution? / E. Manousakis, C. M. Miralles, M. G. Esquerda, R. H. G. Wright // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 24. – P. 17488.
94. Molecular and genetic insights into human ovarian aging from single-nuclei multi-omics analyses / C. Jin, X. Wang, J. Yang [et al.] // *Nature aging*. – 2025. – Vol. 5. – № 2. – P. 275-290.
95. Spatiotemporal transcriptomic changes of human ovarian aging and the regulatory role of FOXP1 / M. Wu, W. Tang, Y. Chen [et al.] // *Nature Aging*. – 2024. – Vol. 4. – № 4. – P. 527-545.
96. Beyond apoptosis: evidence of other regulated cell death pathways in the ovary throughout development and life / M. Mustafa, L. R. Alesi, A. L. Winship, K. J. Hutt // *Human Reproduction Update*. – 2023. – Vol. 29. – № 4. – P. 434-456.
97. The ovarian reserve is depleted during puberty in a hormonally driven process dependent on the pro-apoptotic protein BMF / S. H. Liew, Nguyen Q-N, A. Strasser [et al.] // *Cell death & disease*. – 2017. – Vol. 8. – № 8. – P. e2971-e2971.

98. Pelosi, E. Genetics of the ovarian reserve / E. Pelosi, A. Forabosco, D. Schlessinger // *Frontiers in genetics*. – 2015. – Vol. 6. – P. 308.
99. Lossi, L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis / L. Lossi // *Biochemical Journal*. – 2022. – Vol. 479. – № 3. – P. 357-384.
100. Лаврик, И. Н. Регуляция апоптоза, индуцируемого через cd95/fas и другие" рецепторы смерти" / И. Н. Лаврик // *Молекулярная биология*. – 2011. – Т. 45. – № 1. – С. 173-179.
101. Caspase-8: The double-edged sword / R. Mandal, J. C. Barrón, I. Kostova [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. – 2020. – Vol. 1873. – № 2. – P. 188357.
102. Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications / M. Mustafa, R. Ahmad, I. Q. Tantry [et al.] // *Cells*. – 2024. – Vol. 13. – № 22. – P. 1838.
103. Yuan, J. A guide to cell death pathways / J. Yuan, D. Ofengeim // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2024. – Vol. 25. – № 5. – P. 379-395.
104. Савицкая, М. А. Механизмы апоптоза (обзор) / М. А. Савицкая, Г. Е. Онищенко // *Биохимия*. – 2015. – Т. 80. – № 11. – С. 1613-1627.
105. Molecular regulation of DNA damage and repair in female infertility: a systematic review / X. Xu, Z. Wang, L. Lv [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 103.
106. The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing / A. L. Winship, J. M. Stringer, S. H. Liew, K. J. Hutt // *Human reproduction update*. – 2018. – Vol. 24. – № 2. – P. 119-134.
107. Premature ovarian insufficiency: pathogenesis and therapeutic potential of mesenchymal stem cell / A. Takahashi, A. Yousif, L. Hong, I. Chefetz // *Journal of Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 99. – № 5. – P. 637-650.
108. DNA Damaged Induced Cell Death in Oocytes / J. Gebel, M. Tuppi, N. Sängler [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 23. – P. 5714.

109. Kobayashi, H. Exploring potential pathways from oxidative stress to ovarian aging / H. Kobayashi, S. Imanaka // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 2025. – Vol. 51. – № 1. – P. e16166.
110. Human ovarian aging is characterized by oxidative damage and mitochondrial dysfunction / M. A. J. Smits, B. V. Schomakers, M. van Weeghel [et al.] // *Human Reproduction*. – 2023. – Vol. 38. – № 11. – P. 2208-2220.
111. Tesarik, J. Ovarian Aging: Molecular Mechanisms and Medical Management / J. Tesarik, M. Galán-Lázaro, R. Mendoza-Tesarik // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 3. – P. 1371.
112. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D. P. Jones // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2020. – Vol. 21. – № 7. – P. 363-383.
113. The Role of Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Ovarian Aging / L. Yang, Y. Chen, Y. Liu [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 617843.
114. Allethrin Promotes Apoptosis and Autophagy Associated with the Oxidative Stress-Related PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Developing Rat Ovaries / M. Jalouli, A. Mofti, Y. A. Elnakady [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 12. – P. 6397.
115. Building a Human Ovarian Antioxidant ceRNA Network "OvAnOx": A Bioinformatic Perspective for Research on Redox-Related Ovarian Functions and Dysfunctions / C. Tatone, G. Di Emidio, R. Battaglia [et al.] // *Antioxidants*. – 2024. – Vol. 13. – № 9. – P. 1101.
116. MicroRNAs in ovarian follicular atresia and granulosa cell apoptosis / J. Zhang, Y. Xu, H. Liu, Z. Pan // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2019. – Vol. 17. – № 1. – P. 9.
117. Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress / Y. Guan, W. Zhang, X. Wang // *Clinica Chimica Acta*. – 2017. – Vol. 473. – P. 213-217.

118. He, F. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond / F. He, X. Ru, T. Wen // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 13. – P. 4777.
119. Madden, S. K. Structural and mechanistic insights into the Keap1-Nrf2 system as a route to drug discovery / S. K. Madden, L. S. Itzhaki // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2020. – Vol. 1868. – № 7. – P. 140405.
120. Lead exposure activates the Nrf2/Keap1 pathway, aggravates oxidative stress, and induces reproductive damage in female mice / X. Jiang, X. Xing, Y. Zhang [et al.] // Ecotoxicology and environmental safety. – 2021. – Vol. 207. – P. 111231.
121. Сиртуины и старение / А. Э. Пухальская, И. М. Кветной, Н. С. Линькова [и др.] // Успехи физиологических наук. – 2022. – Т. 53. – № 1. – С. 16-27.
122. Iljas, J. D. Sirt1 sustains female fertility by slowing age-related decline in oocyte quality required for post-fertilization embryo development / J. D. Iljas, Z. Wei, H. A. Homer // Aging Cell. – 2020. – Vol. 19. – № 9. – P. e13204.
123. Sirt3 deficiency accelerates ovarian senescence without affecting spermatogenesis in aging mice / J. Zhu, Q. Yang, H. Li [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2022. – Vol. 193. – P. 511-525.
124. Establishment of a Mouse Model of Premature Ovarian Failure Using Consecutive Superovulation / X. Nie, Y. Dai, Y. Zheng [et al.] // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2018. – Vol. 51. – № 5. – P. 2341-2358.
125. Shi, F. Relationship between FoxO1 protein levels and follicular development, atresia, and luteinization in the rat ovary / F. Shi, P. S. LaPolt // Journal of endocrinology. – 2003. – Vol. 179. – № 2. – P. 195-203.
126. FOXO1 Is a Critical Switch Molecule for Autophagy and Apoptosis of Sow Endometrial Epithelial Cells Caused by Oxidative Stress / J. Lu, J. Huang, S. Zhao [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2021. – Vol. 2021. – P. 1172273.
127. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis / B. H. Ahn, H. S. Kim, S. Song [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 105. – № 38. – P. 14447-14452.

128. Mitochondrial Sirtuins in Reproduction / G. Di Emidio, S. Falone, P. G. Artini [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – № 7. – P. 1047.
129. Catalpol protects rat ovarian granulosa cells against oxidative stress and apoptosis through modulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway / J. Yan, D. Deng, Y. Wu [et al.] // *Bioscience reports*. – 2020. – Vol. 40. – № 4. – P. BSR20194032.
130. Isorhamnetin Promotes Estrogen Biosynthesis and Proliferation in Porcine Granulosa Cells via the PI3K/Akt Signaling Pathway / X. Li, H. Chen, Z. Zhang [et al.] // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2021. – Vol. 69. – № 23. – P. 6535-6542.
131. Glucose metabolism characterization during mouse in vitro maturation identifies alterations in cumulus cells† / N. Akin, L. von Mengden, A. C. Herta [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2021. – Vol. 104. – № 4. – P. 902-913.
132. Metabolic cooperation in the ovarian follicle / J. Fontana, S. Martínková, J. Petr [et al.] // *Physiological research*. – 2019. – Vol. 69. – № 1. – P. 33.
133. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence / D. Richani, K. R. Dunning, J. G. Thompson, R. B. Gilchrist // *Human reproduction update*. – 2021. – Vol. 27. – № 1. – P. 27-47.
134. Electro-Metabolic Coupling of Cumulus-Oocyte Complex / D. Del Bianco, R. Gentile, L. Sallicandro [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2024. – Vol. 25. – № 10. – P. 5349
135. Glucose metabolism is required for oocyte maturation of zebrafish / T. Kang, S. Zhao, L. Shi, J. Li // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2021. – Vol. 559. – P. 191-196.
136. Bao, S. Ovarian aging: energy metabolism of oocytes / S. Bao, T. Yin, S. Liu // *Journal of ovarian research*. – 2024. – Vol. 17. – № 1. – P. 118.
137. Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles / P. May-Panloup, L. Boucret, J-M. Chao de la Barca [et al.] // *Human reproduction update*. – 2016. – Vol. 22. – № 6. – P. 725-743.
138. Aging conundrum: A perspective for ovarian aging / J. Wu, Y. Liu, Y. Song [et al.] // *Frontiers in endocrinology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 952471.

139. Leuthner, T. C. Mitochondrial DNA mutagenesis: feature of and biomarker for environmental exposures and aging / T. C. Leuthner, J. N. Meyer // *Current environmental health reports*. – 2021. – Vol. 8. – № 4. – P. 294-308.

140. Королькова, А. И. Оптимизация программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста на основании оценки митохондриального потенциала и преимплантационного генетического скрининга эмбрионов: специальность 3.1.4 «Акушерство и гинекология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Королькова Анна Игоревна ; ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова Минздрава России. – Москва, 2019. – 114 с.

141. Oocyte Aging: A Multifactorial Phenomenon in A Unique Cell / P. Kordowitzki, S. Graczyk, A. Haghani, M. Klutstein // *Aging and disease*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 5.

142. Eckersley-Maslin, M. A. Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition / M. A. Eckersley-Maslin, C. Alda-Catalinas, W. Reik // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2018. – Vol. 19. – № 7. – P. 436-450.

143. Biophysical optimization of preimplantation embryo culture: what mechanics can offer ART / J. Hawkins, X. Miao, W. Cui, Y. Sun // *Molecular human reproduction*. – 2021. – Vol. 27. – № 1. – P. gaaa087.

144. Sciorio, R. Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions / R. Sciorio, P. Rinaudo // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2023. – Vol. 40. – № 11. – P. 2591-2607.

145. Оптимизация эмбриологического этапа в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий с применением культуральных сред с гиалуроновой кислотой у супружеских пар с преимплантационным генетическим тестированием на анеуплоидии / Ю. С. Драпкина, Е. В. Кулакова, О. С. Непша [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2021. – Т. 11. – С. 166-174.

146. Conditions de culture pour les gamètes et embryons: quels milieux de culture ? et quelle incidence sur le nouveau-né ? [Culture conditions for gametes and

embryos: Which culture medium? Which impact on newborn?]/ I. Koscinski, M. Merten, N. Kazdar, J. L. Guéant // *Gynecologie, Obstetrique, Fertilité & Senologie*. – 2018. – Vol. 46. – № 5. – P. 474-480.

147. Gardner, D. K. Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters / D. K. Gardner, M. Lane // *Human Reproduction*. – 1996. – Vol. 11. – № 12. – P. 2703-2712.

148. Leese, H. J. Human embryo culture: back to nature / H. J. Leese // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 1998. – Vol. 15. – № 8. – P. 466.

149. Biggers, J. D. Reflections on the culture of the preimplantation embryo / J. D. Biggers // *International Journal of Developmental Biology*. – 1998. – Vol. 42. – P. 879-884.

150. The composition of commercially available human embryo culture media / M. S. Zagers, M. Laverde, M. Goddijn [et al.] // *Human Reproduction*. – 2025. – Vol. 40. – № 1. – P. 30-40.

151. Ferrick, L. Metabolic activity of human blastocysts correlates with their morphokinetics, morphological grade, KIDScore and artificial intelligence ranking / L. Ferrick, Y. S. L. Lee, D. K. Gardner // *Human Reproduction*. – 2020. – Vol. 35. – № 9. – P. 2004-2016.

152. Lee, Y. S. Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage / Y. S. Lee, G. A. Thouas, D. K. Gardner // *Human Reproduction*. – 2015. – Vol. 30. – № 3. – P. 543-52.

153. The impact of culture conditions on blastocyst formation and aneuploidy rates: a comparison between single-step and sequential media in a large academic practice / J. Deng, Q. Zhao, C. Cinnioglu [et al.] // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2020. – Vol. 37. – № 1. – P. 161-169.

154. Euploidy rates are not affected when embryos are cultured in a continuous (CCM) or sequential culture medium (SCM): a sibling oocyte study / A. Abdala,

I. Elkhatib, A. Bayram [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2021. – Vol. 38. – № 8. – P. 2199-2207.

155. Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии: возможности, проблемы и перспективы / Г. В. Савостина, С. Г. Перминова, А. Н. Екимов, М. А. Веюкова // Акушерство и гинекология. – 2021. – Т. 11. – С. 42-49

156. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study / Z. Yang, J. Lin, J. Zhang [et al.] // BMC medical genomics. – 2015. – Vol. 8. – P. 30.

157. Clinical error rates of next generation sequencing and array comparative genomic hybridization with single thawed euploid embryo transfer / J. Friedenthal, S. M. Maxwell, A. W. Tiegs [et al.] // European Journal of Medical Genetics. – 2020. – Vol. 63. – № 5. – P. 103852.

158. The reproducibility of trophoctoderm biopsies in euploid, aneuploid, and mosaic embryos using independently verified next-generation sequencing (NGS): a pilot study / N. M. Sachdev, D. H. McCulloh, Y. Kramer [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2020. – Vol. 37. – № 3. – P. 559-571.

159. Хачатрян, Л. В. Живорождение после применения методов вспомогательных репродуктивных технологий у пациентки позднего репродуктивного возраста с собственными ооцитами без преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии / Л. В. Хачатрян, В. Ю. Смольникова, Н. П. Макарова // Акушерство и гинекология. – 2023. – № 7. – С. 175-179.

160. Identification of mosaic and segmental aneuploidies by next-generation sequencing in preimplantation genetic screening can improve clinical outcomes compared to array-comparative genomic hybridization / H. H. Lai, T. H. Chuang, L. K. Wong [et al.] // Molecular cytogenetics. – 2017. – Vol. 10. – № 1. – P. 14.

161. Next-Generation Sequencing (NGS)-Based Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy (PGT-A) of Trophoctoderm Biopsy for Recurrent Implantation Failure (RIF) Patients: a Retrospective Study / J. Tong, Y. Niu, A. Wan, T. Zhang // Reproductive Sciences. – 2021. – Vol. 28. – № 7. – P. 1923-1929.

162. Performance of preimplantation genetic testing for aneuploidy for patients with unexplained recurrent pregnancy loss and repeated implantation failure / Y. Mei, Y. Wang, L. He [et al.] // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10. – № 11. – P. e31983.

163. Opening the black box: why do euploid blastocysts fail to implant? A systematic review and meta-analysis / D. Cimadomo, L. Rienzi, A. Conforti [et al.] // *Human reproduction update*. – 2023. – Vol. 29. – № 5. – P. 570-633.

164. Lessons learned from 64, 071 embryos subjected to PGT for aneuploidies: results, recurrence pattern and indications analysis / R. Matorras, S. Pérez-Fernández, A. Mercader [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2024. – Vol. 49. – № 5. – P. 103979.

165. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy in In Vitro Fertilization Using Comprehensive Chromosome Screening: A Systematic Review and Meta-Analysis / O. Taskin, A. Hochberg, J. Tan [et al.] // *International Journal of Fertility & Sterility*. – 2024. – Vol. 18. – № 3. – P. 185-194.

166. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy with Comprehensive Chromosome Screening in Patients Undergoing In Vitro Fertilization: A Systematic Review and Meta-analysis / X. Cheng, Y. Zhang, H. Deng [et al.] // *Obstetrics & Gynecology*. – 2022. – Vol. 140. – № 5. – P. 769-777.

167. Clinical outcomes of preimplantation genetic testing for aneuploidy in high-risk patients: a retrospective cohort study / J. W. Kim, S. Y. Lee, C. Y. Hur [et al.] // *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. – 2024. – Vol. 51. – № 1. – P. 75-84.

168. Maternal age-related declines in live birth rate following single euploid embryo transfer: a retrospective cohort study / W. Jiang, Z. Zheng, N. Yan [et al.] // *Journal of Ovarian Research*. – 2025. – Vol. 18. – № 1. – P. 24.

169. Vitagliano, A. Does maternal age affect assisted reproduction technology success rates after euploid embryo transfer? A systematic review and meta-analysis / A. Vitagliano, A. Paffoni, P. Viganò // *Fertility and Sterility*. – 2023. – Vol. 120. – № 2. – P. 251-265.

170. A pilot study of transcriptomic preimplantation genetic testing (PGT-T): towards a new step in embryo selection? / D. Ortega-Jaén, C. Mora-Martinez, A. Capalbo [et al.] // *Human Reproduction*. – 2025. – Vol. 40. – № 2. – P. 244-260.
171. Bioengineered microenvironment to culture early embryos / Z. Gu, J. Guo, H. Wang [et al.] // *Cell Proliferation*. – 2020. – Vol. 53. – № 2. – P. e12754.
172. Johnson, M. Human in vitro fertilisation and developmental biology: a mutually influential history / M. Johnson // *Development*. – 2019. – Vol. 146. – № 17. – P. dev183145.
173. Maternal factor OTX2 regulates human embryonic genome activation and early development / Q. Wang, C. Zhang, Y. Dang [et al.] // *Nature Genetics*. – 2025. – Vol. 57. – № 11. – P. 2772-2784.
174. Ko, M. S. Zygotic Genome Activation Revisited: Looking Through the Expression and Function of Zscan4 / M. S. Ko // *Current topics in developmental biology*. – 2016. – Vol. 120. – P. 103-124.
175. Human embryo polarization requires PLC signaling to mediate trophectoderm specification / M. Zhu, M. Shahbazi, A. Martin [et al.] // *Elife*. – 2021. – Vol. 10. – P. e65068.
176. Rossant, J. Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation / J. Rossant, P. P. L. Tam // *Developmental cell*. – 2022. – Vol. 57. – № 2. – P. 152-165.
177. p300-mediated lysine 2-hydroxyisobutyrylation regulates glycolysis / H. Huang, S. Tang, M. Ji [et al.] // *Molecular cell*. – 2018. – Vol. 70. – № 4. – P. 663-678. e6.
178. Lactylation: the novel histone modification influence on gene expression, protein function, and disease / Y. Hu, Z. He, Z. Li [et al.] // *Clinical epigenetics*. – 2024. – Vol. 16. – № 1. – P. 72.
179. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation / D. Zhang, Z. Tang, H. Huang [et al.] // *Nature*. – 2019. – Vol. 574. – № 7779. – P. 575-580.
180. Lee, T. Y. Lactate: a multifunctional signaling molecule / T. Y. Lee // *Yeungnam University journal of medicine*. – 2021. – Vol. 38. – № 3. – P. 183-193.

181. Lactate regulates major zygotic genome activation by H3K18 lactylation in mammals / J. Li, W. Hou, Q. Zhao [et al.] // National Science Review. – 2023. – Vol. 11. – № 2. – P. nwad295.
182. Revealing the effects of lactate on bovine SCNT embryo development through transcriptome sequencing analyses / N. Li, H. Chen, H. Zheng [et al.] // Theriogenology. – 2025. – Vol. 236. – P. 137-146.
183. Genetic expression of monocarboxylate transporters during human and murine oocyte maturation and early embryonic development / F. Hérubel, S. El Mouatassim, P. Guérin [et al.] // Zygote. – 2002. – Vol. 10. – № 2. – P. 175-181.
184. Lactic acid: a novel signaling molecule in early pregnancy? / L. N. Ma, X. B. Huang, K. P. Muyayalo [et al.] // Frontiers in immunology. – 2020. – Vol. 11. – P. 279.
185. Pohanka, M. D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection / M. Pohanka // BioMed Research International. – 2020. – Vol. 2020. – P. 3419034.
186. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells / D. K. Gardner, M. Lane, I. Calderon, J. Leeton // Fertility and Sterility. – 1996. – Vol. 65. – № 2. – P. 349–353.
187. Creation, effects on embryo quality, and clinical outcomes of a new embryo culture medium with 31 optimized components derived from human oviduct fluid: A prospective multicenter randomized trial / T. Utsunomiya, T. Yao, H. Itoh [et al.] // Reproductive Medicine and Biology. – 2022. – Vol. 21. – № 1. – P. e12459.
188. Gurner, K. H. Blastocyst-Derived Lactate as a Key Facilitator of Implantation / K. H. Gurner, D. K. Gardner // Biomolecules. – 2025. – Vol. 15. – № 1. – P. 100.
189. Trophoblast-derived Lactic Acid Orchestrates Decidual Macrophage Differentiation via SRC/LDHA Signaling in Early Pregnancy / L. Gao, Q. H. Xu, L. N. Ma [et al.] // International journal of biological sciences. – 2022. – Vol. 18. – № 2. – P. 599-616.

190. Асфарова, Г.Р. Повышение эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий с помощью аутологичного сокультивирования эмбрионов с клетками кумулюса: специальность 3.1.4 «Акушерство и гинекология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Асфарова Гунай Раисовна; ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова Минздрава России. – Москва, 2023. – 121 с.

191. World Health Organization: official website. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (WHO, 2021) [Electronic resource] – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787> (дата обращения 15.02.2025).

192. Прогностическая ценность индексов овариальной стимуляции у пациенток позднего репродуктивного возраста / Л. В. Хачатрян, В. Ю. Смольникова, Н. П. Макарова, Е. А. Калинина // Медицинский совет. – 2026. – №4. – С. 54-60.

193. Serum anti-müllerian hormone levels are negatively related to follicular output rate (FORT) in normo-cycling women undergoing controlled ovarian hyperstimulation / V. K. Genro, M. Grynberg, J. B. Scheffer [et al.] // Human reproduction. – 2011. – Vol. 26. – № 3. – P. 671-677.

194. Understanding ovarian hypo-response to exogenous gonadotropin in ovarian stimulation and its new proposed marker-the follicle-to-oocyte (FOI) Index / C. Alviggi, A. Conforti, S. C. Esteves [et al.] // Frontiers in endocrinology. – 2018. – Vol. 9. – P. 589.

195. Follicular output rate and follicle-to-oocyte index of low prognosis patients according to POSEIDON criteria: a retrospective cohort study of 32, 128 treatment cycles / L. Chen, H. Wang, H. Zhou [et al.] // Frontiers in endocrinology. – 2020. – Vol. 11. – P. 181.

196. Morbeck, D. E. Composition of single-step media used for human embryo culture / D. E. Morbeck, N. A. Baumann, D. Oglesbee // Fertility and sterility – 2017. – Vol. 107. – № 4. – P. 1055-1060.e1.

197. Gardner, D. K. Culture and transfer of human blastocysts / D. K. Gardner, W. B. Schoolcraft // Current Opinion in Obstetrics and Gynecology – 1999. – Vol. 11. – № 3. – P. 307-11.

198. Оценка ооцитов и эмбрионов в лаборатории ВРТ. Методические рекомендации / О. В. Шурыгина, А. В. Бачурин, Н. К. Бичева [и др.] // Российская Ассоциация Репродукции Человека. – 2021. – 17 с.

199. Correlation of IVF outcomes and number of oocytes retrieved: a UK retrospective longitudinal observational study of 172 341 non-donor cycles / G. Bahadur, R. Homburg, K. Jayaprakasan [et al.] // *BMJ Open*. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. e06471.

200. The association between the number of oocytes retrieved and cumulative live birth rate in different female age strata / P. Wang, C. Zhao, W. Xu [et al.] // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 14516.

201. Outcomes after a single ovarian stimulation cycle in women of advanced reproductive age: a retrospective analysis / M. Liu, X. Zhao, Y. Peng [et al.] // *Frontiers in endocrinology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 792159.

202. Age effect on in vitro fertilization pregnancy mediated by anti-Mullerian hormone (AMH) and modified by follicle stimulating hormone (FSH) / H. C. Hsieh, J. Y. Su, S. Wang [et al.] // *BMC pregnancy and childbirth*. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 209.

203. Age-related distributions of anti-Müllerian hormone level and anti-Müllerian hormone models / J. Y. Lee, B. C. Jee, J. R. Lee [et al.] // *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. – 2012. – Vol. 91. – № 8. – P. 970-975.

204. Analysis of cumulative outcomes and influencing factors of patients with discrepancies between age and AMH levels in the early follicular phase prolonged protocol / K. Wang, Y. Guan, Y. Zhang [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1098131.

205. Live birth rates in in vitro fertilization cycles with five or fewer follicles / M. J. Bayefsky, S. D. Cascante, D. H. McCulloh [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2024. – Vol. 41. – № 1. – P. 223-229.

206. The number and rate of euploid blastocysts in women undergoing IVF/ICSI cycles are strongly dependent on ovarian reserve and female age / A. La Marca,

M. Capuzzo, M. Longo [et al.] // *Human Reproduction*. – 2022. – Vol. 37. – № 10. – P. 2392-2401.

207. Age-specific blastulation rates in embryo cryopreservation cycles yielding a cryopreserved blastocyst / P. A. Romanski, A. Aluko., P. Bortoletto [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2021. – Vol. 116. – № 1. – P. e11-e12.

208. Younes, G. Effects of adenomyosis on in vitro fertilization treatment outcomes: a meta-analysis / G. Younes, T. Tulandi // *Fertility and sterility*. – 2017. – Vol. 108. – № 3. – P. 483-490.e3.

209. The effect of uterine adenomyosis on IVF outcomes: a systematic review and meta-analysis / M. Cozzolino, S. Tartaglia, L. Pellegrini [et al.] // *Reproductive Sciences*. – 2022. – Vol. 29. – № 11. – P. 3177-3193.

210. Different subtypes of ultrasound-diagnosed adenomyosis and in vitro fertilization outcomes: A systematic review and meta-analysis / X. L. Wang, Z. W. Xu, Y. Y. Huang [et al.] // *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. – 2023. – Vol. 102. – № 6. – P. 657-668.

211. The effect of previous induced abortion history on the assisted reproduction outcomes / S. Xu, W. Zhao, Y. Zhang [et al.] // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. – 2024. – Vol. 309. – № 2. – P. 469-474.

212. Association between induced abortion history and later in vitro fertilization outcomes / Y. Wang, Y. Sun, W. Di [et al.] // *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. – 2018. – Vol. 141. – № 3. – P. 321-326.

213. Induced abortion and future use of IVF treatment; A nationwide register study / J. Männistö, M. Mentula, A. Bloigu [et al.] // *PLOS One*. – 2019. – Vol. 14. – № 11. – P. e0225162.

214. History of prior termination does not negatively impact ivf success rates / S. Martinez, A. Macharia, D. Sakkas [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2024. – Vol. 122. – № 1. – P. e50.

215. Total gonadotropin dose did not affect euploid blastocyst rates: an analysis of more than 19, 000 oocytes / J. Shuai, W. Liu, S. Wan [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2024. – Vol. 41. – № 9. – P. 2385-2396.

216. Effects of total gonadotropin dose on embryo quality and clinical outcomes with AMH stratification in IVF cycles: a retrospective analysis of 12, 588 patients / X. Shen, Y. Guo, Y. Liu [et al.] // *European Journal of Medical Research*. – 2024. – Vol. 29. – № 1. – P. 167.

217. The ovarian stimulation regimen does not affect aneuploidy or blastocyst rate / M. Cozzolino, L. Mossetti, G. Mariani [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2024. – Vol. 49. – № 2. – P. 103851.

218. Required amount of rFSH, HP-hMG and HP-FSH to reach a live birth: a systematic review and meta-analysis / E. M. Bordewijk, F. Mol, F. van der Veen [et al.] // *Human reproduction open*. – 2019. – Vol. 2019. – № 3. – P. hoz008.

219. Increased versus standard gonadotrophin dosing in predicted poor responders of IVF: an open-label randomized controlled trial / X. Liu, W. Wen, T. Wang [et al.] // *Human Reproduction*. – 2022. – Vol. 37. – № 8. – P. 1806-1815.

220. Individualised gonadotropin dose selection using markers of ovarian reserve for women undergoing in vitro fertilisation plus intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) / O. Ngwenya, S. F. Lensen, A. Vail [et al.] // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2024. – Vol. 1. – № 1. – P. CD012693.

221. Homer, H. A. Understanding oocyte ageing: can we influence the process as clinicians? / H. A. Homer // *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. – 2021. – Vol. 33. – № 3. – P. 218-224.

222. Grynberg, M. Understanding Follicular Output Rate (FORT) and its Implications for POSEIDON Criteria / M. Grynberg, J. Labrosse // *Frontiers in endocrinology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 246.

223. Prediction of IVF/ICSI outcome based on the follicular output rate / N. Zhang, C. F. Hao, L. L. Zhuang [et al.] // *Reproductive biomedicine online*. – 2013. – Vol. 27. – № 2. – P. 147-153

224. Follicular output rate can predict clinical pregnancy in women with unexplained infertility undergoing IVF/ICSI: a prospective cohort study / A. Hassan, M. Kotb, A. AwadAllah [et al.] // *Reproductive biomedicine online* – Vol. 34. – № 6. – P. 598-604.

225. Непрогнозируемый "бедный" ответ на овариальную стимуляцию в программе экстракорпорального оплодотворения и возможности его преодоления / С. Г. Перминова, И. С. Белова, Г. В. Савостина, Е. С. Санникова // *Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение*. – 2024. – Т. 12. – № 1. – С. 6-15.

226. Morphological assessment of oocyte quality during assisted reproductive technology cycle / R. Sciorio, L. Tramontano, P. F. Greco [et al.] // *JBRA assisted reproduction*. – 2024. – Vol. 28. – № 3. – P. 511-520.

227. The number of oocytes associated with maximum cumulative live birth rates per aspiration depends on female age: a population study of 221 221 treatment cycles / Y. J. Law, N. Zhang, C. A. Venetis [et al.] // *Human Reproduction*. – 2019. – Vol. 34. – № 9. – P. 1778-1787.

228. Cumulative live birth rates according to the number of oocytes retrieved following the "freeze-all" strategy / Z. Zhao, H. Shi, J. Li [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2020. – Vol. 18. – № 1. – P. 14.

229. Cumulative live birth rates per oocytes retrieved cycle: evaluation of clinical outcomes of IVF/ICSI / C. X. Wu, T. Zhang, L. Shu [et al.] // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. – 2018. – Vol. 53. – № 3. – P. 160-166.

230. Association between the number of oocytes and cumulative live birth rate: A systematic review / A. R. Neves, P. Montoya-Botero, N. Sachs-Guedj [et al.] // *Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology* – 2023. – Vol. 87. – P. 102307.

231. Cumulative live birth rates and number of oocytes retrieved in women of advanced age. A single centre analysis including 4500 women ≥ 38 years old / M. Devesa, R. Tur, I. Rodríguez [et al.] // *Human Reproduction*. – 2018. – Vol. 33. – № 11. – P. 2010-2017.

232. The Prediction of IVF Outcomes with Autologous Oocytes and the Optimal MII Oocyte/Embryo Number for Live Birth at Advanced Maternal Age / J. Havrljenko, V. Kopitovic, A. T. Pjevic [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. – 2023. – Vol. 59. – № 10. – P. 1799.

233. Minimum number of mature oocytes needed to obtain at least one euploid blastocyst according to female age in in vitro fertilization treatment cycles / C. Rodríguez-

Varela, J. M. Mascarós, E. Labarta [et al.] // Fertility and Sterility – 2024. – Vol. 122. – № 4. – P. 658-666.

234. Turathum, B. The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization / B. Turathum, E. M. Gao, R. C. Chian // Cells. – 2021. – Vol. 10. – № 9. – P. 2292.

235. The dose-dependent dual effects of alpha-ketoglutarate (AKG) on cumulus oocyte complexes during in vitro maturation / Y. Liu, X. Xiao, L. Wang [et al.] // Cell Communication and Signaling. – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 472.

236. Biomarkers Assessing the Role of Cumulus Cells on IVF Outcomes: A Systematic Review / G. Massoud, M. Spann, K. C. Vaught [et al.] // Journal of assisted reproduction and genetics. – 2024. – Vol. 41. – № 2. – P. 253-275.

237. Wilkinson, A. L. Epigenetic regulation of early human embryo development / A. L. Wilkinson, I. Zorzan, P. J. Rugg-Gunn // Cell Stem Cell. – 2023. – Vol. 30. – № 12. – P. 1569-1584.

238. Babayev, E. Age-associated changes in cumulus cells and follicular fluid: the local oocyte microenvironment as a determinant of gamete quality / E. Babayev, F. E. Duncan // Biology of reproduction. – 2022. – Vol. 106. – № 2. – P. 351-365.

239. Culture media for human pre-implantation embryos in assisted reproductive technology cycles / M. M. Youssef, E. Mantikou, M. van Wely [et al.] // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2015. – Vol. 2015. – № 11. – P. CD007876.

240. Scott, R. Metabolism of the oocyte and the preimplantation embryo: implications for assisted reproduction / R. Scott, M. Zhang, E. Seli // Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. – 2018. – Vol. 30. – № 3. – P. 163-170.

241. Lane, M. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo / M. Lane, D. K. Gardner // Biology of reproduction. – 2000. – Vol. 62. – № 1. – P. 16-22.

242. Follicular Fluid Components in Reduced Ovarian Reserve, Endometriosis, and Idiopathic Infertility / G. Collodel, L. Gambera, A. Stendardi [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 3. – P. 2589.

243. Low lactate levels in embryo culture media favor embryo utilization and pregnancy rates / G. Weiss, C. S. Comes, C. P. Leary [et al.] // *Age*. – Vol. 18. – № 30. – P. 31-35.

244. Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos / K. Hardy, M. A. Hooper, A. H. Handyside [et al.] // *Human Reproduction*. – 1989. – Vol. 4. – № 2. – P. 188-191.

245. Stress relief: can continuous culture in a low-lactate culture medium reduce numerical chromosomal abnormalities and therefore improve euploidy rates? / M. VerMilyea, C. Rios, A.A. Maizar [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2018 – Vol. 110. – № 4. – P. e361-e362.

246. Impact of low lactate culture media in embryo development and IVF outcomes / C. P. Leary, C. Serrano Comes, M. Hoermann-Kroepfl [et al.] // *Human Reproduction*. – 2024. – Vol. 39. – № Suppl. 1. – P. i282.

**Приложение А. Алгоритм выбора среды для культивирования эмбрионов
у пациенток позднего репродуктивного возраста**

