

НАО Казахский национальный медицинский университет  
им. С.Д. Асфендиярова

УДК 618.177-089.888.11

На правах рукописи

**РЫБИНА АНАСТАСИЯ НИКОЛАЕВНА**

**Персонализированный подход к преодолению бесплодия у пациенток  
старшего репродуктивного возраста**

8D10103 – Медицина

Диссертация на соискание степени  
доктора философии (PhD)

Научные руководители  
доктор медицинских наук,  
профессор,  
академик НАН РК  
В.Н. Локшин

кандидат медицинских наук,  
Карибаева Ш.К.

MD, PhD,  
профессор  
А. Элленбоген

Республика Казахстан  
Алматы 2026

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ</b> .....	4
<b>ОПРЕДЕЛЕНИЯ</b> .....	5
<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ</b> .....	7
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	9
<b>1 ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД ВРТ У ЖЕНЩИН СТАРШЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b> .....	15
1.1 Вспомогательные репродуктивные технологии: история, современное состояние в мире и РК.....	15
1.2 Персонализация в ВРТ: генотипическая предгравидарная подготовка.....	20
1.3 Овариальная стимуляция: выбор протокола, гормональный и УЗИ- мониторинг.....	26
1.4 Морфокинетика эмбрионов и ПГТ-А.....	32
1.5 Полость матки при бесплодии: диагностика и лечение хронического эндометрита.....	36
1.6 Образ жизни, вес и метаболический профиль в эффективности ВРТ.....	40
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	42
2.1 Характеристика исследования и групп пациентов.....	42
2.2 Молекулярно-генетические исследования (полиморфизмы гонадотропинов, фолатного обмена).....	44
2.3 Гистероскопия, иммуногистохимия эндометрия.....	45
2.4 Методы стимуляции, гормональный и УЗИ-мониторинг.....	46
2.5 Морфокинетика и генетика эмбрионов.....	51
2.6 Этические аспекты.....	56
2.7 Статистическая обработка.....	56
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ</b> .....	59
3.1 Структура и характеристика программ ВРТ в РК.....	59
3.2 Полиморфизмы MTHFR, MTR, MTRR и их влияние на исходы ВРТ.....	64
3.3 Полиморфизмы FSHR и их влияние на эффективность программ.....	67
3.4 Морфология и морфокинетика эмбрионов.....	73
3.5 Влияние возраста на эмбриональное развитие и исходы ВРТ.....	76
3.6 Генетические характеристики эмбрионов.....	78
3.7 Полость матки и её влияние на имплантацию.....	82
3.8 Выбор протокола стимуляции и мониторинга: влияние на результат.....	85
3.9 Влияние образа жизни и веса на результат ВРТ.....	86
<b>АЛГОРИТМ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК СТАРШЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА</b> .....	87

<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>92</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	<b>95</b>
<b>Приложение А...Свидетельство об авторском праве.....</b>	<b>108</b>

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:  
Конституция Республики Казахстан: принята на республиканском референдуме 30 августа 1995 года (с изменениями и дополнениями по состоянию на 02.02.2011 г.).

Кодекс Республики Казахстан. О здоровье народа и системе здравоохранения: принят 7 июля 2020 года, №360-VI ЗРК.

Кодекс Республики Казахстан. О браке (супружестве) и семье: принят 26 декабря 2011 года, №518-IV.

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан. Об утверждении правил и условий проведения вспомогательных репродуктивных методов и технологий: утв. 15 декабря 2020 года, №ҚР ДСМ-272/2020.

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан. Об утверждении правил и условий проведения донорства половых клеток, тканей репродуктивных органов: утв. 8 декабря 2020 года, №ҚР ДСМ-236/2020.

Приказ и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан. О внесении изменений в приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 15 декабря 2020 года №ҚРДСМ-272/2020 "Об утверждении правил и условий проведения вспомогательных репродуктивных методов и технологий": утв. 15 февраля 2023 года, №23.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

**Антимюллеров гормон (АМГ)** – это гормон, отражающий овариальный резерв женщины и используемый для прогнозирования ответа яичников на контролируемую овариальную стимуляцию.

**Анеуплоидный эмбрион** – это эмбрион с нарушенным числом хромосом, ассоциированный с низким имплантационным потенциалом и повышенным риском невынашивания беременности.

**Бесплодие** – это отсутствие наступления беременности у супружеской пары репродуктивного возраста в течение 12 месяцев регулярной половой жизни без применения контрацепции.

**Бластоциста** – это стадия развития эмбриона на 5-6 сутки после оплодотворения, характеризующаяся наличием внутриклеточной массы и трофэктодермы.

**Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ)** – это совокупность медицинских методов лечения бесплодия, при которых этапы зачатия и раннего развития эмбриона осуществляются вне организма женщины или с использованием лабораторных методик.

**Генотипическая предгравидарная подготовка** – это комплекс диагностических и лечебных мероприятий перед программами ВРТ, основанный на выявлении и коррекции генетических особенностей пациентки.

**Имплантация** – это процесс прикрепления и внедрения эмбриона в рецептивный эндометрий с последующим развитием беременности.

**Контролируемая овариальная стимуляция (КОС)** – это этап программ ВРТ, направленный на стимуляцию роста и созревания нескольких фолликулов с использованием экзогенных гонадотропинов.

**Морфологическое качество эмбриона** – это совокупная оценка эмбриона, основанная на степени развития бластоцисты, внутриклеточной массы и трофэктодермы.

**Морфокинетика эмбрионов** – это совокупность временных и морфологических параметров эмбрионального развития, оцениваемых в процессе культивирования, в том числе с использованием систем time-lapse.

**Овариальный резерв** – это функциональный потенциал яичников, определяемый количеством и качеством фолликулов, способных к росту, овуляции и формированию зрелых ооцитов.

**Персонализированный подход в ВРТ** – это стратегия ведения пациенток с бесплодием, основанная на учёте индивидуальных клинических, гормональных, генетических и эмбриологических характеристик.

**Персонализация лечения при экстракорпоральном оплодотворении** – это адаптация протоколов стимуляции, выбора гонадотропинов и тактики ведения программы ВРТ к индивидуальным особенностям пациентки.

**Плохой овариальный ответ** – это недостаточная реакция яичников на контролируемую овариальную стимуляцию, проявляющаяся получением малого числа ооцитов.

**Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А)** – это метод генетического исследования эмбрионов до переноса в полость матки с целью выявления хромосомных нарушений.

**Рецептивность эндометрия** – это функциональное состояние эндометрия, обеспечивающее возможность имплантации эмбриона в определённый период менструального цикла.

**Синдром гиперстимуляции яичников (СГЯ)** – это осложнение контролируемой овариальной стимуляции, связанное с чрезмерным ответом яичников на гонадотропины.

**Старший репродуктивный возраст** – это возраст женщины 35 лет и старше, ассоциированный со снижением фертильности и эффективности программ ВРТ.

**Фолатный цикл** – это совокупность биохимических реакций обмена фолиевой кислоты, обеспечивающих синтез нуклеиновых кислот и процессы клеточного метилирования.

**Хронический эндометрит** – это длительно протекающее воспалительное заболевание эндометрия, сопровождающееся нарушением его рецептивности.

**Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО)** – это метод ВРТ, при котором оплодотворение ооцита происходит вне организма женщины с последующим переносом эмбриона в полость матки.

**Эуплоидный эмбрион** – это эмбрион с нормальным хромосомным набором, обладающий наибольшим имплантационным потенциалом.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

аГнРГ	- агонист гонадотропин-рилизинг гормона
АМГ	- антимюллеров гормон
антГнРГ	- антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона
ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения
ВПП	- врожденный порок развития
ВРТ	- вспомогательные репродуктивные технологии
ВХ	- вспомогательный хетчинг
ГнРГ	- гонадотропин-рилизинг гормон
ГЦРЧ	- городской центр репродукции человека
ДИ	- доверительный интервал
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИКСИ	- инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита
КАРМ	- Казахстанская ассоциация репродуктивной медицины
КАФ	- количество антральных фолликулов
КОС	- контролируемая овариальная стимуляция
ЛГ	- лютеинизирующий гормон
ОШ	- отношение шансов
ПГТ	- преимплантационное генетическое тестирование
ПГС	- преимплантационный генетический скрининг
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПЭ	- перенос эмбрионов в полость матки
РАРЧ	- Российская ассоциация репродукции человека
СО	- стандартное отклонение
ССО	- стимуляция суперовуляции
сЭКО	- стандартная процедура экстракорпорального оплодотворения
ТВП	- трансвагинальная пункция
ФСГ	- фолликулостимулирующий гормон
ФСГР	- рецепторы фолликулостимулирующего гормона
ЧА	- частота аборт
ЧИ	- частота имплантации
ЧНБ	- частота наступления беременности
ЧПБ	- частота пролонгированной беременности
ЧР	- частота родов
ЭКО	- экстракорпоральное оплодотворение
аCGH	- array comparative genomic hybridization (сравнительная геномная гибридизация)
CLBR	- Cumulative live birth rate (кумулятивная частота живорождения)
CHLOE™	- Cultivating Human Life through Optimal Embryos
ESHRE	- European society of human reproduction and embryology
FISH	- Fluorescence in situ hybridization (флюоресцентная гибридизация <i>in situ</i> )
FSHR	- рецепторы фолликулостимулирующего гормона
IVF	- In vitro fertilization (экстракорпоральное оплодотворение)

LBR	- Live birth rate (частота живорождения)
NGS	- next-generation sequencing
SNP-array	- single nucleotide polymorphis
OR	- Odds ratio (отношение шансов)
PCR	- polymerase chain reaction
PPOS	- Progestin priming ovarian stimulation (прогестин-праймированный протокол стимуляции яичников)
RPL	- repeat pregnancy loss (привычная потеря беременности)
RIF	- repeat implantation failure (повторяющаяся неудача имплантации RIF)
SD	- standard deviation
TVP	- Transvaginal puncture (трансвагинальная пункция яичников)

## ВВЕДЕНИЕ

Бесплодие – отсутствие беременности в течение 12 месяцев у пары репродуктивного возраста, не применяющих средства контрацепции при регулярной половой жизни. Частота бесплодия, по данным исследователей колеблется 15-18% и не имеет тенденции к снижению [1]. В Казахстане, по данным литературы, частота бесплодия достигает 20% и так же не снижается. На сегодняшний день применение вспомогательных репродуктивных технологий (далее ВРТ) является наиболее эффективным способом преодоления бесплодия [2].

Несмотря на бурное развитие вспомогательных репродуктивных технологий, появление новых методов, результативность программ колеблется в разных странах, но в целом остается стабильной [3]. Основная причина неудач – старший репродуктивный возраст пациенток, обращающихся за помощью в клиники репродукции. Хорошо известно, что плодовитость начинает снижаться уже к 30 годам, еще быстрее это снижение отмечается в возрасте 37 лет [4-6]. Об этом свидетельствуют многочисленные публикации, отчеты мировых ассоциаций [7, 8], данные Казахстанской ассоциации репродуктивной медицины (КАРМ) [9].

Успешное завершение процедур ВРТ зависит от множества факторов: причин бесплодия, возраста супругов, качества и количества эмбрионов и других [5, р. F1-F5; 10].

Контролируемая овариальная стимуляция (КОС) – ключевой этап ВРТ. Персонализация доз гонадотропинов основывается на изучении генетических маркеров, включая полиморфизм FSHR (rs6166), ассоциированный с чувствительностью к ФСГ [11-16]. Важную роль играют и гены фолатного обмена, влияющие на овариальный ответ, развитие эмбрионов и их качество [17-20].

Имплантация зависит не только от эмбриона, но и от рецептивности эндометрия. Хронический эндометрит выявляется у 10–15% пациенток, а среди женщин с повторными неудачами ЭКО – до 42%. Современные методы диагностики, включая иммуногистохимию повышают выявляемость заболевания, однако лечение остаётся сложным и может требовать многократной терапии [21-24].

Таким образом, у пациенток старшего репродуктивного возраста необходим персонализированный подход к преодолению бесплодия, заключающийся во всесторонней подготовке к программе ВРТ – генотипическая предгравидарная подготовка, обследование и лечение патологии эндометрия, исследование эмбриона и перенос только зуплоидного эмбриона.

**Цель исследования:** повысить эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий путем оптимизации подготовки у пациенток старшего репродуктивного возраста казахской популяции на основе персонализированного подхода.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить структуру и результативность программ ВРТ в Республике Казахстан в зависимости от возраста женщин.

2. Изучить распространенность полиморфизма аллелей генов и генотипов *rs1801133* и *rs1801131* гена *MTHFR*, *rs1805087* гена *MTR*, *rs1805087* гена *MTRR* фолатного обмена и рецепторов ФСГ *rs6165*, *rs6166* гена *FSHR*, влияние носительства неблагоприятных генотипов на результативность программ ВРТ у пациенток старшего репродуктивного возраста  $\geq 35$  лет с бесплодием в казахской популяции.

3. Изучить состояние эндометрия и распространенность патологии эндометрия у пациенток старшего репродуктивного возраста  $\geq 35$  лет.

4. Оценить морфологическую, морфокинетическую и генетическую характеристику эмбрионов, методом аСГН в программах ВРТ у пациенток старшего репродуктивного возраста  $\geq 35$ .

5. Оценить эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток старшего репродуктивного возраста казахской популяции с применением персонализированного подхода.

**Вид исследования:** выполняется в инициативном порядке в рамках докторской PhD диссертации.

### **Методы исследования:**

Проведено когортное двунаправленное исследование.

Клинико-anamnestический (анкетирование, общее клинико-лабораторное обследование).

Ретроспективно проведен анализ медицинских карт 150 пациенток казахской популяции с бесплодием.

Проспективно проведено клинико-anamnestическое обследование проведено у 69 пациенток казахской популяции с бесплодием, прошедших программы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) – 30 пациенток основной группы, 39 пациенток группы сравнения. Проведено стандартное клинико-лабораторного обследования в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Республики Казахстан №172.

Генетические методы: ПЦР real time определение полиморфизма генов *FSHR rs 6165*, *rs 6166*; *MTHFR rs1801133 (C677T)*, *rs1801131 (A1298C)*, *MTR rs1805087 (A2756G)*, *MTRR rs1801394 (A66G)* методом ПЦР. Проведено 150 исследований генов *FSHR rs 6165*, *rs 6166* в ретроспективной группе. 150 исследований генов *MTHFR rs1801133 (C677T)*, *rs1801131 (A1298C)*, *MTR rs1805087 (A2756G)*, *MTRR rs1801394 (A66G)* методом ПЦР.

Проведено 30 исследований генов *MTHFR rs1801133 (C677T)*, *rs1801131 (A1298C)*, *MTR rs1805087 (A2756G)*, *MTRR rs1801394 (A66G)* методом ПЦР в проспективной группе.

Хромосомный микроматричный анализ - аСГН трофэктодермы эмбрионов. Проанализировано 262 результата аСГН трофэктодермы эмбрионов ретроспективно. Проспективно проведено 30 аСГН трофэктодермы эмбрионов.

Гистероскопия, биопсия эндометрия, гистологическое исследование, иммуногистохимическое исследование CD138. Проведен ретроспективный анализ

569 протоколов офисной гистероскопии и результатов гистологического, гистохимического исследования. Проспективно проведено 45 офисных гистероскопий с гистологическим, гистохимическим исследованием эндометрия.

Статистические методы исследования. Применялись следующие методы: методы описательной статистики (среднее значение, стандартное отклонение, медиана, межквартильный размах); критерий  $\chi^2$  Пирсона для анализа качественных признаков; t-критерий Стьюдента для сравнения количественных показателей; корреляционный анализ Пирсона; логистическая регрессия; деревья классификации, отношения шансов (OR) и 95% доверительных интервалов. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

Исследование одобрено Локальной этической комиссией ТОО «Международный Клинический Центр Репродуктологии PERSONA» №2 от 23 ноября 2020 г., Локальной этической комиссией Казахского национального медицинского университета №5 (111) от 28 апреля 2021 г. Все пациенты получили полную информацию о цели исследования и подписывали добровольное информированное согласие.

#### **Объем исследования:**

Ретроспективная часть исследования:

1 этап — аналитический.

Проведен анализ структуры программ ЭКО и переноса эмбрионов в Республике Казахстан:

- по данным Национального регистра ВРТ за 2020–2022 гг.
- по данным клиники PERSONA за 2020–2024 гг.

Общее количество проанализированных циклов — 8611.

2 этап — популяционно-генетический. Определена частота полиморфизмов генов: *FSHR*, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* в казахской популяции.

В исследование включено 150 пациенток, проходивших программы ВРТ.

3 этап — клинико-эмбриологический анализ. Проведено исследование:

- 569 гистероскопий у женщин с бесплодием
- 1082 переносов эмбрионов:
  - 387 у женщин  $\geq 35$  лет
  - 695 у женщин  $< 35$  лет

Также проведено исследование 431 переноса единственного эмбриона с анализом морфокинетики.

Проспективная часть исследования:

4 этап — проспективное когортное исследование.

Оценена эффективность персонифицированного алгоритма подготовки с формированием основной группы (30 пациенток) и контрольной группы (39 пациенток).

Все пациенты были отобраны согласно следующим критериям.

Критерии включения в ретроспективное исследование:

- Принадлежность к казахской национальности по дедушкам и бабушкам по материнской и отцовской линии по данным опроса, неудачные программы ВРТ в анамнезе.

- Критерии исключения:

- Нарушения сперматогенеза, эндометриоз по данным УЗИ, носительство сбалансированных хромосомных аномалий по данным кариотипирования обоих супругов, аномалии развития и патологии внутренних половых органов, препятствующие вынашиванию беременности, донорские яйцеклетки, суррогатное материнство.

Для проверки работы алгоритма персонифицированного ведения пациенток старшего репродуктивного возраста казахской популяции было проведено когортное проспективное исследование с января 2024 г по декабрь 2024 г. В основную группу было включено 30 пациенток, прошедшие персонифицированную предгравидарную подготовку, в контрольную группу – 39 пациенток, прошедших стандартное обследование и подготовку перед программой ЭКО и ПЭ.

Критерии включения в основную группу:

- принадлежность к казахской популяции
- персонифицированная предгравидарная подготовка
- возраст  $\geq 35$  лет

Критерии включения в контрольную группу:

- принадлежность к казахской популяции
- стандартная предгравидарная подготовка
- возраст  $\geq 35$  лет
- свежий перенос эмбриона 5 суток

Критерии исключения из исследования:

- возраст  $< 35$  лет
- принадлежность к не казахской популяции
- тяжелые нарушения сперматогенеза у мужчины
- врожденные аномалии половых органов, препятствующие вынашиванию беременности
- миома матки, эндометриоз, препятствующие вынашиванию беременности
- изменения в кариотипе одного/обоих супругов
- донорские ооциты
- суррогатное материнство.

**Объекты исследования:** женщина казахской национальности с бесплодием.

**Единицы наблюдения:** программа ЭКО и ПЭ у пациенток казахской популяции.

**Предмет исследования:** эмбрион женщины старшего репродуктивного возраста ( $\geq 35$  лет).

**Место проведения:** ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA», г. Алматы.

**Научная новизна:**

Впервые выявлены:

– распространение и частота аллелей и генотипов генов ФСГ *rs6165* и *rs6166* в казахской популяции;

– распространение и частота аллелей и генотипов генов *MTHFR rs1801133 (C677T)*, *rs1801131 (A1298C)*, *MTR rs1805087 (A2756G)*, *MTRR rs1801394 (A66G)* у женщин казахской популяции с бесплодием;

– установлены ассоциации генетических и клинических факторов;

– разработан персонафицированный подход подготовки пациенток старшего репродуктивного возраста к программе ВРТ.

**Практическая значимость:** Применение персонализированного подхода в подготовке к ВРТ значительно сокращает время достижения беременности, увеличивает частоту живорождения и снижает потери беременности.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Носительство неблагоприятных полиморфизмов аллелей генов и генотипов *rs1801133* и *rs1801131* гена *MTHFR*, *rs1805087* гена *MTR*, *rs1801394* гена *MTRR* в казахской популяции женщин с бесплодием достигает 90%. Носительство неблагоприятных полиморфизмов аллелей генов и генотипов фолатного обмена ассоциировано с такими отрицательными исходами программ ВРТ как: большее количество программ ВРТ, отягощенный акушерский анамнез по потерям беременности, выраженный хронический эндометрит, меньшее количество полученных яйцеклеток, количество зрелых яйцеклеток, низкая частота оплодотворения, меньшим количеством бластоцист, большая частота анеуплоидии эмбрионов. Обследование на носительство полиморфизмов генов фолатного обмена и генотипическая предгравидарная подготовка клинически обосновано.

2. Частота носительства полиморфизма аллелей генов и генотипов *rs6165*, *rs6166* гена *FSHR* в казахской популяции не отличается от мировых популяций. Носительство минорного аллеля не оказывает влияния на результаты программ ВРТ.

3. Старший репродуктивный возраст  $\geq 35$  лет женщины ассоциирован с выраженным хроническим эндометритом. Старший репродуктивный возраст пациенток с бесплодием является показанием к исследованию полости матки путем гистероскопии с биопсией эндометрия и ИГХ на CD138

4. Возраст женщины негативно влияет на морфологическую, морфокинетическую и генетическую характеристику эмбрионов. С повышением возраста женщины увеличивается частота анеуплоидии эмбрионов. Оценка морфокинетики эмбрионов ИИ и ПГТ-А и перенос эуплоидного позволяет повысить частоту наступления беременности и родов и снизить потери беременности.

5. Алгоритм персонафицированной предгравидарной подготовки к программе ВРТ значительно сокращает время достижения беременности, увеличивает частоту живорождения и снижает потери беременности.

**Апробация работы** Основные результаты исследований представлены на международных и республиканских конференциях:

– международном научно-образовательном конгрессе, посвященного 50-летию Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии (14-16 мая 2025);

– международном конгрессе КАРМ «Возраст и репродукция: инновации в репродуктивной медицине» (10 июня 2025).

**Публикации** По материалам исследования опубликовано 7 работ, из них 2 статьи в журналах дальнего зарубежья, индексируемых информационными ресурсами Web of Knowledge (ThomsonReuters, США) и Scopus (Elsevier, Нидерланды); 5 статей в журнале Республики Казахстан, входящих в список рекомендованных ККСОН МОН РК; 2 практических руководства; 1 клинический протокол МЗ РК.

**Количество опубликованных статей по квартилям:**

Состояние полости матки у пациенток старшего репродуктивного возраста // *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. – 2025. – №19(4). – С. 506-513 (Q3% (35%) – 1)

Antibiotics and Uterine Flushing versus Antibiotics Alone for Chronic Endometritis with Thin Endometrium in Assisted. Reproductive Technology: A Single-Center Retrospective Cohort Study // *International Journal of Fertility and Sterility*. – 2025. – №19(2). – P. 186-192 (Q2% (60%) – 1).

*Количество опубликованных статей КОКШВО – 5:*

Исходы программ ВРТ в зависимости от статуса генов фолатного обмена в казахской популяции // *Репродуктивная медицина*. – 2024. – №1. – С. 17-26.

Искусственный интеллект – ключ к развитию эмбриологической лаборатории // *Репродуктивная медицина*. – 2024. – №3. – С. 42-49.

Современные методы ведения пациенток с бедным овариальным ответом на контролируемую овариальную стимуляцию: обзор литературы // *Репродуктивная медицина*. – 2024. – №4.

Эффективность персонифицированного алгоритма подготовки пациенток старшего репродуктивного возраста к программе ЭКО: проспективное когортное исследование // *Репродуктивная медицина*. – 2025. – №2. – С. 92-101.

Сравнение эффективности и безопасности препаратов ЧМГ и r-ФСГ+ЛГ, получающих свою биологическую активность ЛГ из разных источников: когортное одноцентровое исследование // *Репродуктивная медицина*. – 2025. – №2. – С. 107-111.

**Личный вклад автора**

Разработка цели и задач научного исследования, проведение набора данных и обследования пациентов, непосредственный анализ амбулаторных карт, статистическая обработка результатов исследования, формулирование выводов и рекомендаций.

**Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 107 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, трех разделов основной части, заключения, списка использованных источников. Работа иллюстрирована 29 таблицами и 34 рисунками. Список использованной литературы включает 187 источника.

# **1 ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД ВРТ У ЖЕНЩИН СТАРШЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

## **1.1 Вспомогательные репродуктивные технологии: история, современное состояние в мире и РК**

Во всем мире бесплодие является актуальной проблемой, в том числе в Казахстане. Частота бесплодия не имеет тенденции к снижению на протяжении последних пяти десятилетий [8, p. hoz038; 9, p. 9-12; 27].

Истоки вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) восходят к концу XVIII века. В 1795 году J. Hunter впервые осуществил искусственное оплодотворение, введя сперму во влагалище женщины, чей супруг страдал гипоспадией. Этот эксперимент завершился успешной беременностью [28].

На протяжении XIX и XX веков научные исследования в области репродукции активно продолжались. Учёные проводили многочисленные эксперименты с гаметам человека и животных. Впервые беременность у человека с использованием методов ВРТ была достигнута лишь в 1970-х годах, когда Роберт Эдвардс и Патрик Степто добились рождения первого ребёнка, зачатого с применением экстракорпорального оплодотворения. 25 июля 1978 года появилась на свет Луиза Браун – первый в мире «ребёнок из пробирки» [28, с. 17-21; 29].

Сегодня ВРТ значительно расширили возможности лечения бесплодия как у женщин, так и у мужчин. Методы, включающие ЭКО, ИКСИ, биопсию тканей яичка и его придатка, донорство половых клеток, суррогатное материнство, социальное замораживание яйцеклеток, сохранение фертильности у пациентов с онкологическими заболеваниями, криоконсервацию яичниковой ткани с последующей аутотрансплантацией, а также преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) эмбрионов, получили широкое распространение по всему миру. На уровне научных исследований также были проведены опыты по редактированию генома человеческих эмбрионов [2, p. 177-187; 21, p. 21-27; 29, p. 185-323; 30].

Развитие ВРТ в Казахстане также имеет богатую историю. В 1987 году в Алма-Ате начал работу Центр репродукции человека (ГЦРЧ) – первое специализированное медицинское учреждение, ориентированное на решение проблем бесплодия. Центр занимался вопросами планирования семьи, проведением пренатальных скринингов и внедрением новых подходов в лечении женского и мужского бесплодия. Внутриматочная инсеминация донорской спермой впервые была проведена в 1988 году. А 5 октября 1995 года в ГЦРЧ была запущена первая в стране лаборатория ЭКО, результатом работы которой стало рождение первого в Казахстане ребёнка, зачатого с помощью экстракорпорального оплодотворения – это событие произошло 31 июля 1996 года [9, p. 9-12; 28, с. 17-21].

В последующие годы в стране наблюдалось стремительное развитие репродуктивной медицины, сопровождавшееся внедрением передовых мировых технологий. Это также способствовало росту числа медицинских учреждений,

оказывающих помощь бесплодным парам с использованием ВРТ [9, р. 9-12]. Динамика увеличения количества центров ЭКО представлена на рисунке 1.

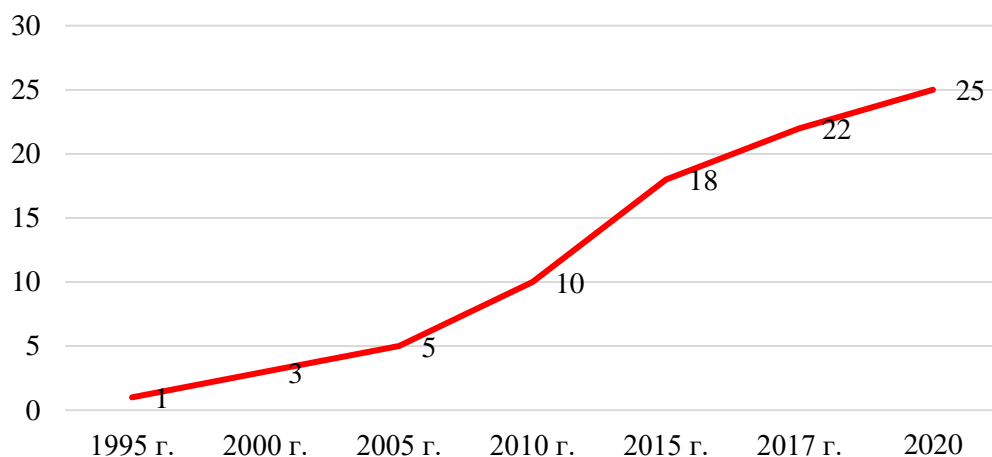


Рисунок 1 – Данные КАРМ, 2022 г, число центров ЭКО в Казахстане

Развитие вспомогательных репродуктивных технологий в Казахстане сопровождалось активным формированием и совершенствованием нормативно-правовой базы в области репродуктивной медицины. Существенным шагом стало принятие в 2009 году Кодекса Республики Казахстан «О здоровье народа и системе здравоохранения», в котором были закреплены ключевые понятия, а также определены допустимые методы применения ВРТ [31]. В дальнейшем, в соответствии с приказами Министерства здравоохранения Республики Казахстан №627 и 162, были детализированы основные регламентирующие положения, касающиеся организации и проведения программ ВРТ [32].

На фоне нормативных улучшений наблюдается устойчивая тенденция к росту числа специализированных центров экстракорпорального оплодотворения и увеличению общего объема проводимых программ ВРТ на территории страны. За последние 13 лет число коммерческих циклов ВРТ возросло более чем в три раза, тогда как количество процедур, финансируемых за счёт государственных средств, увеличилось в 70 раз [9, р. 9-12; 25, с. 8-15], рисунок 2.



Рисунок 2 – Увеличение числа циклов ВРТ в Казахстане по данным КАРМ 2024 год

Примечание – Составлено по источнику [25, с. 11]

Количество детей, появившихся на свет в результате использования вспомогательных репродуктивных технологий, в Казахстане неуклонно увеличивается. Так, за восемь лет реализации государственной программы ВРТ на свет появилось более 1840 детей [9, р. 9-12] (рисунок 3).

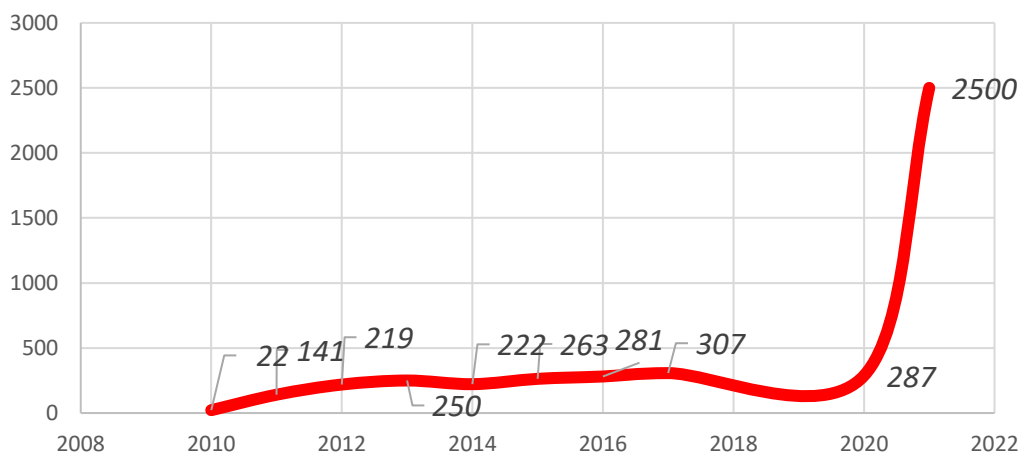


Рисунок 3 – Количество родов в результате ЭКО по госпрограмме, данные КАРМ, реестр ВРТ РК

Примечание – Составлено по источнику [9, р. 10]

С 2010 года процедуры экстракорпорального оплодотворения включены в перечень услуг, предоставляемых в рамках Гарантированного объема бесплатной медицинской помощи (ГОБМП), и реализуются в рамках национальных программ «Саламатты Қазақстан» и «Денсаулық». Благодаря этому количество государственных квот на проведение ЭКО ежегодно возрастает. В течение десяти лет в рамках этих инициатив родилось 1998 детей (рисунок 3) [4, р. 121-139]. В 2021 году по поручению Президента Республики Казахстан было принято решение об увеличении числа квот на проведение ЭКО до 7000 в год. В тот же период стартовала государственная программа «Аңсаған сәби», в рамках которой только за 2021 год родилось 2500 детей, зачатых с применением ВРТ.

Несмотря на прогресс медицинской науки и внедрение инновационных методов лечения бесплодия, распространённость данного состояния в мире остаётся на стабильно высоком уровне [27, р. e1001356]. Оценить точную частоту бесплодия в глобальном масштабе затруднительно из-за разнородности используемых критериев, различий в методологии демографических, эпидемиологических и масштабных популяционных исследований [33]. Однако, согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и другим источникам, от 8 до 14% супружеских пар репродуктивного возраста сталкиваются с проблемами зачатия. В 2010 году ВОЗ сообщала о 48,5 миллионах пар, страдающих бесплодием [34]. Прогнозируется, что это число может возрасти в 2,5 раза, учитывая сокращение рекомендованного срока

постановки диагноза бесплодия с 5 до 2 лет. По последним оценкам, общее количество бесплодных людей в мире составляет от 72,4 до 80 миллионов (рисунок 4) [33, с. 4-400; 34].

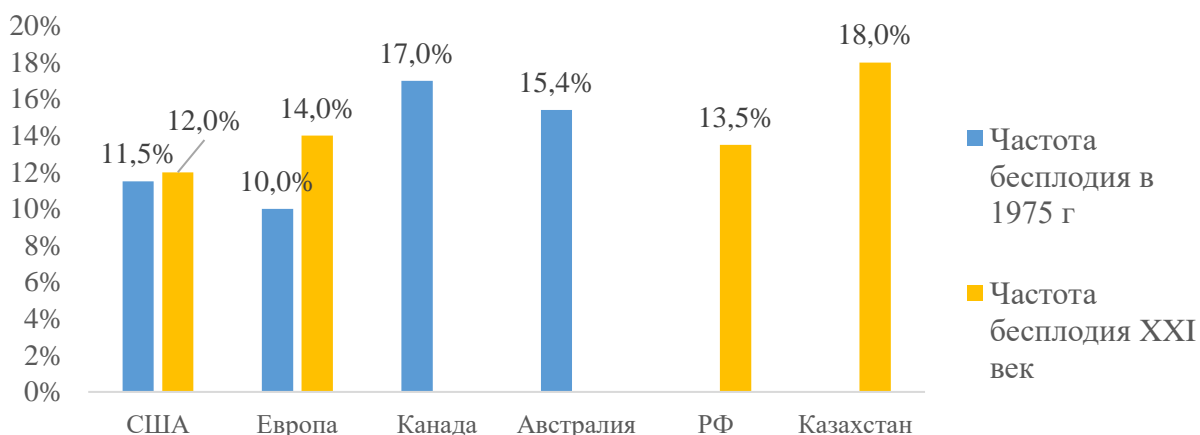


Рисунок 4 – Частота бесплодия в мире по данным литературы

Согласно данным ВОЗ, при распространённости бесплодия на уровне 15% и выше, его влияние на демографическую ситуацию становится более значимым, чем совокупное воздействие невынашивания беременности и перинатальной смертности [2, р. 177-187; 30, р. с. 23-25].

Таким образом, несмотря на совершенствование методов диагностики и лечения, включая активное внедрение вспомогательных репродуктивных технологий, уровень бесплодия как в мире, так и в Республике Казахстан остаётся стабильно высоким. Вероятными причинами этого являются рост общего числа супружеских пар в связи с увеличением населения планеты, улучшение качества диагностики и регистрации случаев бесплодия, а также тенденция к позднему обращению за специализированной медицинской помощью. Особенно следует отметить увеличение среднего возраста женщин при рождении первого ребёнка, что также существенно влияет на репродуктивные показатели.

#### *Эффективность ЭКО, роль возраста женщины в эффективности ЭКО*

Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения, к репродуктивному возрасту относят период жизни женщины с 15 до 49 лет. Однако репродуктивный потенциал в пределах этого возрастного диапазона существенно варьирует в зависимости от конкретной возрастной группы. Принято выделять следующие этапы: ранний репродуктивный возраст (15–19 лет), пик репродуктивной активности (20–34 года), период снижения фертильности (35–44 года) и поздняя репродуктивная фаза (45–49 лет) [5, р. F1-F5].

Современная репродуктивная медицина, в частности вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), демонстрирует стремительное развитие, с регулярным внедрением новых методик, направленных на повышение

эффективности лечения бесплодия. Тем не менее, несмотря на прогресс в данной области, общая результативность программ ВРТ остаётся на стабильно одном уровне, без выраженной положительной динамики. На рисунке 5 представлена статистика частоты наступления беременности в ходе ВРТ-программ, которая практически не меняется в различных странах мира [35, 36].

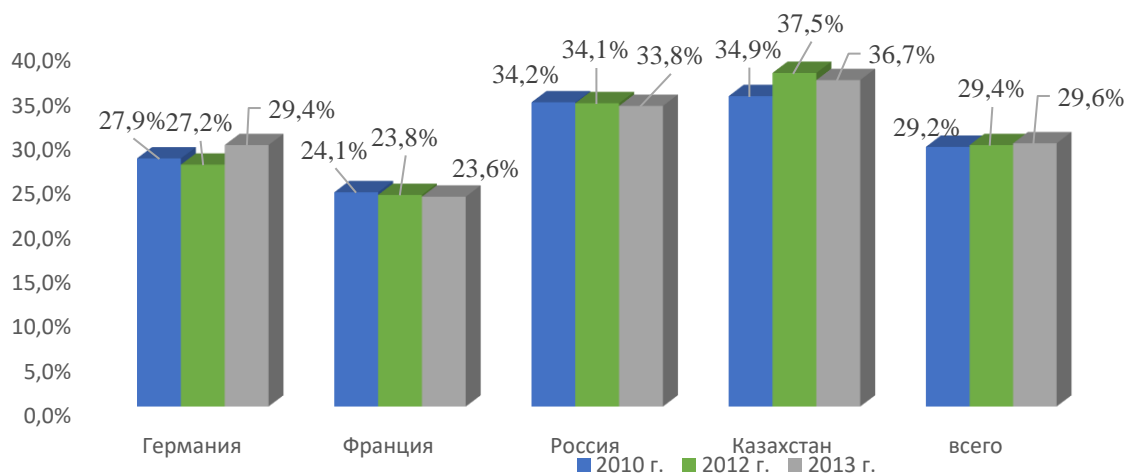


Рисунок 5 – Динамика результативности ЭКО в мире по данным ESHRE

Одним из ключевых факторов, негативно влияющих на исход ВРТ, является возраст пациенток. Все чаще за помощью обращаются женщины в старшем репродуктивном возрасте, что снижает вероятность успешного исхода. Ситуация усугубляется тенденцией к более позднему планированию материнства, что стало возможным благодаря широкому доступу к современным средствам контрацепции и существованию ВРТ [37, 38].

Доля женщин старше 40 лет, использующих вспомогательные репродуктивные технологии, год от года растет.

По данным отчетов Европейской ассоциации репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) 15,7% женщин старше 40 лет проходили экстракорпоральное оплодотворение в 2009 г., в 2012 г. – 17,2%, в 2015 г. – 18,4% [8, р. hoz038; 39, 40]. Исследования Norbert Gleicher и коллег также фиксируют устойчивую тенденцию к повышению возраста женщин, обращающихся по поводу бесплодия в развитых странах. При этом авторы отмечают практически нулевые показатели частоты родов у женщин после 42 лет и полное отсутствие клинически подтверждённых беременностей в возрастной категории 46–53 года [5, р. F1-F5].

Ключевыми факторами, определяющими успешность программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), считают: возраст женщины, продолжительность бесплодия, этиология бесплодия, исходный уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), а также количество полученных ооцитов. Возраст пациентки, базальный уровень ФСГ и длительность бесплодного периода оказывают отрицательное влияние на вероятность

наступления беременности и рождения ребёнка при применении вспомогательных репродуктивных технологий. При этом уровень ФСГ и количество ооцитов тесно коррелируют с возрастом женщины, что делает возраст одним из наиболее значимых предикторов успеха ВРТ [7, p. 305-308; 10, p. 281-128-2; 41]. Что так же подтверждается данными, приводимыми в отчетах ESHRE. По данным официального отчета ESHRE за 2015 г., 45,8% женщин были в возрасте до 34 лет, частота наступления беременности составила 29,6%, частота родов – 23,7%. Женщины в возрасте 35-39 лет составили 35,8%, беременность наступила у 25,1%, частота живорождения составила 18,6%. В возрасте 40 лет и старше было 18,4% пациенток, при этом у 13,4% беременность наступила, и только 8,5% родили живого ребенка. По данным нашей Республики женщины в возрасте до 34 лет составили 54,7%, частота наступления беременности – 42,5%, частота родов – 30,2%; пациентки 35-39 лет составили 34,2%, беременность у них наступила в 35,2% случаев, роды – в 19,7%; женщины 40 лет и старше составили 11,1%, частота наступления беременности составила 20,5% и только у 12,9% произошли роды [36, p. 1-16]. Схожие данные отражены в ежегодном отчете Российской Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ) за 2019 год, включающем анализ 151110 циклов ВРТ [42].

На основании изложенных данных можно заключить, что проведение программ ЭКО у женщин старшего репродуктивного возраста связано с повышенным риском получения меньшего количества ооцитов и эмбрионов, отсутствием пригодных для переноса эмбрионов, сниженной частотой имплантации и высоким уровнем невынашивания беременности. Для повышения вероятности наступления беременности у женщин старше 35 лет требуется большее количество эмбрионов, что зачастую означает необходимость повторных программ ЭКО и нескольких переносов в полость матки. Это, в свою очередь, ведет к существенным финансовым затратам, не увеличивая при этом вероятность успешной беременности и не снижая риск рождения ребёнка с хромосомными аномалиями. С целью уменьшения финансового бремени и снижения риска хромосомных патологий возможно применение донорских ооцитов, однако большинство пациенток предпочитают иметь генетически родного ребёнка.

Таким образом, возраст остаётся ключевым фактором, влияющим на эффективность ВРТ и вероятность рождения здорового ребёнка у женщин старшего репродуктивного возраста. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования и разработка новых подходов, позволяющих сократить сроки достижения беременности и повысить эффективность лечения.

## **1.2 Персонализация в ВРТ: генотипическая предгравидарная подготовка**

Персонализация – тренд медицины последних десятилетий. Персонализация применяется теперь во всех областях медицины, не исключение и вспомогательные репродуктивные технологии [43]. Во вспомогательных репродуктивных технологиях используется пациентоориентированный подход, то есть пациент помещается в центр внимания при лечении бесплодия. Лечение

бесплодия, в нашем случае, программа экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов, состоит из нескольких этапов, в которых и применяется персонализированный подход, рисунок 6.



Рисунок 6 – Пациентоориентированный подход ВРТ

Персонализированный подход обусловлен генетической неоднородностью популяции.

Основная цель индивидуализации лечения при ЭКО - предложить каждой женщине лучшее лечение, адаптированное к ее уникальным характеристикам, тем самым увеличивая шансы на беременность и роды, минимизируя риски, возникающие в результате процедуры ВРТ. Персонализация лечения при ЭКО должна основываться на прогнозировании реакции яичников для каждой пациентки. Отправной точкой является определение вероятности того, что у женщины будет нормальный, плохой или повышенный ответ, и выбор идеального протокола лечения с учетом этого прогноза [4, p. 124-139].

Если персонализация основана на точном прогнозе ответа яичников, то прогнозирование ответа яичников должно основываться на наиболее чувствительных маркерах овариального резерва.

В последние десятилетия было проведено большое количество исследований возможности измерения овариального резерва с помощью маркеров состояния яичников [4, p. 124-139: 11, p. 12693; 44]. В репродуктивной медицине это ведущая область исследований, поскольку маркеры овариального резерва имеют важное диагностическое и прогностическое значение. Хорошо известно, что низкий овариальный резерв может быть важной причиной бесплодия. Кроме того, знание овариального резерва женщины позволяет клиницистам прогнозировать индивидуальную реакцию на контролируруемую стимуляцию яичников в циклах ЭКО: если у пациентки, например, низкий овариальный резерв, она, вероятно, получит плохой ответ яичников после КОС

[44, p. 281-1-281-7]. Однако среди пациентов с плохой реакцией на прогноз могут влиять другие параметры, такие как возраст пациента и исход предыдущих циклов ЭКО.

По этой причине консенсус Европейского общества репродукции человека и эмбриологии постановил, что ответ может быть определен как плохой (POR – poor ovarian respond), если присутствуют по крайней мере два из следующих трех критериев:

1. Старший репродуктивный возраст женщины.
2. Предыдущий бедный ответ яичников.
3. Аномальный тест на овариальный резерв или, при отсутствии вышеуказанных критериев, два предыдущих бедных овариальных ответа после максимальной стимуляции [45].

В литературе опубликовано множество исследований результатов ЭКО у пациентов с плохой реакцией, определенных в соответствии с Болонскими критериями. Все они подтверждают низкую частоту живорождения у этих пациентов [45, p. 1-9].

Позже была предложена новая классификация – POSEIDON - Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number [44, p. 281-1-281-7]. По критериям POSEIDON пациенты делятся на 4 группы в зависимости от возраста, уровня АМГ и количества антральных фолликулов (КАФ).

Группы пациенток по возрасту и параметрам овариального резерва:

Группа 1: Пациентки моложе 35 лет с адекватными параметрами овариального резерва (КАФ  $\geq 5$  или АМН  $\geq 1,2$  нг/мл), у которых после контролируемой овариальной стимуляции (КОС) отмечен:

Подгруппа 1a: неожиданно плохой ответ – получено менее 4 ооцитов,

Подгруппа 1b: субоптимальный ответ – получено 4–9 ооцитов.

Группа 2: Пациентки 35 лет и старше с адекватными параметрами овариального резерва (КАФ  $> 5$  или АМН  $\geq 1,2$  нг/мл), у которых после КОС наблюдался:

Подгруппа 2a: неожиданно слабый ответ – получено менее 4 ооцитов,

Подгруппа 2b: недостаточный ответ – получено 4–9 ооцитов.

Группа 3: Пациентки моложе 35 лет с плохими параметрами овариального резерва (КАФ  $< 5$  или АМН  $< 1,2$  нг/мл).

Группа 4: Пациентки 35 лет и старше с плохими параметрами овариального резерва (КАФ  $< 5$  или АМН  $< 1,2$  нг/мл), как представлено на рисунке 7, [46].

Стратификация пациентов на группы призвана помочь клиницисту в прогнозировании результата программы.

Предлагаемая по POSEIDON стратификация может служить руководством для персонализации протоколов лечения, включая:

1. Использование различных схем аналогов ГнРГ.
2. Выявление полиморфизмов генов гонадотропинов и их рецепторов.
3. Подбор стартовой дозы ФСГ.
4. Персонализация доз и видов гонадотропинов (например, монотерапия ФСГ или препараты, содержащие ЛГ).

5. Оценка подходящих схем, включая накопление ооцитов/эмбрионов для достижения максимальных результатов [47].

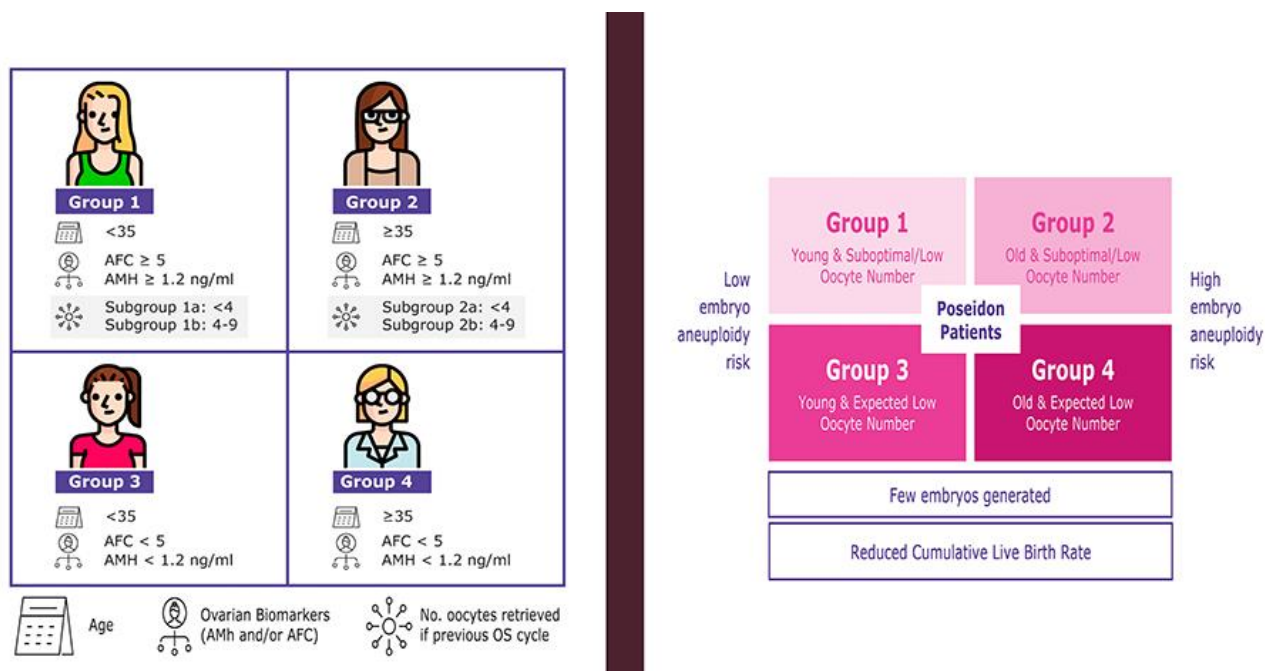


Рисунок 7 – Критерии POSEIDON

Примечание – Адаптировано из источника [46, p. 3]

Таким образом, женщины, входящие в 2 и 4 группы, относятся к группе с неблагоприятным прогнозом для исхода программы, так как имеют сниженный резерв яичников и старший репродуктивный возраст, что значительно снижает их шансы на получение эуплоидного эмбриона [48].

#### *Роль обмена фолатов в репродукции человека*

Производные фолиевой кислоты являются коферментами ферментов, которые контролируют сложный метаболический процесс – фолатный цикл. Всасываясь в тонком кишечнике в виде фолат-моноголутамата, последний восстанавливается до биологически активного тетрагидрофолата.

Тетрагидрофолат выступает в роли кофермента, принимающего участие в ряде внутриклеточных биохимических процессов. Среди них особое значение имеют синтез пуриновых оснований, тимина (пиримидиновое основание), а также образование метионина путём реметилирования гомоцистеина. Последняя реакция катализируется ферментом метионин-синтазой (MTR), активность которого зависит от присутствия метилкобаламина – активной формы витамина B<sub>12</sub>. Для восстановления функционирования MTR требуется метилирование, осуществляемое при участии фермента метионин-синтазы-редуктазы (MTRR).

Ключевую роль в обеспечении реметилирования гомоцистеина играет фермент 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), обеспечивающий превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат – соединение, выступающее донором метильной группы в реакции синтеза метионина [49], (рисунок 8) [50]. Дефицит фолиевой кислоты приводит к

повышению уровня гомоцистеина и нарушению метилирования ДНК. В современной литературе накоплены многочисленные данные о влиянии гипергомоцистеинемии на организм человека: от повышения риска сердечно-сосудистых заболеваний и атеросклероза [51] до осложнений беременности, включая невынашивание [52].

Фолиевая кислота также необходима для правильного эмбрионального развития. Ее дефицит может вызвать врожденные пороки, среди которых наиболее серьезными являются дефекты нервной трубки (ДНТ). В Казахстане средняя частота ДНТ плода составляет около 0,6%, при этом ДНТ занимают 11% в структуре перинатальной смертности [53].

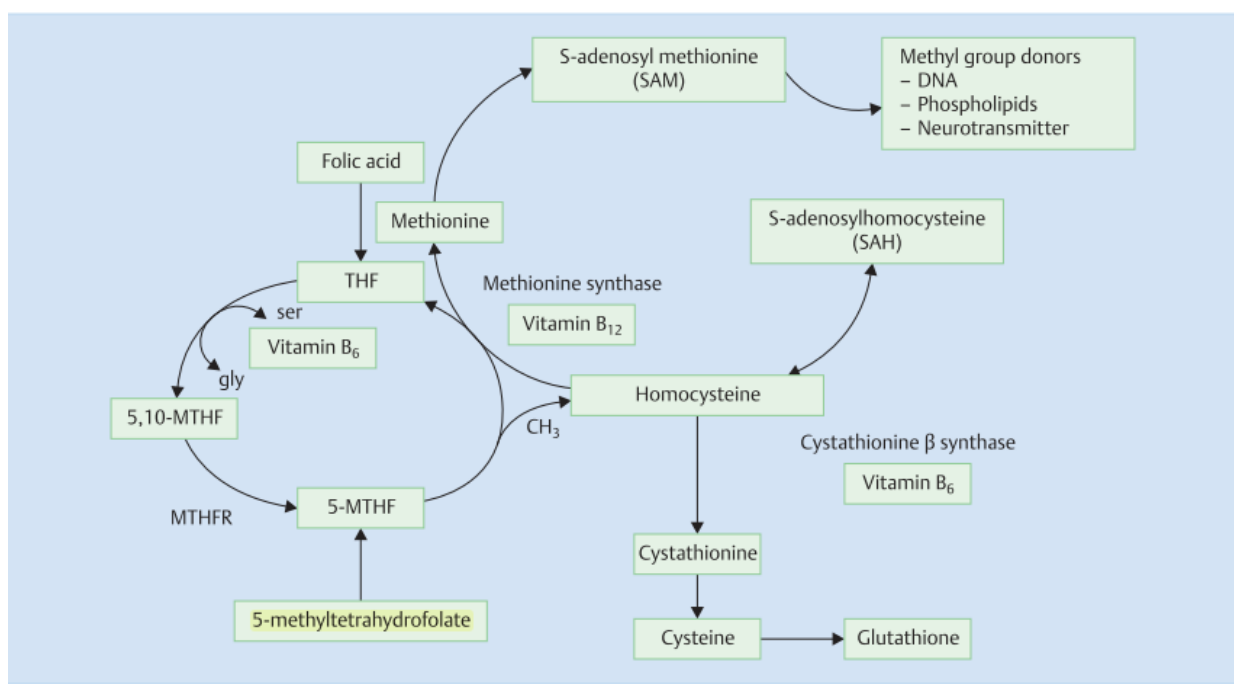


Рисунок 8 – Фолатный цикл

Примечание – Составлено по источнику [50, p. 847]

### *Полиморфизмы генов фолатного обмена*

Дефекты выработки ферментов фолатного цикла, которые катализируют превращение фолиевой кислоты в её активную форму, необходимую для реметилирования гомоцистеина в метионин, могут иметь и генетическую природу [49, p. 113-119].

Ген *MTHFR* локализован на коротком плече хромосомы 1 (1p36.3) и состоит из 11 экзонов. Наиболее изученной является мутация *C677T* в гене *MTHFR*, при которой происходит замена цитозина на тимин в позиции 677. Эта мутация приводит к замене аминокислоты аланина на валин (*p.Ala222Val*) в каталитическом домене фермента, что вызывает снижение его активности – примерно на 70% у гомозигот по полиморфному аллелю и на 35% у гетерозигот.

Гомозиготность по аллелю *C677T* связана с существенным повышением уровня гомоцистеина в крови, особенно при низком содержании фолатов в

плазме. Снижение активности МТНFR является одной из ключевых причин накопления гомоцистеина в организме [48, р. 3-9].

Ген *MTRR* расположен на хромосоме 5 в положении р15.2–15. Он имеет 15 экзонов и 14 интронов. Ген *MTR* расположен на хромосоме 1 в позиции q43. Он имеет 33 экзона и 32 интрона. Существует общий полиморфизм (*A2756G*; *rs1805087*) в экзоне 26 в положении 2756 гена *MTR*, который приводит к переходу аденинового нуклеотида в гуаниновый [54].

Опубликованы исследования, в которых выявлена ассоциация генотипа *MTHFR 677T/T* с риском неопластических процессов [55]. Также значительный интерес исследователей привлекает связь неблагоприятных аллелей генов фолатного обмена и нарушения репродуктивной функции: бесплодия [50, р. 845-850] эффективности вспомогательных репродуктивных технологий [56], невынашивания беременности [52, р. 6652231], формирования пороков развития плода [53, с. 3-154].

Нарушение репродуктивной функции может быть обусловлено как токсическим воздействием повышенного уровня гомоцистеина, так и нарушениями процессов метилирования ДНК. Гипергомоцистеинемия приводит к системному нарушению функции эндотелия, что находит свое отражение в изменении процессов имплантации и плацентации, приводящих к прекращению развития беременности и другой акушерской патологии [51, р. 1109445; 57, 58].

На исход беременности может влиять не только носительство неблагоприятных аллелей генов фолатного цикла матерью, но и генетический статус эмбриона. Согласно результатам исследований abortивного материала, наличие у эмбриона аллеля *C677T* гена *MTHFR* в гомо- или гетерозиготном состоянии ассоциировано с 14-кратным увеличением риска самопроизвольного прерывания беременности [59], так как для нормального развития эмбриона необходима адекватная активность МТНFR [20, р. 1807-1813].

Вклад носительства неблагоприятных аллелей генов фолатного обмена в невынашивание беременности до сих пор остается дискуссионным. Так, отечественными авторами было проведено исследование частот аллелей в генах *MTHFR*, *MTRR* и *MTR* у пациенток казахской популяции с невынашиванием и здоровых женщин, доля нормальных аллелей в генах *MTHFR*, *MTRR* и *MTR* была в двух исследуемых группах сопоставимой, статистически значимой разницы в носительстве неблагоприятных полиморфизмов не выявлено [60].

Множество исследований посвящено изучению влияния гомо- и гетерозиготных состояний аллелей гена *MTHFR C677T* у женщин с бесплодием, а также их связи с результатами программ ВРТ. Однако полученные данные варьируют в зависимости от этнической принадлежности обследованных групп. Так, в исследовании, проведенном на популяции бразильских женщин – носительниц полиморфизмов *C677T* и *A1298C* гена *MTHFR* – статистически значимые различия были выявлены только в количестве полученных и зрелых ооцитов. При этом частота оплодотворения и наступления беременности в группах достоверно не различалась [61]. В китайской популяции исследователи выявили у носителей генотипа *MTHFR 677TT* статистически значимую более низкую частоту эмбрионов хорошего качества, низкую кумулятивную частоту

живорождения [62], более высокий базальный уровень ФСГ, более высокие дозы гонадотропинов в КОС и меньшее количество ооцитов и зрелых ооцитов [18, р. 982-989]. Однако в других исследованиях и мета-анализе статистически значимых различий в исходах ВРТ у носителей мутаций генов *MTHFR* (C677T), *MTHFR* (A1298C) и контрольной группы выявлено не было [56, р. 1093-1097; 63, 64].

Мутации в генах *MTRR* и *MTR* приводят к мужскому бесплодию [65]. Публикаций, посвященных влиянию носительства неблагоприятных аллелей генов *MTRR* и *MTR* на женское бесплодие и исходы ВРТ найдено не было. По аналогии с нарушением мужской фертильности можно предположить, что носительство неблагоприятных аллелей генов *MTRR* и *MTR* оказывает влияние и на репродуктивную систему женщины. Некоторые исследователи считают, что исследование этих SNP должно быть обязательным перед программой ВРТ [66].

Таким образом, недостаточно изучения полиморфизма только метилентетрогидрофолатредуктазы (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C), важно комплексное генотипирование по всем показателям фолатного цикла и их составляющих. Диагностика и своевременная коррекция изменений с персонифицированным подходом на этапах подготовки к программе ВРТ и беременности позволит повысить эффективность ЭКО и снизить риск осложненного течения беременности [67], так как назначение генотипических доз фолатов повышает качество яйцеклеток и улучшает исходы ВРТ [68, 69].

### **1.3 Овариальная стимуляция: выбор протокола, гормональный и УЗИ-мониторинг**

Экстракорпоральное оплодотворение представляет собой многоэтапный процесс, эффективность которого остается ограниченной, несмотря на постоянное совершенствование лабораторных технологий. Это объясняется влиянием индивидуальных факторов, в частности вариабельностью ответа яичников на контролируемую овариальную стимуляцию. Как количественные, так и качественные характеристики ооцитов оказывают существенное влияние на исход ЭКО: увеличение числа эмбрионов высокого морфологического качества расширяет возможности для выбора одного наиболее перспективного эмбриона с целью снижения риска многоплодной беременности [70]. Индивидуализация подхода на всех этапах ЭКО, начиная с персонализированной стимуляции яичников, способна улучшить прогноз наступления беременности и живорождения. Любая неадекватная реакция яичников на КОС – будь то бедный ответ, приводящий к отмене цикла, или гиперответ с риском развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) – снижает вероятность успешного исхода [71]. Таким образом, индивидуальная непредсказуемость овариального ответа остается одной из ключевых проблем безопасности и результативности ЭКО.

Среди клинически значимых маркеров, позволяющих предполагать ожидаемое количество ооцитов, традиционно рассматриваются возраст пациентки, уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), эстрадиола, ингибина В, антимюллерова гормона (АМГ) в сыворотке крови, а также количество антральных фолликулов (АФК). Однако, ни один из этих маркеров не

обладает высокой прогностической ценностью при изолированном использовании [72].

В последние десятилетия в клинической практике активно внедряются принципы персонализированной медицины – подхода, ориентированного на максимально точный выбор терапии, основанный на глубоком понимании индивидуальных особенностей организма пациента, этиологии патологии, возможных рисков и преимуществ предлагаемых методов, а также учете психологических факторов и оптимального времени начала лечения [73].

Попытки повышения точности прогнозирования ответа яичников на КОС и исходов программ ВРТ привели к разработке критериев стратификации пациенток до включения в протокол ЭКО, таких как Болонские критерии [45, р. 1-9], и классификация POSEIDON [46, р. 1-71]. Однако даже при их применении сохраняется вероятность неадекватной овариальной реакции [4, р. 124-139].

На сегодняшний день кроме трех классических протоколов стимуляции яичников – длинный, короткий, протокол с антагонистами ГнРГ, существует множество нестандартных схем (рисунок 9). Такое многообразие обусловлено неудовлетворительными результатами стандартных протоколов.

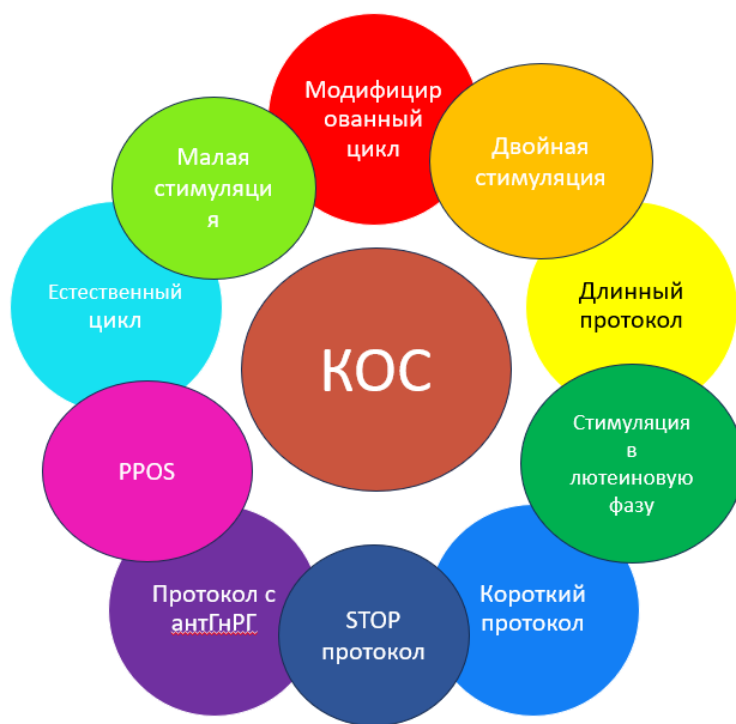


Рисунок 9 – Протоколы стимуляции яичников

Долгое время длинный протокол считался «золотым стандартом» КОС, так как был ассоциирован с получением максимального количества зрелых ооцитов. Однако высокий риск гиперстимуляции яичников у гиперответчиков ограничивает его применение. Несмотря на смену парадигмы в подходах к контролируемой овариальной стимуляции за последнее десятилетие, актуальными остаются поиски оптимального протокола стимуляции для

различных категорий пациенток – гипо-, нормо- и гиперответчиков. Длинный протокол с применением агонистов гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ) сохраняет свою клиническую значимость. У пациенток с субоптимальным ответом на стимуляцию именно длинный протокол демонстрирует более высокую кумулятивную частоту живорождений по сравнению с протоколом, основанным на антагонистах ГнРГ. Это, в свою очередь, способствует снижению совокупных затрат на лечение до момента наступления беременности [74].

На сегодняшний день одним из протоколов выбора является прогестин-праймированный протокол стимуляции яичников (PPOS). В данном случае для блока паразитарного пика ЛГ используются прогестагены (микронизированный прогестерон, дидрогестерон, медроксипрогестерон). Этот протокол подходит всем и гипо- и норм-, гиперответчикам. Единственным его недостатком является отсутствие условий для свежего переноса эмбрионов, вместе с тем, он идеален при планировании преимплантационного генетического тестирования эмбрионов [75].

Протоколы стимуляции яичников представляют собой стандартные универсальные схемы, рассчитанные на среднестатистического пациента, в большинстве случаев они успешны, вместе с тем, помогают не всем. Исследования работы генов, рецепторов привели к пониманию необходимости персонализированной медицины, в частности репродуктивных технологий [76].

#### *Полиморфизмы рецепторов гонадотропинов*

Проведение адекватной контролируемой овариальной стимуляции (КОС) для получения зрелых ооцитов является ключевым этапом программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Одной из актуальных задач в клинической практике остаётся выбор индивидуализированной дозы фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) с целью достижения оптимального ответа яичников. В связи с этим активно развиваются исследования в области фармакогенетики, направленные на выявление генетических маркеров, предсказывающих вариабельность ответа на гонадотропины [77-79].

Одним из перспективных направлений является изучение влияния однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов-кандидатов [44, p. 281-1-281-7], участвующих в регуляции репродуктивной функции. Эти генетические вариации могут изменять аминокислотную последовательность белков или влиять на уровень экспрессии соответствующих генов, модифицируя клеточный ответ на экзогенные гонадотропины.

ФСГ и лютеинизирующий гормон (ЛГ), регулируемые гонадотропин-рилизинг гормоном (ГнРГ), действуют через специфические мембранные рецепторы. Рецептор ФСГ (*FSHR*) экспрессируется на клетках гранулёзы яичников, а рецептор ЛГ/ХГЧ – на клетках тека, гранулёзы и лютеиновых клетках [79]. В ответ на стимуляцию ФСГ происходит рекрутирование фолликулов, тогда как ЛГ индуцирует овуляцию, стероидогенез и формирование жёлтого тела [12, p. 1659-1667].

Ген *FSHR* локализуется на длинном плече хромосомы 2 и содержит 10 экзонов. Один из наиболее изученных полиморфизмов гена – *rs6166 (N680S)*,

расположенный в 10 экзоне, приводит к замене аспарагина (N) на серин (S) в положении 680 аминокислотной цепи рецептора [80]. Данный SNP может снижать функциональную активность рецептора путём нарушения связывания с ФСГ или изменения сигнальных каскадов. Полиморфизм *N680S* ассоциирован с повышением базального уровня ФСГ и сниженной продукцией эстрадиола, особенно у носителей гомозиготного *S-аллеля* [81]. У пациенток, проходящих ЭКО, наличие *S/S* генотипа было связано с пониженной чувствительностью к гонадотропинам по сравнению с носительницами других генотипов [79, p. 893-898; 82, 83]. Однако данные исследований остаются противоречивыми [84, 85], что указывает на необходимость дальнейшего уточнения групп пациентов, которым может быть показана модификация протокола стимуляции на основе фармакогенетического профиля.

Два наиболее распространённых однонуклеотидных полиморфизма (SNP) в экзоне 10 гена рецептора фолликулостимулирующего гормона (*FSHR*) – в позициях 307 (*Thr307Ala*) и 680 (*Asn680Ser*) – активно исследуются в контексте их влияния на овариальный ответ при проведении программ ЭКО. В наблюдательном исследовании [86] была проведена оценка прогностической значимости генотипов *FSHR* в сравнении с традиционными маркерами овариального резерва, такими как возраст пациентки, уровень базального ФСГ, антимюллеров гормон (АМГ) и количество антральных фолликулов (АФК).

Дополнительно исследователи оценили *in vitro* продукцию цАМФ в культурах клеток гранулёзы, полученных от пациенток с различными генотипами *FSHR*, в ответ на стимуляцию рекомбинантным ФСГ. Овариальный ответ в клинических условиях оказался сопоставимым между группами с различными генотипами, что указывает на отсутствие связи между генотипом *FSHR* и вероятностью плохого ответа на стимуляцию.

Однако частота имплантации и наступления беременности была статистически значимо выше у пациенток с генотипом *Ser/Ser* (гомозиготный вариант по *Ser* в позиции 680), в три раза превышая аналогичные показатели у носительниц генотипа *Asn/Asn*. При этом выявленная связь между генотипом *FSHR* и наступлением беременности не зависела от возраста пациентки.

Интересно, что различий в продукции цАМФ между культурами клеток гранулёзы с различными генотипами рецептора ФСГ обнаружено не было, что ставит под сомнение участие данного внутриклеточного сигнального пути в объяснении наблюдаемого эффекта.

Таким образом, генотип рецептора ФСГ может рассматриваться как независимый предиктор наступления беременности при проведении ЭКО, хотя его прогностическая ценность в отношении овариального ответа остаётся ограниченной [86, p. 687-694].

Однако результаты крупного метаанализа, включающего 16 исследований с общим числом участников 2762 человека, показали отсутствие достоверной связи между полиморфизмом *FSHR Asn680Ser* и частотой наступления беременности после проведения программ ЭКО. Тем не менее, тот же метаанализ выявил, что данный полиморфизм может служить важным биомаркером для прогнозирования количества извлечённых ооцитов и риска развития плохого

овариального ответа, особенно у женщин азиатского происхождения [82, p. 262-267].

В исследовании Allegra A. и соавт. [87] был проведён анализ двух полиморфизмов гена *FSHR*: с.2039 A>G (соответствует аминокислотной замене *Asn680Ser*) и с.-29 G>A (вариант в промоторной области), у 168 пациенток, проходивших ЭКО/ИКСИ в связи с тяжёлыми нарушениями сперматогенеза у партнёров или трубным фактором бесплодия.

Распределение частот по генотипам для полиморфизма с.2039 A>G составило:

- A/A – 20%;
- A/G – 55%;
- G/G – 25%.

Для полиморфизма с.-29 G>A:

- G/G – 62%;
- G/A – 34%;
- A/A – 4%.

Комбинированный анализ аллелей с.2039 A>G и с.-29 G>A выявил статистически значимую ассоциацию с ключевыми параметрами овариального резерва: базальным уровнем ФСГ и 17β-эстрадиола, количеством антральных фолликулов (AFC) и индексом фолликулярного роста (FORT). Наиболее благоприятный профиль (низкий базальный ФСГ и эстрадиол, высокий AFC и низкий FORT) был зафиксирован у носительниц генетической комбинации A/GG/G ( $p < 0,05$ ).

При этом начальная доза рекомбинантного ФСГ (рФСГ), продолжительность стимуляции и суммарная доза рФСГ статистически значимо не различались между различными генотипами и аллельными комбинациями. Однако при анализе частоты плохого овариального ответа у пациенток с различными аллельными сочетаниями была установлена достоверно более низкая частота плохого ответа у носительниц варианта A/GG/G. Для остальных комбинаций отношение шансов (OR) не достигало статистической значимости [87].

Ген *LHCGR*, расположенный на хромосоме 2 рядом с геном *FSHR*, состоит из 11 экзонов. Одним из наиболее изученных полиморфизмов этого гена является вариант *N312S* (*rs2293275*), локализованный в экзоне 10, при котором происходит замена аминокислоты аспарагина (N) на серин (S). Распределение генотипов в европеоидной популяции составляет приблизительно: 18% – гомозиготы по *N312*, 49% – гетерозиготы (*N312S*) и 33% – гомозиготы по *S312* [78, p. 191-197]. Несмотря на то, что полиморфизм *LHCGR N312S* изучен значительно меньше, чем полиморфизм *FSHR*, в контексте контролируемой овариальной стимуляции перед программами ЭКО, недавние данные указывают на его потенциальную клиническую значимость. Так, было показано, что женщины, гомозиготные по аллелю *S* одновременно по обоим полиморфизмам рецепторов гонадотропинов – *FSHR N680S* и *LHCGR N312S*, имели четырехкратное увеличение вероятности наступления беременности после

первого цикла ЭКО по сравнению с женщинами с другими генотипами [16, р. 29-37; 88].

Фармакогенетический подход к оценке эффективности различных форм гонадотропинов – включая рекомбинантные ФСГ- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ , корифоллитропин и менопаузальные гонадотропины – в зависимости от возраста пациентки и полиморфизмов генов рецепторов гонадотропинов представляет собой перспективное направление в области персонализированной репродуктивной медицины. Поиск достоверного биомаркера, позволяющего прогнозировать индивидуальный ответ яичников на контролируруемую овариальную стимуляцию, остаётся актуальной задачей современной репродуктологии.

Примером успешного внедрения фармакогенетики служит онкологическая практика, где установлена связь между носительством определённых мутаций и эффективностью конкретных препаратов. Так, наличие мутаций в гене *EGFR* может повышать чувствительность опухоли к тирозинкиназным ингибиторам при немелкоклеточном раке лёгких [89], тогда как мутация *KRAS* при колоректальном раке ассоциируется со снижением эффекта терапии ингибиторами EGFR [90]. Подобные знания позволяют адаптировать лечение под молекулярно-генетический профиль пациента, повышая эффективность терапии.

Принципы индивидуализации лечения постепенно внедряются и в клиническую практику вспомогательных репродуктивных технологий. Известно, что репродуктивная функция может изменяться при наличии определённых хромосомных вариантов [91], а значит, интерес к полиморфизмам генов, регулирующих репродуктивную функцию, оправдан. Несмотря на то, что на сегодняшний день нет убедительных доказательств того, что одиночные полиморфизмы генов рецепторов ФСГ и ЛГ оказывают значительное влияние на исход ВРТ, исключить такую возможность нельзя.

В реальных клинических условиях пока отсутствует возможность рутинного генотипирования пациенток перед началом КОС, поэтому выбор протокола стимуляции базируется на традиционных биохимических и ультразвуковых маркерах: уровне ФСГ, АМГ, эстрадиола, прогестерона и количестве антральных фолликулов (АФК).

При этом уровень ФСГ натошак обратно коррелирует с количеством эмбрионов, пригодных для криоконсервации и переноса [92]. С увеличением концентрации базального ФСГ выше 9,13 МЕ/л наблюдается снижение кумулятивной частоты живорождений [92, р. 493-1-493-11; 93, 94].

Повышенные значения ФСГ могут приводить к преждевременной активации фолликулов в поздней лютеиновой фазе, что нарушает синхронность их роста при стимуляции. Профилактика асинхронного фолликулярного роста с использованием эстрогенов или антагонистов ГнРГ в лютеиновой фазе способна увеличить вероятность наступления беременности [95].

Таким образом, разнородные результаты, представленные в литературе, могут быть обусловлены этническими различиями изучаемых групп и различиями в схемах стимуляции. Необходимы дополнительные исследования, направленные на оценку роли носительства полиморфизмов генов рецепторов

гонадотропинов в эффективности овариальной стимуляции. Возможно, именно сочетание полиморфизмов в генах *FSHR* и *LHCGR* позволит более точно предсказать яичниковый ответ и риск развития синдрома гиперстимуляции. В перспективе накопление знаний о генетических характеристиках различных популяций сделает возможным точечный подбор схемы КОС до начала лечения.

Кроме того, известно, что снижение уровня ФСГ до старта стимуляции с применением прайминга способствует получению большего числа зрелых ооцитов высокого качества. Это, в свою очередь, позволяет увеличить число компетентных эмбрионов, повышая шансы на успешную имплантацию в рецептивный эндометрий и улучшая исходы ВРТ [73, p. 76-79].

#### **1.4 Морфокинетика эмбрионов и ПГТ-А**

На сегодняшний день во многих странах Европы законодательно разрешен перенос только одного эмбриона. Для улучшения частоты наступления беременности необходимо выбирать наилучший эмбрион, что невозможно сделать, основываясь только на морфологической оценке.

В научных публикациях встречаются разногласия относительно связи между морфологическими характеристиками эмбрионов и вероятностью наступления беременности. Такие расхождения могут быть обусловлены различиями в подходах к культивированию эмбрионов, включая сроки их переноса – на 2–3 либо 5–6 сутки развития, что варьируется в зависимости от времени и страны проведения процедур.

Эмбрионы 5-6 дня – бластоцисты, по морфологической структуре оцениваются по Гарднеру [96], оценка включает 3 показателя: размер бластоцисты от 1 до 6, развитие внутриклеточной массы от А до С, развитие трофэктодермы от А до С, где А – много компактно расположенных клеток, С – мало свободнолежащих клеток. Таким образом, оценка бластоцисты звучит так: 3АА, 2ВВ, 4СС. Однако нет однозначных данных о том, какой из параметров наиболее точно предсказывает успешность имплантации эмбрионов. Так, исследования Ahlstrom А. показало зависимость частоты наступления беременности от качества трофэктодермы эмбриона (ОШ 0,68, ДИ 0,53–0,87,  $p = 0,0020$ ), а морфология внутриклеточной массы до заморозки не влияла на шанс беременности [71, p. 1-8]. Van den Abbeel et al. выявили путем множественной логистической регрессии, что только размер бластоцисты был значимым предиктором живорождения ( $p = 0,002$ ) [97].

Одной из последних технологий, призванной помочь в выборе наиболее компетентного эмбриона, является Time laps – технология покадровой съемки (TLM) эмбрионов в ходе их культивирования [98]. Покадровая съемка изображений эмбрионов проводится с интервалами в 5-20 минут с момента оплодотворения и затем представляется в виде видеозаписи. Разные системы таймлапс-съёмки используют отличающееся программное обеспечение и опираются на индивидуальные алгоритмические модели оценки. Так называемые морфокинетические параметры отражают морфологические характеристики и особенности процессов дробления, фиксируемые в строго определённые временные интервалы развития эмбриона – например, момент

появления и исчезновения пронуклеусов, клеточных делений, а также формирования бластоцисты. На основе анализа обширных баз данных, включающих временные характеристики этих событий, были разработаны алгоритмы, позволяющие предсказывать вероятность имплантации и успешного исхода беременности [99].

Покадровая съемка и анализ эмбрионального морфокинеза представляет значительный интерес, хотя ее преимущества перед традиционным культивированием до сих пор не доказаны [100]. С целью улучшения эффективности преодоления бесплодия методами ВРТ проводятся исследования влияния различных факторов на развитие эмбрионов. José Bellver [101] не нашел связи качества морфологии и морфокинеза эмбрионов с ожирением, однако было продемонстрировано, что эмбрионы женщин с недостаточным весом быстрее достигают стадии 8 клеток, чем у женщин с нормальным весом или ожирением [102]. Так же не было найдено зависимости качества морфологии и морфокинеза эмбрионов от протокола стимуляции с агонистами или антагонистами ГНРГ [103].

К неблагоприятным факторам, влияющим на продолжительность ранних морфокинетических событий и клеточных циклов эмбрионов, можно отнести курение [104] и эндометриоз [105].

Большой интерес представляет влияние возраста женщины на развитие эмбрионов. Так, с увеличением возраста женщины эуплоидность эмбрионов снижается, и можно предположить, что это приведет к нарушению темпа роста эмбрионов, что должно быть видно при покадровой съемке. Akhter и Shahab показали достоверную разницу времени появления пронуклеуса и времени 4- и 5-клеточного дробления в разных возрастных группах [106]. Согласно данным исследования Fishel и соавт., у пациенток младше 38 лет, использовавших собственные яйцеклетки, применение технологии таймлапс (TL) для отбора эмбрионов сопровождалось увеличением частоты живорождений на 19%. У реципиенток старше 37 лет перенос одной бластоцисты, отобранной с использованием TL, демонстрировал сопоставимую вероятность живорождения с переносом двух эмбрионов, выращенных при стандартных условиях культивирования, но при этом без повышения риска многоплодной беременности [107].

Таким образом, в условиях практически повсеместного перехода на перенос одного эмбриона в полость матки с целью снижения частоты многоплодия отбор компетентного эмбриона принимает драматическое значения для достижения высоких показателей наступления беременности и родов. Используя покадровую съемку развития эмбрионов, возможно отобрать наилучший эмбрион для переноса в полость матки или проведения преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии, особенно это важно у пациенток старшего репродуктивного возраста.

Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А) в последние десятилетия стал обыденной практикой в клиниках ВРТ.

Преимплантационное генетическое тестирование, впервые предложенное Верлинским и Кулиевым в 1996 году [108], было основано на ряде ключевых

допущений: значительная доля неудач ЭКО обусловлена анеупloidией эмбрионов; исключение хромосомно аномальных эмбрионов до переноса может повысить эффективность ЭКО; трофэктодермальная биопсия на стадии бластоцисты обеспечивает репрезентативный материал; ploидность трофэктодермы адекватно отражает статус внутренней клеточной массы; ploидия остается стабильной на последующих этапах эмбриогенеза [109].

В настоящее время для проведения ПГТ-А применяются различные технологии, включая флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), а также полногеномные методы: количественная ПЦР (qPCR), сравнительная геномная гибридизация на микрочипах (aCGH), SNP-массивы и секвенирование нового поколения (NGS) [110, 111].

Среди перечисленных методов преимущество в практике ВРТ отдается полногеномным технологиям, таким как aCGH и NGS [111, p. 1122-1128].

Метод FISH, несмотря на более ограниченные возможности, используется в отдельных клинических ситуациях, включая анализ сбалансированных робертсоновских транслокаций и специфических хромосомных перестроек, а также валидацию результатов, полученных другими методами [110, p. 285-288]. Вместе с тем, данные рандомизированных клинических исследований не подтверждают повышения эффективности программ ВРТ при использовании FISH в качестве основного метода ПГТ-А [112].

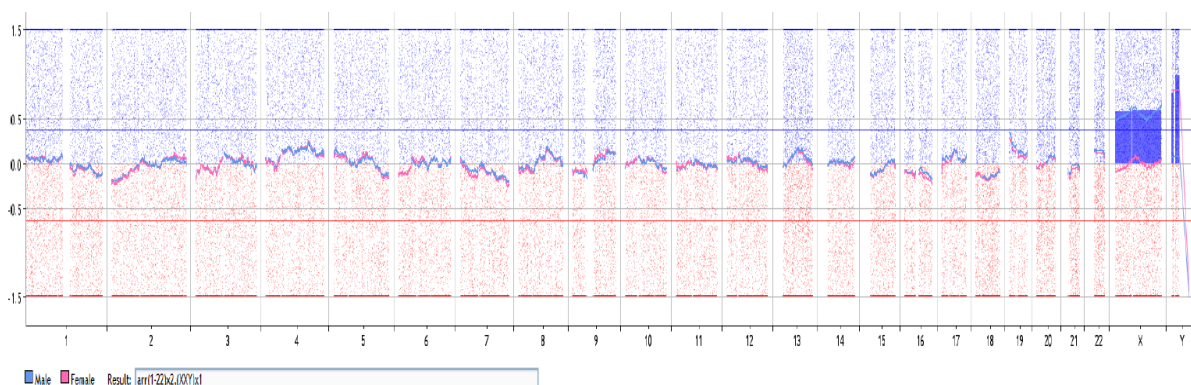


Рисунок 10 – Пример результата ПГТ-А методом aCGH – 47 ХХУ

В соответствии с рисунком 10 показана сравнительная геномная гибридизация на микрочипах (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) является одним из широко используемых методов в современной практике вспомогательных репродуктивных технологий. Впервые на территории Республики Казахстан данный метод был внедрён в 2016 году [113]. В ряде исследований подтверждена высокая точность, чувствительность и воспроизводимость данного подхода, что делает его надёжным инструментом для молекулярной диагностики [114]. Методика основана на применении микрочипа, содержащего тысячи олигонуклеотидных зондов, каждый из которых соответствует определённой области генома. В процессе анализа меченая ДНК пациента подвергается гибридизации с зондами микрочипа, и далее регистрируются изменения интенсивности сигнала, которые указывают на

увеличение или уменьшение копийности соответствующих участков хромосомного материала. Существенным преимуществом метода является его высокая разрешающая способность: в отличие от классического кариотипирования, которое позволяет выявлять изменения размером не менее 5–10 млн пар нуклеотидов, аCGH способен детектировать вариации в пределах 100 тыс. пар оснований и менее [115]. Протокол включает конкурентную гибридизацию тестируемой (меченной зелёным флуорофором) и контрольной (меченной красным) ДНК на нормальных метафазных хромосомах. Оценка соотношения флуоресцентных сигналов позволяет выявить как дупликации, так и делеции участков хромосомного материала. Применение технологии полногеномной амплификации (WGA) расширяет возможности метода и делает возможным его использование для анализа любых типов клеточного материала, включая полярные тельца, отдельные бластомеры и клетки трофэктодермы [116]. Полученные результаты представляют собой усреднённые данные по совокупности биопсированных клеток, что способствует снижению искажения результатов, связанного с мозаицизмом эмбрионов. Отдельные исследования демонстрируют высокие показатели частоты имплантации при использовании данного метода и рекомендуют его сочетание с переносом единственного эмбриона (SET) как наиболее клинически эффективную стратегию в программах ВРТ [116, с. 20-22]. В связи с тем, что при высокой частоте имплантации возрастает риск многоплодной беременности (до 57%), рекомендуется ограничение числа переносимых эмбрионов при применении аCGH [117].

Метод сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (аCGH) обладает рядом преимуществ по сравнению с методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). К числу его ключевых достоинств относятся высокая разрешающая способность, возможность проведения полногеномного скрининга всех хромосом, количественное выявление хромосомных аномалий, включая однородительские дисомии, простота интерпретации результатов, их объективность и воспроизводимость, а также высокая степень автоматизации процесса и оперативность получения данных (в среднем от 1 до 3 суток) [118-120].

Тем не менее, как и любая молекулярно-генетическая методика, аCGH имеет определённые ограничения. В частности, данный метод не позволяет выявить сбалансированные хромосомные перестройки (например, реципрокные транслокации, инверсии, робертсоновские транслокации), а также не обнаруживает несбалансированные мутации, размеры которых находятся за пределами чувствительности метода (например, точечные мутации, микроделеции и дупликации, тринуклеотидные повторы). В ряде клинических ситуаций применение аCGH целесообразно сочетать с дополнительными методами, такими как FISH, количественная ПЦР (qPCR) и иные молекулярно-цитогенетические подходы, что обеспечивает более точную интерпретацию результатов [121-123].

Клиническое значение метода аCGH заключается в его способности выявлять анеуплоидии, наличие которых ассоциировано со снижением вероятности имплантации эмбриона и повышенным риском самопроизвольных

выкидышей. Это особенно актуально для пациенток старшей репродуктивной возрастной группы, у которых качество ооцитов и частота эуплоидных эмбрионов значительно снижаются. Выборочный перенос эуплоидных эмбрионов, отобранных с использованием aCGH, способствует повышению частоты наступления беременности, снижению риска потерь на ранних сроках и общему улучшению прогноза программ ВРТ у данной категории пациенток [121, р. 718-723; 124-127].

Несмотря на высокую технологическую оснащённость и доказанную клиническую эффективность метода, в научной литературе сохраняется дискуссия относительно обоснованности рутинного применения преимплантационного генетического тестирования (ПГТ-А) у всех пациентов, проходящих ВРТ. На сегодняшний день отсутствует единый консенсус в отношении показаний к проведению ПГТ-А, а также критериев отбора супружеских пар, которым может быть рекомендован данный вид диагностики.

Актуальность исследования в области ВРТ у женщин старшего репродуктивного возраста обусловлена множеством нерешённых научных и практических вопросов, требующих дальнейшего изучения с применением современных технологических и аналитических подходов. В частности, необходимо более глубокое понимание возрастных механизмов снижения фертильности и разработка клинических решений, направленных на повышение эффективности программ ЭКО. Учитывая высокую клиническую сложность пациенток данной возрастной группы, очевидна необходимость строго индивидуализированного подхода на всех этапах терапии, что требует создания клинически ориентированных алгоритмов персонализированного ведения

### **1.5 Полость матки при бесплодии: диагностика и лечение хронического эндометрита**

Успешное завершение программы экстракорпорального оплодотворения характеризуется наступлением беременности – это значит, эмбрион, способный к имплантации, попал в рецептивный эндометрий. Большая часть ответственности за имплантацию принадлежит эмбриону [128], но и качество эндометрия тоже имеет важное значение. Одной из основных причин нарушения рецептивности эндометрия является хронический эндометрит.

Хронический эндометрит (ХЭ) обычно протекает бессимптомно или имеет нечеткие симптомы, такие как аномальные маточные кровотечения, тазовые боли и бели [129]. Уровень распространенности ХЭ, по данным исследований биопсий пациенток, перенесших гистерэктомию, составляет приблизительно от 10-11% [130].

Согласно данным, представленным в работе Romero и соавт., признаки хронического эндометрита (ХЭ) были выявлены приблизительно у 15% женщин, участвовавших в программах экстракорпорального оплодотворения. При этом среди пациенток с повторяющимися неудачами имплантации (recurrent implantation failure, RIF) частота диагностики ХЭ возростала до 42% [131]. В исследовании, проведённом Zolghadri и соавт., эндоскопически подтверждённый ХЭ был обнаружен у 57,8% женщин, в анамнезе которых имелось три и более

случая самопроизвольного прерывания беременности [132]. Дополнительно, по результатам недавнего проспективного наблюдения за пациентками с RIF и привычным невынашиванием беременности (ПНБ), воспалительные изменения эндометрия, соответствующие ХЭ, были зафиксированы у 14% пациенток из группы RIF и у 27% из группы ПНБ [133]. С учетом представленных данных, становится очевидным, что хронический эндометрит следует рассматривать как значимую гинекологическую патологию, оказывающую влияние на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий и, следовательно, требующую детальной диагностики и коррекции.

*Диагностические подходы к выявлению ХЭ* Одним из наиболее распространённых методов выявления хронического воспаления эндометрия является биопсия, при которой наличие плазматических клеток в эндометриальной строме служит основным морфологическим критерием постановки диагноза [130, р. 344-349]. Однако интерпретация результатов гистологического исследования может быть затруднена. Это связано с рядом факторов, таких как присутствие мононуклеарных воспалительных клеток, пролиферативная активность стромальных элементов, морфологическое сходство плазмоцитоидных клеток и выраженные изменения, характерные для поздней секреторной фазы эндометрия, включая прецидуальную трансформацию [129, р. 176-183; 134].

Указанные особенности могут приводить к повышенному риску диагностических ошибок.

Стандартная гистологическая окраска гематоксилином и эозином (H&E) демонстрирует ограниченную чувствительность при обследовании пациенток с бесплодием и повторными потерями беременности – менее 10% случаев позволяют достоверно установить диагноз [134, р. 153-157; 135]. В связи с этим была внедрена иммуногистохимическая методика, направленная на выявление CD138 – маркера, характерного для плазматических клеток [136]. При её использовании диагностическая чувствительность существенно возрастает, особенно у женщин с привычным невынашиванием беременности: по сравнению с H&E-окраской (13%), ИГХ-окрашивание выявляет признаки ХЭ в 56% случаев [137].

Гистероскопия также зарекомендовала себя как высокоинформативный инструмент в оценке состояния эндометрия. При этом типичными признаками хронического воспаления считаются наличие мелких полипов, отека стромы, а также участков гиперемии – как фокальной, так и диффузной (рисунок 11). Согласно данным исследований, визуальная оценка слизистой полости матки с помощью гистероскопии позволяет достигать диагностической чувствительности до 93,4%, что превосходит показатели, демонстрируемые гистологическими методами [24, р. 103-111; 138]. Различия между результатами гистероскопии и гистологии могут быть обусловлены методологическими ограничениями последнего подхода и зависят от качества биоптата, фазы менструального цикла и морфологических особенностей воспалительного процесса.

Нормальное состояние полости эндометрия, выявленное при гистероскопии, оказалось относительно точным предиктором успешной беременности после вспомогательных репродуктивных технологий [24, p. 103-111]. Частота наступления беременности была выше после антибактериальной терапии и нормализации гистероскопической картины полости матки [138, p. 323-329].

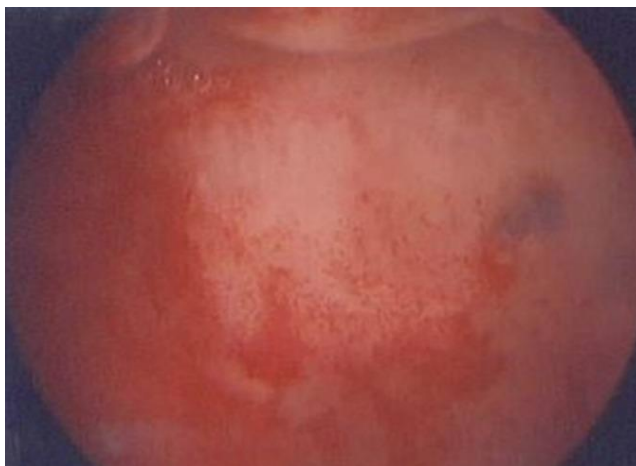


Рисунок 11 – Гистероскопическая картина хронического эндометрита

Учитывая связь между гистероскопическими данными хронического эндометрита и неблагоприятными репродуктивными исходами, а также учитывая сложности, связанные с гистологической диагностикой хронического эндометрита и расхождения между гистологическими и гистероскопическими данными, следует рассматривать гистероскопическую оценку полости эндометрия как стандартный тест в клинической практике при оценке пациентов с повторными неудачами имплантации (RIF) или повторными самопроизвольными выкидышами (RPL) [139].

Несмотря на общепринятое мнение о стерильности полости матки, современные исследования указывают на наличие микробной флоры в эндометрии у женщин вне беременности. Считается, что микробиота может проникать в полость матки из нижних отделов репродуктивного тракта, однако, благодаря ряду защитных механизмов, распространение патогенных микроорганизмов, как правило, ограничивается. К числу таких барьеров относятся слизистая пробка цервикального канала, эпителиальный слой эндометрия, а также локальные иммунные клетки – нейтрофилы, макрофаги и натуральные киллеры. Кроме того, эндометрий содержит компоненты врожденного иммунитета, включая антимикробные пептиды, играющие ключевую роль в предотвращении инвазии патогенной микрофлоры [23, p. 185-191].

Патофизиология ХЭ представляет собой сложный процесс, затрагивающий молекулярные, иммунологические, генетические процессы [140, 141]. Результатом ХЭ является нарушение рецептивности эндометрия, что приводит к неудачам имплантации.

Лечение ХЭ

Применение антибактериальной терапии может способствовать снижению негативного воздействия хронического эндометрита (ХЭ) на фертильность. В одном из ретроспективных исследований, включавших пациенток с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) и подтвержденным ХЭ по данным гистероскопии, Cicinelli и соавт. [142] установили, что через год после проведенного антибактериального лечения частота наступления клинической беременности была достоверно выше в подгруппе, у которой гистероскопическая картина нормализовалась – 74,8% против 24,4% в группе с сохраняющимися признаками воспаления. В свою очередь, в проспективном исследовании McQueen и соавт. [135, р. 1026-1029] показано, что частота живорождений за одну беременность у пациенток с ПНБ и ХЭ значительно увеличилась до 56% после лечения антибиотиками по сравнению с 7% до лечения.

Было обнаружено, что лечение антибиотиками относительно эффективно при ХЭ. Джонстон-МакАнанни и др. [143] более чем у 70% пациенток с верифицированным ХЭ (на основании данных биопсии эндометрия) произошло выздоровление после применения доксициклина по схеме: 100 мг дважды в сутки в течение двух недель. Аналогичные результаты приводят Kitaya и соавт. [144] у женщин с RIF и выявленным ХЭ гистологическая регрессия CD138+ плазматических клеток после терапии доксициклином достигала 96%. В другой схеме, включающей комбинацию офлоксацина (по 400 мг дважды в сутки) и метронидазола (по 500 мг дважды в сутки) в течение 14 дней, достигалась гистологическая ремиссия у 73% пациенток [135, р. 1026-1029].

Дополнительные данные были получены в контексте ЭКО-протоколов с переносом эмбрионов у женщин с RIF и ХЭ. Так, по результатам ретроспективного анализа, проведенного Yang и коллегами [139, р. 1363-1368], после антибактериальной терапии показатели имплантации (18,6% против 4,9%) и продолжающейся беременности (29,3 против 7,4%) были значительно выше, чем до лечения. Аналогичное исследование Cicinelli и соавт. [138, р. 323-329] показало, что частота наступления беременности и уровень родоразрешения у пациенток с нормализованной после терапии гистероскопической картиной составили 65 и 60,8% соответственно, тогда как у женщин с сохраняющимися признаками ХЭ – лишь 33 и 13,3%. Совокупность приведенных данных указывает на существенное влияние хронического эндометрита на вероятность наступления и исход беременности при использовании вспомогательных репродуктивных технологий.

Xinghan Cheng и соавт. в своем мета-анализе подтвердили значение лечения, а точнее излеченности, ХЭ на результативность ЭКО. Пациентки с отрицательными результатами гистологии после лечения ХЭ имели более высокие показатели частоты наступления беременности и кумулятивной частоты живорождения, чем пациентки без ХЭ [145].

Согласно Рекомендация ESHRE «Good practice recommendations on add-ons in reproductive medicine» 2023 г скрининговая гистероскопия в настоящее время не рекомендуется для рутинного клинического использования. Гистероскопию как скрининговый метод диагностики можно рассмотреть у пациенток с рецидивирующей неудачей имплантации [146].

Можно заключить из выше сказанного, что пациентки с бесплодием и неудачными попытками имплантации или невынашиванием беременности должны быть обследованы путем гистероскопии с биопсией эндометрия и проведением ИГХ на маркеры ХЭ – CD138. При выявлении ХЭ антибактериальная терапия обязательна перед переносом эмбрионов полость матки.

### **1.6 Образ жизни, вес и метаболический профиль в эффективности ВРТ**

Рост распространённости ожирения наблюдается в последние десятилетия по всему миру, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2016 г 13% населения страдали ожирением. Согласно данным за 2022 год, среди взрослого населения (18 лет и старше) избыточная масса тела была выявлена у 43% лиц, при этом ожирение диагностировано у 16%. Особенно высокая распространенность избыточного веса и ожирения отмечается среди женщин репродуктивного возраста – более 50% из них имеют индекс массы тела, превышающий нормативные значения, что представляет собой значимый фактор риска для репродуктивного и общего соматического здоровья [147].

Ожирение характеризуется такими системными проявлениями как воспаление и оксидантный стресс [148]. Гипертрофия адипоцитов приводит в итоге к некрозу и инфильтрации жировой ткани циркулирующими макрофагами и Т-хелперными клетками, которые секретируют провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) и провоспалительные интерлейкины - IL-6. Адипокины - лептин и липокалин, вырабатываемые адипоцитами, при секреции способствуют дополнительному высвобождению TNF $\alpha$  и IL-6. Воспалительные реакции во всех органах и тканях, включая яичник, вызываются цитокинами и адипокинами, высвобождающимися в кровоток. Антиоксидантная система клетки подавляется повышенным уровнем активных форм кислорода, которое образуется при хроническом воспалении [148, p. R79-R89].

Ожирение может способствовать уменьшению числа примордиальных фолликулов и увеличению числа антральных и атретических фолликулов, что приводит к истощению овариального резерва и способствует субфертильности. В экспериментах показано, что вызванный ожирением окислительный стресс приводит к снижению качества ооцитов, нарушению мейоза и повышению частоты анеуплоидии [148, R79-R89; 149].

Ожирение оказывает негативное влияние и на рецептивность эндометрия за счет воспалительной реакции, нарушения транскрипции генов, участвующих в имплантации [150, 151].

Негативное влияние ожирения на репродуктивную систему отражается и на исходах программ ВРТ.

Женщины с лишним весом и ожирением требуют больших доз гонадотропинов, у них ниже частота бластуляции, частота наступления беременности и выше частота выкидышей [152].

Мета-анализ E. S. Jungheim и соавт. не выявили отличий в ЧНБ и LBR у реципиентов донорских ооцитов с ожирением [153]. Это может означать, что

негативному влиянию лишнего веса и ожирения более подвержены яйцеклетки, чем эндометрий.

Мета-анализ Nathalie Sermondade, основанный на 682 532 циклах ВРТ, показал, что избыточная масса тела и ожирение у женщин оказывает отрицательное влияние на шанс рождения живого ребенка после ЭКО [154].

Лишний вес и ожирение неблагоприятно влияет также на исходы беременности. Такие осложнения беременности как выкидыш, гипертония, преэклампсия и диабет ассоциированы с женским ожирением [155]. Причем, с повышением степени ожирения риск гипертензионных расстройств и сахарного диабета повышается [156, 157].

Пищевые привычки и приверженность определенным диетам могут улучшить результативность процедур ВРТ. Так, мета-анализ 2022 г, проведенный Sanderman E.A. и соавторами, показал, что средиземноморская диета ассоциирована с лучшими результатами ВРТ [158]. Однако, экстренные вмешательства, за 4-12 недель до процедуры ЭКО, по снижению веса не приводят к значительному улучшению исходов ВРТ [159].

Таким образом, лишний вес и ожирение оказывают негативное влияние на репродуктивную систему человека: качество и количество яйцеклеток, рецептивность эндометрия. Модификация образа жизни, питания, нормализация ИМТ может улучшить исходы ВРТ: ответ яичников на стимуляцию, имплантационный потенциал эндометрия.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Характеристика исследования и групп пациентов

Диссертационная работа выполнена на базе ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA» г. Алматы, Республика Казахстан.

Научно-исследовательская работа представляет собой двунаправленное когортное исследование и включала следующие этапы:

Первый этап: Для определения структуры программ ЭКО и ПЭ в Республике Казахстан проведен анализ Национального регистра ВРТ за 2020-2022 гг. [25, с. 8-15; 26, с. 10-18]; проведено сплошное исследование циклов ВРТ, проведенных в ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA» с 2020 по 2024 гг.

Популяционный анализ – определение частот носительства генов рецептора ФСГ *rs6165* и *rs6166*, генов фолатного обмена *MTR*, *MTRR*, *MTHFR* в казахской популяции с бесплодием, проведение сравнительного анализа частот встречаемости генов - кандидатов в казахской этнической группе с частотами соответствующих генов *FSHR*, *MTR*, *MTRR*, *MTHFR* - кандидатов в мировых популяциях, представленных в международной базе HarMap.

Второй этап: ассоциативный анализ - поиск ассоциативных связей полиморфизмов генов с исходами программ ВРТ.

Третий этап: определение факторов, влияющих на исходы программ ВРТ – ИМТ, уровень ФСГ, частоты патологии полости матки у женщин с бесплодием; особенности морфокинетики эмбрионов, генетической характеристики эмбрионов.

Четвертый этап: разработка алгоритма персонифицированного ведения пациенток старшего репродуктивного возраста с бесплодием. Проверка алгоритма персонифицированного ведения пациенток старшего репродуктивного возраста с бесплодием в проспективной группе.

Первые 3 этапа проводились в виде ретроспективного когортного исследования. Четвертый этап – проспективное когортное исследование.

Для определения частот носительства генов рецептора ФСГ *rs6165* и *rs6166*, *MTR*, *MTRR*, *MTHFR* в казахской популяции в исследование включено 150 пациенток, прошедших программу ЭКО/ИКСИ и/или ПГТ-А и/или ПЭ в ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA» г. Алматы.

*Все пациенты отобраны согласно следующим критериям.*

Критерии включения:

Принадлежность к казахской национальности по дедушкам и бабушкам по материнской и отцовской линии по данным опроса, неудачные программы ВРТ в анамнезе.

Критерии исключения:

Нарушения сперматогенеза у партнера, эндометриоз по данным УЗИ, носительство сбалансированных хромосомных аномалий по данным кариотипирования обоих супругов, аномалии развития и патологии внутренних

половых органов, препятствующие вынашиванию беременности, донорские яйцеклетки, суррогатное материнство.

Все супружеские пары были обследованы согласно Приказа Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 15 декабря 2020 г. №172 «О внесении изменений и дополнений к Приказу МЗ РК от 30 октября 2009 г. №627 «Правила проведения вспомогательных репродуктивных методов и технологий» [160]. Программа ВРТ начиналась только при условии нормальных показателей общеклинического обследования и положительного заключения терапевта о возможности проведения ЭКО и ПЭ, наличии информированного согласия обоих партнеров.

Для проведения сравнительного анализа частот встречаемости генов - кандидатов в казахской этнической группе с частотами соответствующих генов *FSHR*, *MTR*, *MTRR*, *MTHFR* - кандидатов в мировых популяциях использовались данные, представленных в международной базе HarMap, публикациях.

Для определения частоты патологии полости матки у женщин с бесплодием проведено сплошное исследование 569 гистероскопий, проведенных в ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA» г. Алматы с 2019 по 2022 гг.

Для определения зависимости морфологии эмбрионов от возраста женщины проведено ретроспективное исследование эмбриологических протоколов 311 эмбрионов пациенток  $\geq 35$  лет и 393 эмбрионов женщин  $< 35$  лет, прошедших программу ЭКО/ИКСИ в ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA» г. Алматы с января 2023 по декабрь 2023 гг.

Для определения влияния возраста женщины и особенности морфокинетики эмбрионов на исходы ВРТ было проведено сплошное исследование, включавшее 431 перенос единственного эмбриона. Эмбрионы культивировались в инкубаторе MIRI® Time-Lapse Incubator и оценены ИИ CHLOE™ (Cultivating Human Life through Optimal Embryos, Israel), в ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA» г. Алматы с мая 2023 по август 2024 гг. Учитывалась частота наступления беременности.

Для определения генетической характеристики эмбрионов женщин старшего репродуктивного возраста проведено ретроспективное исследование эмбриологических протоколов 262 эмбрионов пациенток  $\geq 35$  лет, прошедших программу ЭКО/ИКСИ и ПГТ-А методом aCGH в ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA» г. Алматы с мая 2016 по сентябрь 2018 гг.

Для определения зависимости морфологического качества эмбрионов от возраста женщины, зависимости наступления беременности от возраста женщины и морфологического качества эмбрионов проведено сплошное ретроспективное исследование всех переносов, проведенных с января 2023г по декабрь 2024 г. в основную группу включены 387 переносов эмбрионов женщинам  $\geq 35$  лет, в группу сравнения включено 695 переносов эмбрионов в полость матки женщинам  $< 35$  лет.

Для определения зависимости наступления беременности от возраста женщины, оценки ИИ на 5-7 сутки развития эмбрионов, цикла переноса - свежий

или крио были использованы деревья решений, метод CHAID. Зависимая переменная – клиническая беременность.

Для определения зависимости эмбриологических исходов от вида экзогенного ЛГ было проведено ретроспективное исследование. 60 женщин в возрасте 18-42 лет были разделены на 2 группы: 1 группа получала рекомбинентный ФСГ (Gonal-F, Follitropin alpha, Merck Serono S.p.A., Италия) и мочевой ФСГ+ЛГ (Menopur (Ferring Pharmaceuticals, St Prex, Швейцария); 2 группа получала рекомбинентный ФСГ и рекомбинантный ЛГ (Pergoveris - Lutropin alpha, Follitropin alpha, Merck Serono S.p.A., Италия).

Для проверки работы алгоритма персонифицированного ведения пациенток старшего репродуктивного возраста казахской популяции было проведено когортное проспективное исследование с января 2024 г по декабрь 2024 г. В основную группу было включено 30 пациенток, прошедшие персонифицированную предгравидарную подготовку, в контрольную группу – 39 пациенток, прошедших стандартное обследование и подготовку перед программой ЭКО и ПЭ.

Критерии включения в основную группу:

- принадлежность к казахской популяции;
- персонифицированная предгравидарная подготовка;
- возраст  $\geq 35$  лет.

Критерии включения в контрольную группу:

- принадлежность к казахской популяции;
- стандартная предгравидарная подготовка;
- возраст  $\geq 35$  лет;
- свежий перенос эмбриона 5 суток.

Критерии исключения из исследования:

- возраст  $< 35$  лет;
- принадлежность к не казахской популяции;
- тяжелые нарушения сперматогенеза у мужчины;
- врожденные аномалии половых органов, препятствующие вынашиванию беременности;
- миома матки, эндометриоз, препятствующие вынашиванию беременности;
- изменения в кариотипе одного/обоих супругов;
- донорские ооциты;
- суррогатное материнство.

## **2.2 Молекулярно-генетические исследования (полиморфизмы гонадотропинов, фолатного обмена)**

*Выделение ДНК из парафиновых блоков*

ДНК выделяли из парафиновых блоков, полученных при гистологическом исследовании эндометрия пациенток с бесплодием, полученным путем гистероскопии или аспирационной биопсии. Выделение ДНК из парафиновых блоков проводилось набором Gene JET FFPE DNA Purification Kit согласно инструкции производителя в ТОО «TreeGene».

### *Полимеразная цепная реакция в реальном времени*

Исследование полиморфизмов генов *FSHR*, *MTR*, *MTRR*, *MTHFR* проводилось с использованием аллель-специфических праймеров методом ПЦР на RealTime амплификаторе CFX96 (BioRad, USA). Детекция продуктов амплификации на аппарате CFX96 BioRad осуществлялась автоматически в каждом цикле амплификации.

Real time PCR была проведена после извлечения ДНК и амплификации. Определение полиморфизмов *MTHFR rs1801133 (C677T)*, *rs1801131 (A1298C)*, *MTR rs 1805087 (A2756G)*, *MTRR rs1801394 (A66G)* проводилось согласно инструкции реактивами «ДНК технология», Россия. Генетическое исследование проведено в лаборатории ТОО «TreeGene», г. Алматы.

Материалом для исследования полиморфизмов гена *FSHR* в контрольной группе послужила ДНК, выделенная из периферической крови участников, включённых в популяционную контрольную выборку. Контрольная группа включала 1990 условно здоровых лиц казахской национальности.

Отбор в популяционную группу контроля осуществлялся на основании следующих критериев: принадлежность к этнической группе казахов (включая бабушек и дедушек по обеим линиям), возраст от 18 лет и старше, а также наличие юридической и когнитивной дееспособности, позволяющей самостоятельно выразить информированное согласие на участие в исследовательском проекте.

Образцы ДНК респондентов хранятся в ДНК-биобанке «Мирас» при АО «Национальный центр акушерства, гинекологии и перинатологии» (НЦАГиП). Биобанк создан в рамках международного проекта *InterPregGen* – «Генетические исследования преэклампсии в популяциях Центральной Азии и Европы», реализованного по Грантовому соглашению № 282540 в рамках Седьмой рамочной программы Европейской Комиссии.

Генотипирование каждого индивидуума на –2,5 WIN SNP проведено с использованием чипов OmniChip 2,5M Illumina в Геномном центре DECODE Iceland. Суммарный коэффициент генотипирования в популяционном контроле составляет 0,989181.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с применением программного обеспечения PLINK, предназначенного для анализа ассоциаций на уровне всего генома. Данный инструмент разработан специально для проведения масштабных геномных исследований и широко используется в медицинской генетике.

Данные о частотах аллелей и генов *MTHFR rs1801133 (C677T)*, *rs1801131 (A1298C)*, *MTR rs1805087 (A2756G)*, *MTRR rs1801394 (A66G)* группы популяционного контроля взяты из публикаций отечественных авторов [53, с. 3-154; 60, р. 110-118].

### **2.3 Гистероскопия, иммуногистохимия эндометрия**

Офисную гистероскопию проводили в пролиферативную фазу менструального цикла. Использовали жесткий гистероскоп диаметром 2,9 мм фирмы Karl Storz, Германия, с углом поля зрения 30° и однопоточным

диагностическим тубусом диаметром 3,2 мм. Для освещения применяли 300-ваттный источник света с ксеноновой лампой, цифровую камеру, 21-дюймовую видеокамеру и цветной экран. Полость матки расширяли физиологическим раствором при давлении 100 мм рт.ст. Забор биоптата эндометрия осуществляли с использованием биопсийных щипцов Karl Storz, Германия, из верхней части полости матки. Также проводили тщательную визуальную оценку всей стенки полости матки и состояния слизистой оболочки эндометрия.

Пробы эндометрия фиксировали в нейтральном забуференном 10% растворе формалина, после чего они подвергались обработке в спиртовых растворах, ксилоле и затем залиты в парафин для последующего гистологического анализа. Тонкие срезы (не более 5 мкм) изготавливали на микротоме для создания гистологических слайдов, которые окрашивали эозином и гематоксилином. Все образцы биопсии эндометрия подвергались исследованию одним гистопатологом-консультантом. При гистологической диагностике хронического эндометрита использовали общепринятые критерии. Особое внимание уделяли следующим особенностям: поверхностному отеку стромы, увеличенной плотности стромы, плеоморфному стромальному воспалительному инфильтрату с преобладанием лимфоцитов и плазматических клеток, нарушениям кровоснабжения и микроциркуляции, а также атрофическим изменениям в изучаемых образцах эндометрия.

Для проведения иммуногистохимического исследования использовался ручной пероксидазный метод на парафиновых срезах толщиной 3 мкм в соответствии со стандартным протоколом. Для этого применяли моно- и поликлональные антитела фирмы Ventana Medical Systems, Inc. (США). Реакцию оценивали с помощью системы визуализации Ultraview universal dab detection kit + System, также производства Ventana Medical Systems, Inc. Для изучения экспрессии CD138+ на парафиновых срезах использовали кроличьи моноклональные антитела. Положительный результат теста определяли по наличию флюоресценции при просмотре стекла под специальным микроскопом, что указывало на наличие искомого рецептора в клетках эндометрия.

Наличие хронического эндометрита оценивалась по количеству плазматических клеток CD138+ в строме эндометрия. Оценка количества плазматических клеток CD138+:

- 0-2 клеток в поле зрения – отрицательная реакция;
- 3-6 клеток в поле зрения – слабая реакция;
- 7-15 клеток в поле зрения – умеренно-выраженная реакция;
- $\geq 16$  клеток в поле зрения – выраженная реакция [161].

#### **2.4 Методы стимуляции, гормональный и УЗИ-мониторинг**

Программа ЭКО и ПЭ включала следующие этапы:

- стимуляция суперовуляции;
- забор ооцитов путем трансвагинальной пункции;
- обработка спермы в градиенте плотности;
- оплодотворение методом ИКСИ;
- культивирование эмбрионов 5-6 суток;

- биопсия трофэктодермы на 5 или 6 сутки культивирования;
- замораживание эмбрионов методом витрификации;
- перенос размороженных эмбрионов в естественном или искусственном цикле после применения ПГТ-А [160].

Стимуляция суперовуляции проводилась по стандартным протоколам [162]. Для стимуляции использовались препараты рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона, комбинированный препарат рекомбинантного ФСГ и ЛГ, или человеческий менопаузальный гонадотропин. Дозу препаратов подбирали индивидуально, учитывая возраст женщины, предыдущие протоколы, уровень АМГ, число антральных фолликулов на начало цикла. Согласно протоколам [162], проводился ультразвуковой мониторинг роста фолликулов и эндометрия на ультразвуковом сканере Samsung Sonoace R3, на основании темпа роста проводили коррекцию дозы гонадотропинов. При достижении лидирующих фолликулов диаметра 18-20 мм, назначался триггер финального созревания ооцитов за 32-36 часов до забора яйцеклеток. В качестве триггера использовался хорионический гонадотропин в дозе 10000 МЕ или агонист рилизинг-гормона в дозе 0,2 мг.

Трансвагинальную пункцию проводили под внутривенной гипнальгезией:

- 1) руки хирурга обрабатываются по общепринятой методике;
- 2) перед пункцией влагалище обрабатывалось стерильным физиологическим раствором и протиралось на сухо;
- 3) после визуализации яичника на экране фолликул яичника совмещается с пунктирной линией. УЗ-датчик должен быть плотно прижат к боковому своду влагалища и максимально подведен к пунктируемому яичнику (рисунок 12);
- 4) после аспирации всех фолликулов в одном яичнике УЗ-датчик перемещается к другому боковому своду влагалища и производится аспирация фолликулов во втором яичнике.



Рисунок 12 – Трансвагинальная пункция фолликулов

Фолликулярную жидкость, полученную в результате пункции фолликулов, помещали в специальную емкость. Аспират исследовали под стереомикроскопом, и полученные ооциты переносили в среду для культивирования. Чашку с ооцитами помещали в специальный инкубатор CO<sub>2</sub> (рисунок 13).

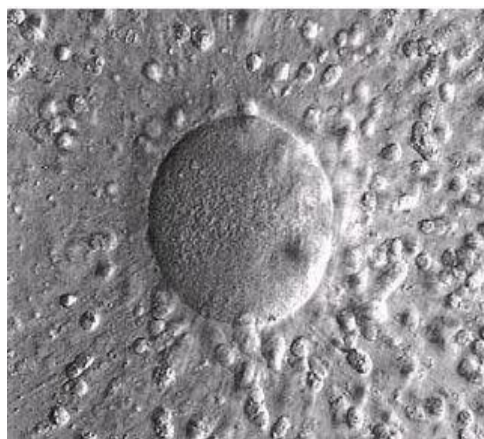


Рисунок 13 – Яйцеклетка, полученная в результате пункции фолликулов

Для оплодотворения применяли специально подготовленную сперму мужа (партнера) или донора. Получение спермы мужа/партнера осуществлялось путем мастурбации [160], донорская сперма использовалась только криоконсервированная.

Как нативные, так и криоконсервированные сперматозоиды перед использованием отмывали от семенной плазмы. Фракция морфологически нормальных и наиболее подвижных сперматозоидов отделялась от остальных сперматозоидов. Основным способом обработки спермы являлось центрифугирование в градиенте плотности, рисунок 14.

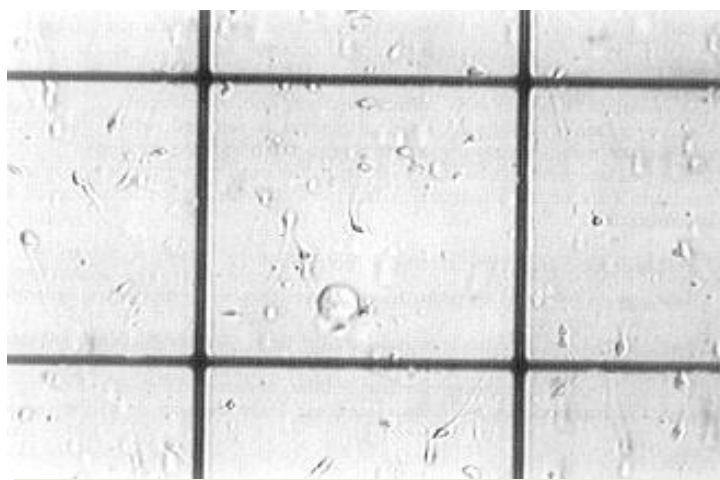


Рисунок 14 – Обработанная сперма в камере Горяева

Оплодотворение проводили методом ИКСИ. Проведение ИКСИ осуществлялось при помощи инвертированного микроскопа NIKON Eclipse Ti, оборудованного оптической системой НМС, видеокамерой ОСТАХ, подключенной к монитору и программному обеспечению, микроманипуляционной системой фирмы Narishige, рисунок 15.



Рисунок 15 – Проведение ИКСИ

Первым этапом ИКСИ является очищение ооцита от кумулюсных клеток, для этого при помощи дозатора на 200 мкл ооцит-кумулюсные комплексы помещались в капли для отмывания (с гиалуронидазой) и аспирировались в наконечник и обратно до удаления клеток кумулюса в течение 30 секунд.

После этого ооциты переносились в четырехлуночный планшет с чистой средой Fertilization Medium на 30 мин.

На втором этапе отбирался подвижный и морфологически нормальный сперматозоид, который обездвиживался прижатием микроиглы к кончику хвоста и аспирировался хвостом вперед в полость иглы путем создания отрицательного давления.

На третьем этапе проводилось оплодотворение, для этого ооцит с помощью микроинструментов ориентировался так, чтобы полярное тело располагалось в положении «12 часов», созданием отрицательного давления ооцит фиксировался присоской.

Сфокусированная игла перемещалась вплотную к блестящей оболочке ооцита в положении «3 часа» и созданием положительного давления в игле сперматозоид перемещался к кончику иглы. Игла плавно вводилась в цитоплазму ооцита через блестящую оболочку. Затем в инъекторе микроиглы создавалось отрицательное давление, при котором вязкая цитоплазма прорывалась, сперматозоид попадал в иглу; при прорыве цитоплазмы происходил скачок, после которого немедленно создается положительное давление, при котором сперматозоид с содержимым цитоплазмы поступал в ооцит, после чего микроигла осторожно удалялась из ооцита.

Наличие оплодотворения ооцитов оценивали через 12-24 часов, по выявлению двух четко визуализирующихся пронуклеусов. Зиготы

культивировали в среде, где происходит начальное развитие эмбрионов. Культивирование эмбрионов проводилось в культуральных средах: Origio Sage; инкубаторы: Cook MINC™ Benchtop Incubator с газовой смесью в процентном отношении CO<sub>2</sub> - 6%, N<sub>2</sub> 89%, O<sub>2</sub> – 5%, при температуре 37,0-37,1°C.

В исследуемых группах переносился 1 эмбрион.

В асептических условиях после соответствующей обработки операционного поля, влагалища, шейки матки проводилось трансабдоминальное УЗИ органов малого таза. Матка визуализировалась в сагитальном срезе, через цервикальный канал вводился катетер для переноса эмбрионов, проводился трансфер эмбрионов в среднюю треть и ближе к дну матки, рисунок 16.

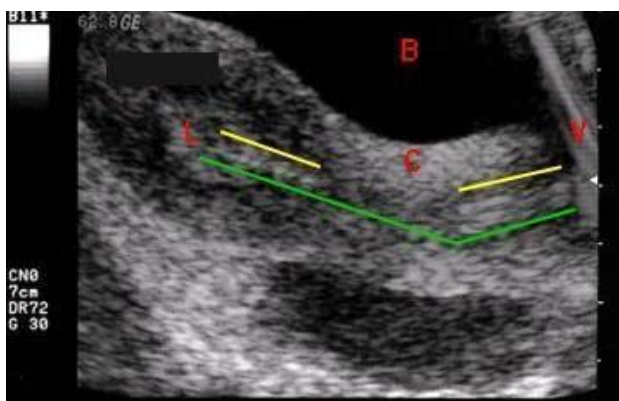


Рисунок 16 – Ультразвуковая картина переноса эмбрионов

Посттрансферная поддержка лютеиновой фазы проводилась препаратами прогестерона, эстрогенов или их аналогами.

После проведения аСГН выдавался результат о генетическом качестве эмбриона – пригоден для переноса или нет. При наличии эмбриона, пригодного для переноса, проводился перенос размороженного эмбриона. Перенос криоконсервированного-размороженного эмбриона проводился в естественном или искусственном цикле [162]. В естественном цикле осуществлялся мониторинг роста собственного фолликула без применения стимуляции, после овуляции на 5-7 день осуществлялась разморозка эмбриона и перенос его в полость матки. В искусственном цикле проводилась подготовка эндометрия препаратами эстрогенов, при достижении толщины эндометрия 8-10 мм, назначались препараты прогестерона, перенос эмбриона в полость матки осуществлялся на 5-7 день назначения препаратов прогестерона.

В обеих группах диагностика беременности осуществлялась по содержанию бета-хорионического гонадотропина в крови или в моче через 12-14 дней от момента переноса эмбрионов. Ультразвуковая диагностика беременности в обеих группах проводилась с 21 дня после переноса эмбрионов.

Гормональный мониторинг проводился в ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA» путем электрохемилюминесценции (ЭХЛ) венозной крови на 2-3 день менструального цикла согласно Клиническому протоколу [162].

## 2.5 Морфокинетика и генетика эмбрионов

Полученные эмбрионы 5 или 6 дня (бластоцисты) оценивались по Д. Гарднеру [96, р. 367-381]. Данные представлены в таблице 1.

Стадия развития бластоцисты оценивалась от 1 до 6, отражала размер бластоцисты.

Таблица 1 – Оценка возраста бластоцисты

Стадия	Название	Описание
1	2	3
1 стадия	начало кавитации 	полость бластоцисты только начинает формироваться, ее размер от едва различимого до половины объема эмбриона. Внутренняя клеточная масса отчетливо не видна. Зачастую такой эмбрион выглядит, как компактная морула с небольшой щелевидной полостью.
2 стадия	бластоциста ранняя 	полость занимает около половины эмбриона. Внутренняя клеточная масса хорошо различима и смещена к одному из полюсов. Размер эмбриона не увеличен по сравнению с исходным ооцитом
3 стадия	бластоциста средняя 	полость занимает более половины эмбриона. Полностью сформированная бластоциста, но размер ее еще не увеличен по сравнению с исходным ооцитом
4 стадия	бластоциста поздняя, или экспандированная 	размер бластоцисты увеличен по сравнению с исходным ооцитом и эмбрионом на стадии дробления. Оболочка истончена и напряжена

Продолжение таблицы 1

5 стадия	начало хетчинга (вылупления) 	оболочка эмбриона надорвана, бластоциста приступает к вылуплению.
6 стадия	бластоциста вылупившая, или свободная 	бластоциста полностью вышла из оболочки.

Также оценивалась степень развития бластоцисты – отдельно трофэктодермы и внутриклеточной массы, в буквенном обозначении от А до С, где А – это самая высокая оценка, много компактно расположенных клеток, В – достаточно много клеток, расположенных чуть менее компактно, С- мало рыхло расположенных клеток, таблица 2. Разница между оценками А и В имеет неточную границу, часто зависит от субъективной оценки эмбриолога [163].

Таблица 2 – Оценка степени развития внутриклеточной массы бластоцисты

Развитие внутриклеточной массы	
А	много клеток, компактно лежат
В	немного клеток некомпактно лежат
С	мало клеток, лежат диффузно

Степень развития трофэктодермы эмбрионов 5-6 дня в буквенном обозначении от А до С где А – это самая высокая оценка, представлена в таблице 3.

Таблица 3– Оценка степени развития трофэктодермы бластоцисты

Развитие трофэктодермы	
А	много клеток
В	немного клеток
С	мало клеток

В результате качество эмбриона складывается из этих 3 показателей и будет выражаться, например, так: 5АА, 4АВ, 3 ВС и т.д. [96, р. 367-381]. На рисунке 17 представлены фото бластоцист с различной оценкой: а – хорошего качества, б – среднего качества, в – плохого качества.



а – 5AA; б – 3BB; в – 2BC

Рисунок 17 – Примеры бластоцист с различной морфологической оценкой

#### Морфокинетика эмбрионов

Культирование части эмбрионов проводилось в инкубаторе MIRI® Time-Lapse Incubator, Mini, 6 Chambers, 230 V, 50/60 Hz, Esco Medical Technologies, UAB. Инкубатор оснащен системой покадровой съемки. Покадровая съемка проводилась с интервалом 10 минут. В качестве искусственного интеллекта (ИИ) выступало программное обеспечение CHLOE™ (Cultivating Human Life through Optimal Embryos, Israel). ИИ давал оценку развития эмбрионов на 3 и 5 сутки развития в баллах.

#### *Молекулярно-генетические методы исследования эмбрионов*

Для проведения ПГС методом aCGH использовались эмбрионы 5-7 дня. Проводилась биопсия трофэктодермы эмбрионов с последующей криоконсервацией эмбрионов и биоптатов. Затем проводилась амплификация ДНК и исследование методом aCGH [164].

Алгоритм проведения процедуры ПГС методом aCGH:

1. Разводили положительный и отрицательный контроль:
  - отрицательный контроль – 1xPBS;
  - положительный контроль – в 200 раз Male и Female ДНК с набора Agilent
2. Вносили по 2,5 мкл контролей в 0,2 мл пробирки.
3. Добавляли по 2,5 мкл буфера для экстракции (Cell extraction buffer – зеленая крышка).
4. Приготовляли мастермикс для экстракции (Mix1).
5. Добавляли по 5 мкл Mix1 в каждую пробирку с образцами, включая контроли. Требовалось скинуть капли со стенок пробирок на центфуге-вортексе.
6. Инкубировали в амплификаторе по программе Ext1.
7. Приготовили преамплификационную смесь (Mix2).
8. Добавили по 5 мкл Mix2 в каждый образец, перемешивая пипетированием (3-4 раза), сбросили капли с помощью центфуги-вортекса.
9. Инкубировали в амплификаторе по программе Ext2.
10. По окончании амплификации поместили пробирки в холодильник.
11. Приготовили амплификационный микс (Mix3).
12. Добавили по 60 мкл Mix3 в каждый образец.

13. Амплифицировали по программе Ext3.
14. Проверили наличие ДНК с помощью электрофореза.
15. Поместили пробирки в холодильник.

Мечение.

1. Перенесли 13 мкл ампликонов в чистую пробирку.
  2. Добавили в каждую пробирку по 2,5 мкл Random Primer, размешали пипетированием и перенесли в амплификатор с программой Lable1.
  3. Скинули капли со стенок пробирок после амплификации.
  4. Приготовили смеси для меченья MixCy3 и MixCy5.
  5. Добавили по 9,5 мкл смеси MixCy3 и MixCy5 (через один образец) в амплификационные пробирки. Размешали пипетированием.
  6. Амплифицировали по программе Lable2.
  7. Поместили полученный ампликон в 1,5 мл пробирку с 430 мкл MiliQ, перемешали на вортексе.
  8. Перенесли содержимое пробирки в колонку, помещенную в 2 мл пробирку (кат.№ 5190-3391).
  9. Центфугировали 10 минут при 14000 об./мин.
  10. Слили супернатант, оставив осадок в фильтре и вернуть в пробирку.
  11. Добавили в фильтр 480 мкл. miliQ, центфугировали 10 минут при 14000 об/мин.
  12. Вынули фильтр, выбросили пробирку. Фильтр поместили вверх дном в чистую пробирку на 2 мл (не использовать силу).
  13. Открутили 1 минуту при 1000 об./мин.
  14. Выкинули фильтр, в пробирке должно остаться 20-32 мкл раствора.
  15. Объединили полученные образцы по 2 (с Cy3 и Cy5).
  16. Сконцентрировали материал с использованием центфуги ScanVac по программе: 2000 rpm, 15 минут, 40°C до остаточного объема образца 16 мкл.
- Подготовка меченных ампликонов для гибридизации.
1. Подготовили 10x раствор для блокировки повторов:
    - а) добавили 1,350 мкл свободную от ДНКаз и РНКаз воду в пробирку содержащую лиофилизированный 10x aCGH Blocking Agent (входит в состав набора Oliga aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit);
    - б) оставили при комнатной температуре на 60 минут и перемешали на вортексе до полного растворения образца перед использованием или хранением.
  2. Подготовили образцы для гибридизации:
    - а) приготовили гибридизационный мастермикс (Mix4);
    - б) добавили 29 мкл Mix4 в пробирки 0,2 мл, содержащие меченные ампликоны до конечного объема 45 мкл;
    - в) размешали образцы пипетированием, быстро скинули капли на вортексе для сброса капель со стенок пробирок;
    - г) амплифицировали по программе Hyb1:

Гибридизация:

1. Поместили чистую прокладку для микрочипов в основание камеры для гибридизации прокладками вверх.

2. Медленно нанесли 40 мкл ампликонов с гибридационной смесью в клетку гибридационной прокладки. Заполнили все клетки гибридационной прокладки до того, как поместили слайд с микрочипом.

3. Поместили слайд микрочипа «активной стороной» вниз на прокладку для микрочипов (сторона с цифровым баркодом обращена вверх, а надпись «Agilent» - обращена вниз). Удостоверились, что слайды выровнены между собой.

4. Поместили крышку гибридационной камеры на выровненные слайды и скрепили их крепежной скобой.

5. Вертикально поворачивали камеру для смачивания слайдов и оценки подвижности пузырьков. Постучали по камере, если необходимо, для придания подвижности пузырькам.

6. Поместили гибридационную камеру в ротор гибридационной бани с температурой 67°C на 16 часов. Установили скорость вращения ротора 20 об./мин.

Проводилась отмывка чипа. Затем проводилось сканирование на аппарате InnoScan 710 MicroarrayScanner с помощью программы Marix. Отсканированное изображение конвертировалось при помощи Feature Extraction for CytoGenomics. Конвертированное изображение показано на рисунке 18.

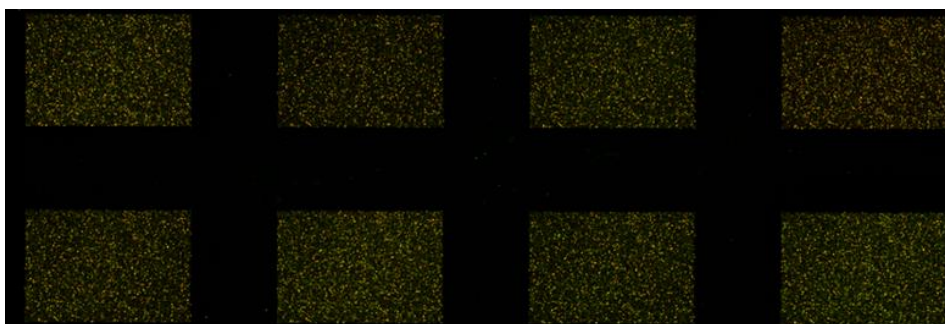


Рисунок 18 – конвертированное изображение с чипа

После конвертации проводится анализ просканированного конвертированного изображения, выдается заключение в виде графика, на котором представлены все хромосомы. На рисунке 19 представлено изображение эуплоидного эмбриона, на рисунке 20 – анеуплоидного эмбриона (моносомия по 16 паре хромосом) по данным aCGH.

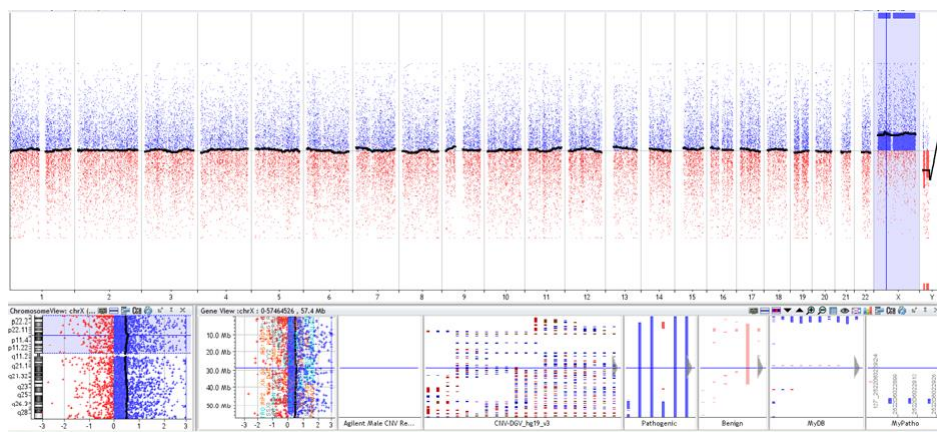


Рисунок 19 – Графическое изображение эуплоидного эмбриона по результатам ПГС методом aCGH

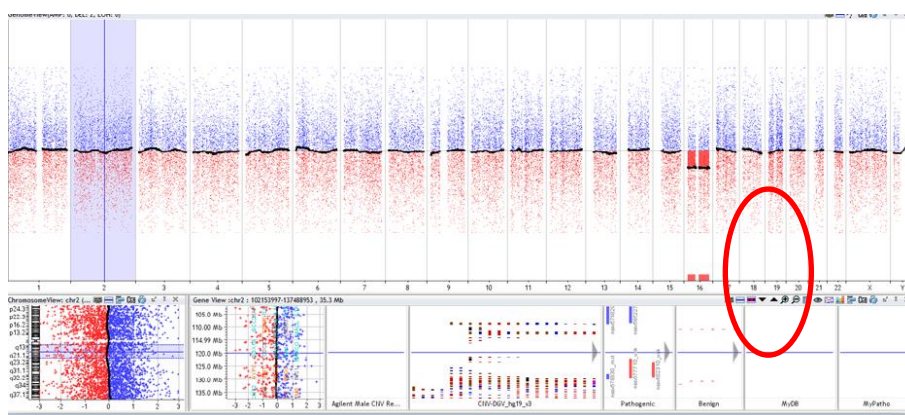


Рисунок 20 – Графическое изображение анеуплоидного эмбриона по результатам ПГС методом aCGH

## 2.6 Этические аспекты

Исследование одобрено Локальной этической комиссией ТОО «Международный Клинический Центр Репродуктологии PERSONA» №2 от 23 ноября 2020 г., Локальной этической комиссией Национального медицинского университета №5 (111) от 28 апреля 2021 г. Все пациенты получили полную информацию о цели исследования и подписывали добровольное информированное согласие.

## 2.7 Статистическая обработка

Ввод первичных данных осуществлялся в электронную базу IBM SPSS Statistics версии 29.0.2.0, защищённую паролем. Для проведения вычислительного анализа дополнительно применялись современные инструменты статистической обработки, в том числе MS Excel на персональном компьютере.

Обработка результатов исследования производилась методами вариационной статистики с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 29.0.2.0. Для количественных переменных рассчитывались средние значения ( $M$ ) и стандартные отклонения ( $\pm SD$ ), представленные в

формате  $M \pm SD$ . Сравнение средних величин между группами осуществлялось с применением двухвыборочного t-критерия Стьюдента.

Качественные характеристики описывались в абсолютных (n) и относительных (%) величинах. Для оценки различий между группами по качественным признакам использовался  $\chi^2$ -критерий.

Отношение шансов (Odds Ratio, OR) применялось для оценки степени влияния факторов: значение  $OR > 1$  свидетельствовало о наличии значимого ассоциативного эффекта исследуемого фактора с определённым исходом.

Для изучения взаимосвязей между переменными применялся корреляционный анализ: при нормальном распределении использовался коэффициент корреляции Пирсона, при отклонении распределения от нормального – метод Спирмена.

Для оценки различий между тремя и более группами проводился однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). ANOVA использовался, в частности, для анализа взаимосвязи между носительством полиморфизмов генов рецептора ФСГ и результатами программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), а также между вариантами полиморфизмов генов фолатного цикла и эффективностью ВРТ.

Пациенты были классифицированы по генотипу следующим образом:

1. Гомозиготы по нормальному (дикому) аллелю.
2. Гетерозиготные носители.
3. Гомозиготы по минорному аллелю.

Статистически значимыми считались различия при уровне вероятности ошибки (p) менее 0,05.

*Основные контрольные показатели:*

- 1) количество дней стимуляции, суммарная доза ФСГ, количество фолликулов;
- 2) количество извлеченных ооцитов, количество зрелых ооцитов, количество оплодотворенных ооцитов, количество эмбрионов на 5-й или 6-й день, частота анеуплоидии.

Частота наступления беременности (ЧНБ) вычисляется по формуле (1):

$$\text{ЧНБ} = \frac{\text{Число беременностей}}{\text{Число начатых циклов(переносов эмбрионов)}} \quad (1)$$

Частота анеуплоидии (ЧА) рассчитывается по формуле (2):

$$\text{ЧА} = \frac{\text{количество анеуплоидных эмбрионов}}{\text{количество отбиопсированных бластоцист}} \quad (2)$$

Частота живорождения рассчитывалась по формуле:

$$\text{ЧЖ} = \frac{\text{Число родов живым плодом} \geq 24 \text{ недели гестации}}{\text{Число переносов эмбрионов}} \quad (3)$$

Частота потери беременности (ЧПБ) определялась по следующей формуле (4):

$$\text{ЧПБ} = (\text{Количество случаев прерывания беременности, включая самопроизвольные выкидыши и случаи неразвивающейся беременности}) / \text{Общее число наступивших беременностей} \times 100\% \quad (4)$$

Этот показатель использовался для оценки репродуктивных исходов в исследуемых группах.

В частоте наступления беременности учитывались только беременности, подтверждённые ультразвуковым исследованием.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1 Структура и характеристика программ ВРТ в РК

С января 2020 г. по декабрь 2024 г. в ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA» проведено 8611 циклов ЭКО и ПЭ (рисунок 21). Обращает внимание увеличение доли ИКСИ в структуре методов оплодотворения, которая растет год от года. Количество программ с использованием классического ЭКО остается стабильной. Так же несколько увеличивается количество программ с использованием донорской яйцеклетки и суррогатного материнства. Вместе с тем, количество женщин старшего репродуктивного возраста, желающих использовать собственный репродуктивный материал не уменьшается.

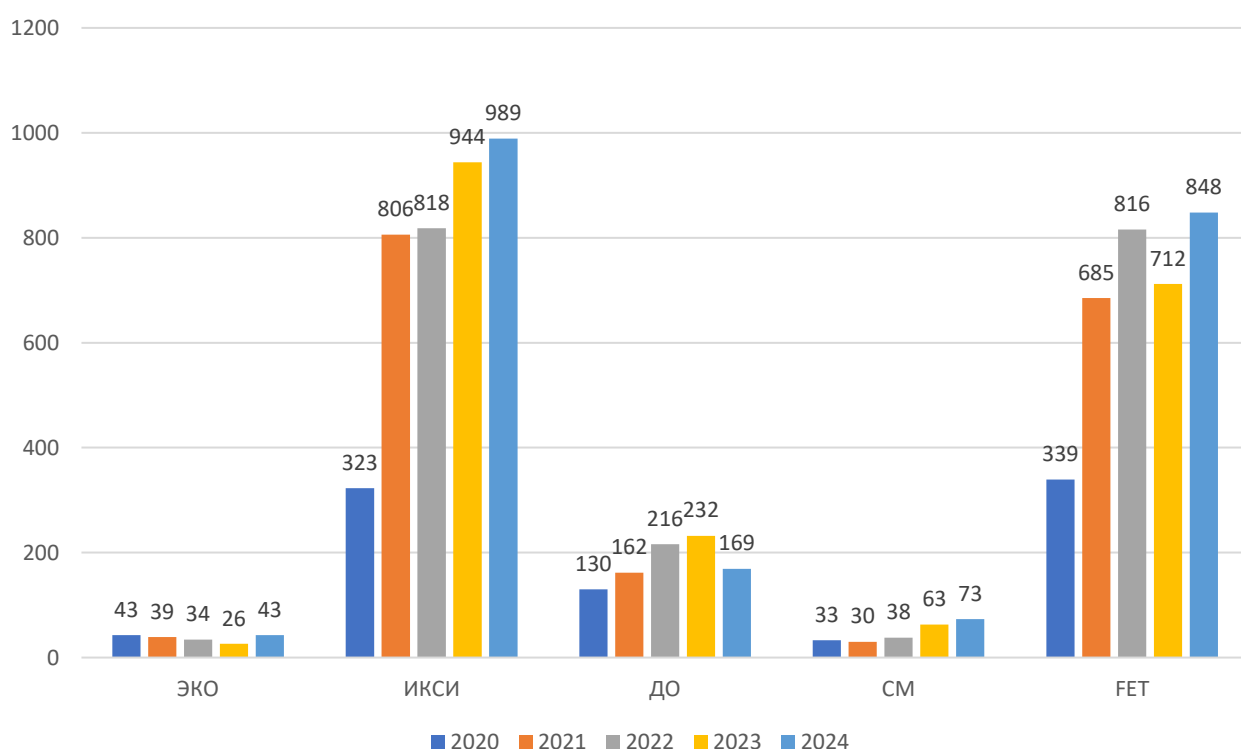


Рисунок 21 – Структура программ ВРТ за 5 лет

Возраст женщин колеблется от 23 до 52 лет. Средний возраст пациенток с бесплодием, обращающихся за вспомогательными репродуктивными технологиями, составляет  $36,725 \pm 0,615$  лет (рисунок 22), при этом доля женщин 35 лет и старше составила 62,37%.

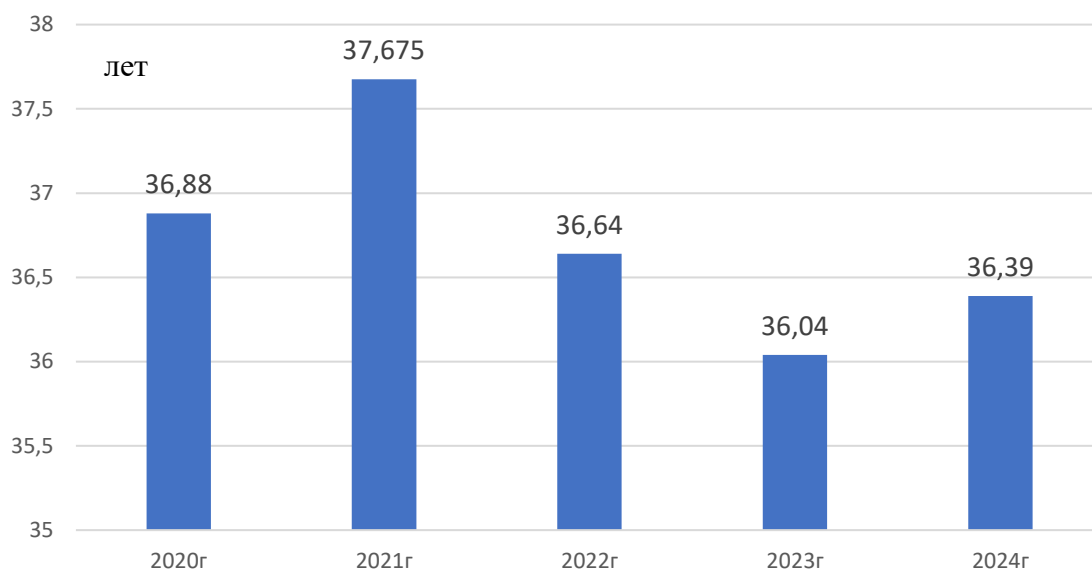


Рисунок 22 – Средний возраст женщин, проходивших программы ЭКО и ПЭ

Первичное бесплодие в среднем составляет 43,12% и вторичное бесплодие – 56,88%. Длительность бесплодия колеблется от 1 года до 28 лет, в среднем составляя  $4,77 \pm 4,02$ . На рисунке 23 представлена частота наступления беременности в свежих и криопереносах в разных возрастных группах. После 35 лет ЧНБ снижается и после 44 лет практически равна 0%. Частота беременности < 34 лет после криопереноса достигает 70%, в возрасте 41-43 лет – 25% ( $p < 0,001$ ), после 44 лет – 1% ( $p < 0,001$ ) (рисунок 23).

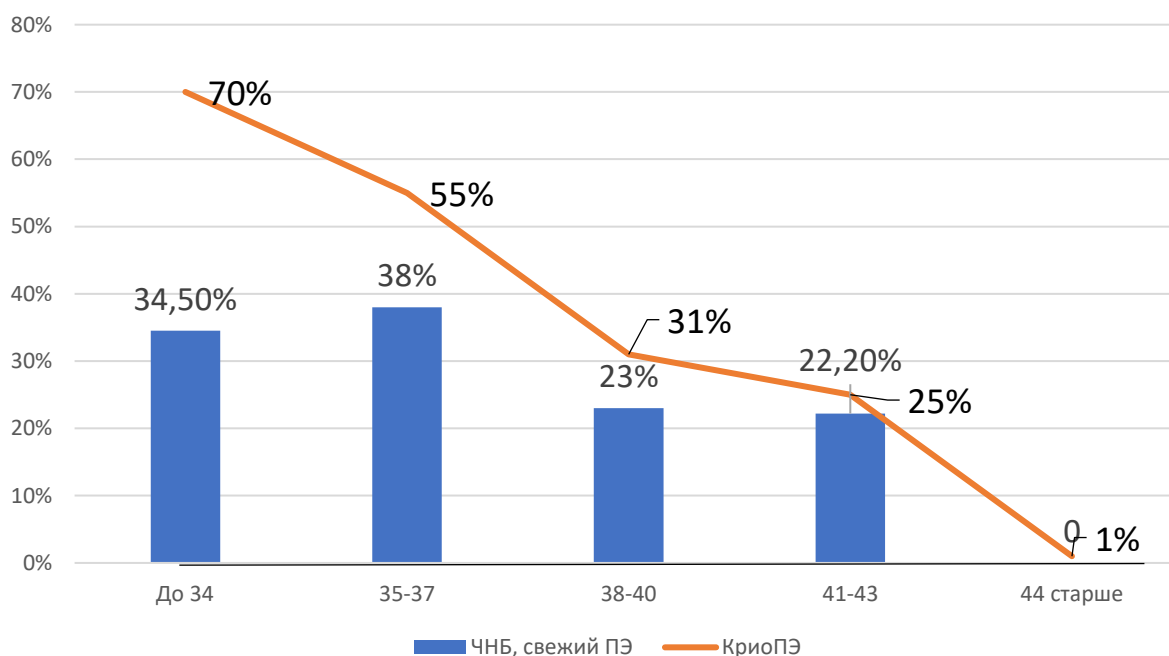


Рисунок 23 – Частота наступления беременности в зависимости от возраста женщины

Так же проведен анализ данных Национального регистра ВРТ за 2020-2022гг, куда подала отчеты 21 клиника из 30, работающих на территории Республики [25, с. 8-15; 26, с. 10-18].

Как представлено на рисунке 24, общее количество программ ВРТ в Республике увеличилось, доля женщин 35 лет и старше, так же выросла с 45% до 49%, что является общим трендом для нашего государства.

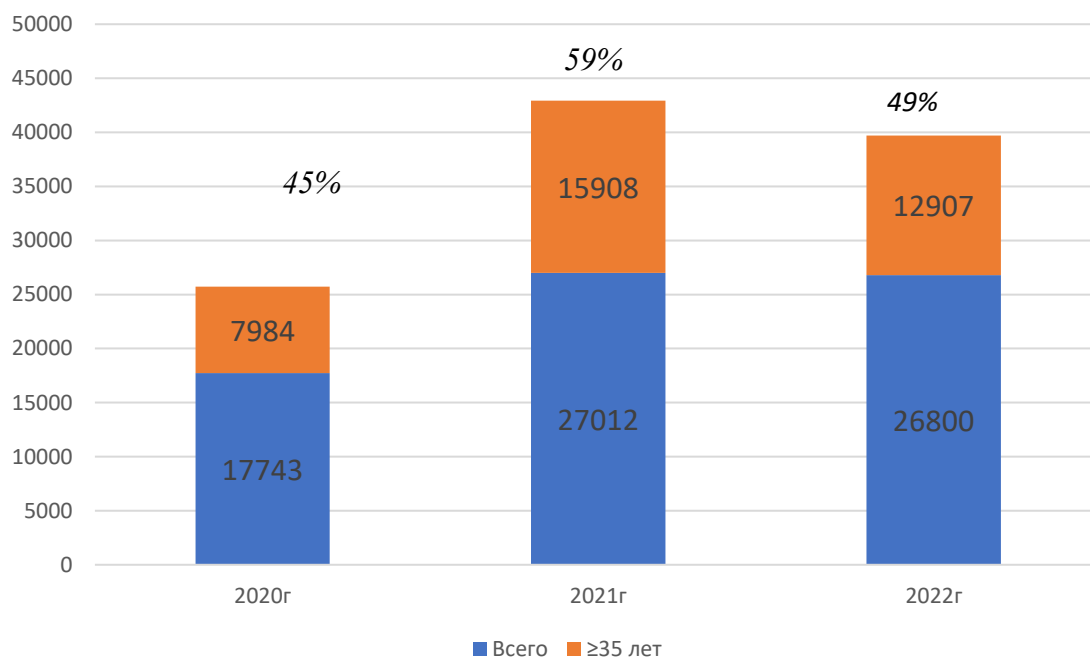


Рисунок 24 – Количество программ ВРТ в Республике Казахстан и количество женщин старшего репродуктивного возраста, прошедших ВРТ

По данным Национального регистра ВРТ продолжается увеличение доли ИКСИ с 70,9% до 77,4%, что соответствует обще мировой тенденции последних 20 лет, соотношения методов оплодотворения ЭКО/ИКСИ как 30/70% соответственно [165]. Это можно объяснить попыткой увеличить частоту оплодотворения и, соответственно, количество эмбрионов. И вместе с тем, частота наступления беременности у женщин старшего репродуктивного возраста остается неизменно низкой. Что подтверждается отчетами мировых организаций ВРТ, на рисунке 25 представлены данные ESHRE за 2019 г. [165, р. 2321-2337] о частоте наступления беременности в разных возрастных группах в свежих циклах.

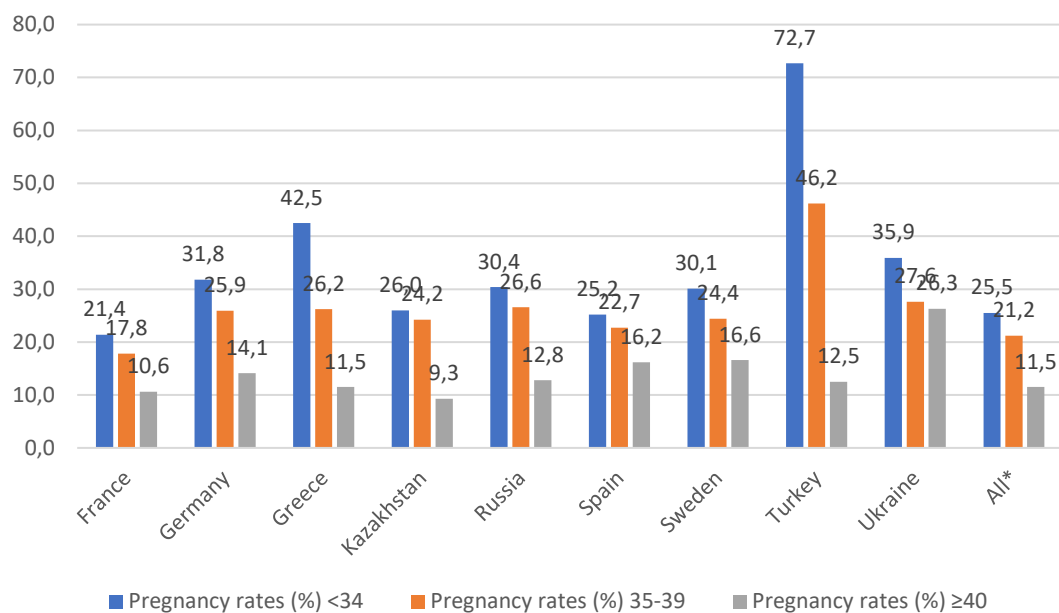


Рисунок 25 – Частота наступления беременности в зависимости от возраста на пункцию

По данным, поданным в ESHRE за 2019 г., женщины 35 лет и старше составили 56,2% от всех циклов ВРТ, проведенных в 40 странах мира.

Частота живорождения так же не увеличивается и обратно пропорциональна возрасту женщины, в среднем достигает 6,1% после 40 лет, рисунок 26.

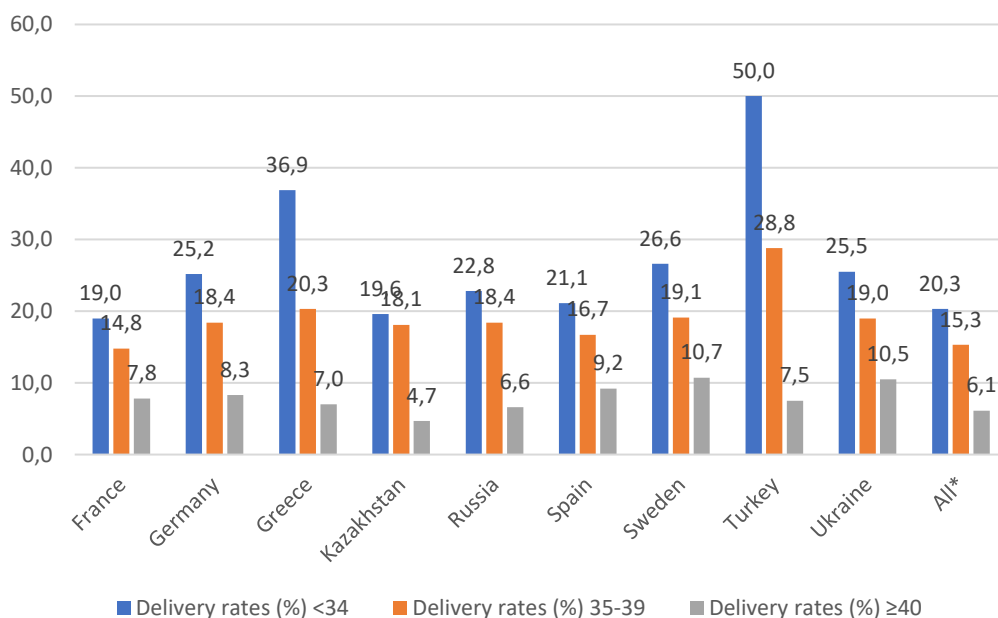


Рисунок 26 – Частота живорождения в зависимости от возраста на пункцию

ЧНБ в 3 раза выше, чем частота родов после 40 лет, что следует из данных рисунков 25,26, это значит, что 2/3 беременностей у женщин старше 40 лет прекращают свое существование.

Несколько выше частота наступления беременности и родов в циклах переноса замороженных эмбрионов, рисунки 27,28. Частота родов в криопереносах 2,4 раза выше, чем в свежих переносах.

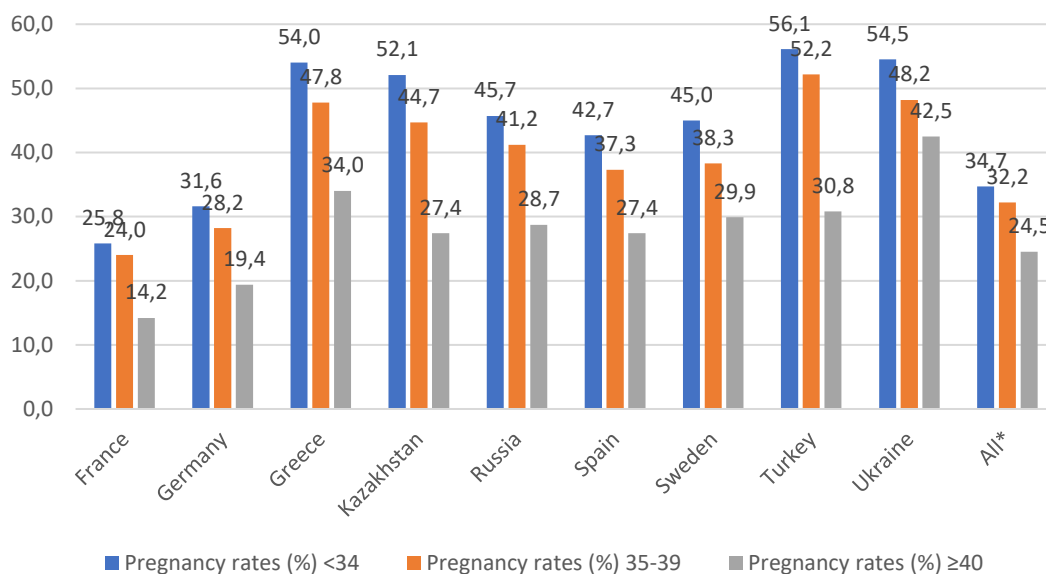


Рисунок 27 – Частота наступления беременности в зависимости от возраста в криопереносах

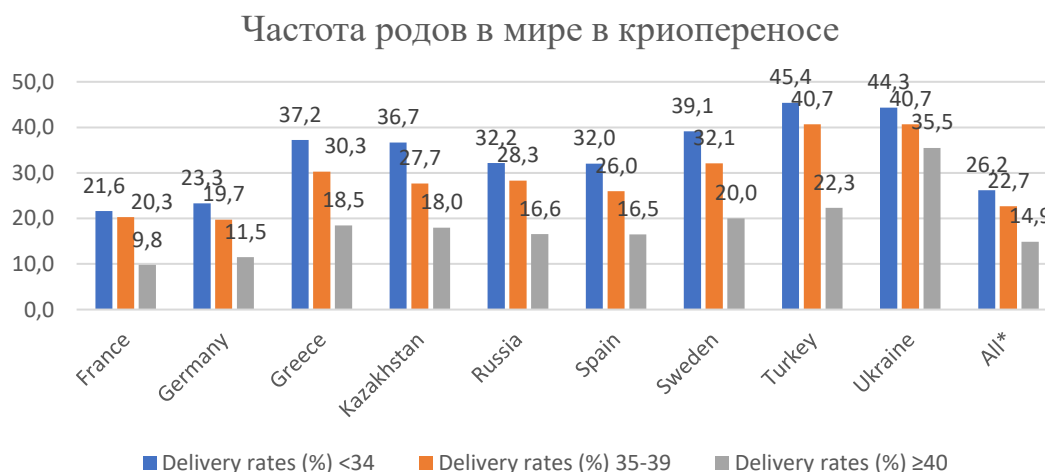


Рисунок 28 – Частота живорождения в зависимости от возраста в криопереносах

Как видно из рисунков 25, 26, 27, 28, ЧНБ и частота родов снижается с возрастом женщины, это не зависит от уровня развития медицины, даже в развитых странах преодолеть влияние возраста на исходы ВРТ не удается.

Таким образом, количество пациенток старшего репродуктивного возраста, обращающихся за ВРТ и имеющих более низкие шансы наступления беременности, в Республике и мире растет, что диктует необходимость разработки персонифицированного подхода, позволяющего повысить эффективность ВРТ у данной категории пациентов [166].

### 3.2 Полиморфизмы MTHFR, MTR, MTRR и их влияние на исходы ВРТ Популяционное исследование

В исследование было отобрано 153 пациентки казахской национальности до дедушек и бабушек, прошедших процедуру ЭКО/ИКСИ и ПЭ в ТОО «Международный клинический центр репродуктологии PERSONA». Материалом для генетического исследования служили парафиновые блоки. В результате 3 пациентки были исключены из исследования, так как при выделении ДНК не был получен материал, пригодный для исследования. В результате основная группа составила 150 женщин казахской национальности с бесплодием. Группой популяционного контроля послужили данные литературы по казахской популяции [53, с. 3-154; 60, р. 110-118].

Таблица 4 – Частоты аллелей и генотипов полиморфизмов *rs1801133* и *rs1801131* гена MTHFR, *rs 1805087* гена MTR, *rs1801394* гена MTRR в казахской популяции

Ген (SNP)	Генотипы	Основная группа (n=150)		Популяционный контроль		X <sup>2</sup>	p-Value
		n	%	n	%		
MTHFR <i>rs1801131</i> (1298 A>C)	A/A	78	52	179	59,1	2,046	0,153
	A/C	63	42	119	39,24	0,310	0,578
	C/C	9	6	5	1,66	6,338	0,012
Всего		150	100	303*	100	-	-
MTHFR <i>rs1801133</i> (677C>T)	C/C	90	60	110	55,.	0,690	0,407
	C/T	54	36	74	37,4	0,069	0,793
	T/T	6	4	14	7,1	1,486	0,223
Всего		150	100	198**	100	-	-
MTR <i>rs1805087</i> (275 A>G)	-	n	%	n	%	-	-
	A/A	114	76	119	60,1	9,387	0,003
	A/G	33	22	71	35,9	7,823	0,006
	G/G	3	2	8	4,0	1,161	0,286
Всего		150	100	198**	100	-	-
MTRR <i>rs1801394</i> (66A>G)	A/A	54	36	64	32,3	0,515	0,474
	A/G	75	50	91	46,0	0,558	0,455
Ген (SNP)	Генотипы	n	%	n	%	X <sup>2</sup>	p-Value
	G/G	21	14	43	21,7	3,387	0,066
Всего		150	100	198**	100	-	-
* – данные контрольной группы взяты из источника [53, с. 14-26];							
** – данные контрольной группы взяты из источника [60, р. 986-988]							

Как видно из таблицы 4, в основной группе частота носительства неблагоприятного гомозиготного аллеля C/C *rs1801131* гена MTHFR была

статистически значимо выше, чем в контрольной группе,  $p=0,012$ . Частота носительства неблагоприятного гомозиготного аллеля  $G/G$   $rs1801394$  гена  $MTRR$  в основной группе имела тенденцию к статистическим значимостям,  $p=0,066$ . Частота распространения аллелей и генотипов полиморфизмов  $rs1805087$  гена  $MTR$   $A/A$  и  $A/G$  в основной группе была выше, чем в популяции,  $p=0,003$  и  $p=0,006$ , соответственно.

Несмотря на то, что значимой статистической разницы в распределении частот аллелей и генотипов полиморфизмов  $rs1801133$  и  $rs1801131$  гена  $MTHFR$ ,  $rs1805087$  гена  $MTR$ ,  $rs1801394$  гена  $MTRR$  в группах не было выявлено, анализ показал, что носителями гомозиготного варианта по дикому аллелю было всего 15 женщин. Остальные 135 пациенток имели хотя бы один неблагоприятный полиморфизм, данные представлены на рисунке.

Таким образом, из рисунка 29 видно, что всего 10% пациенток с бесплодием являлись носителями дикого (благоприятного) аллеля по всем изучаемым нами генам фолатного обмена и, соответственно, 90% являлись носителем хотя бы одного неблагоприятного полиморфизма.

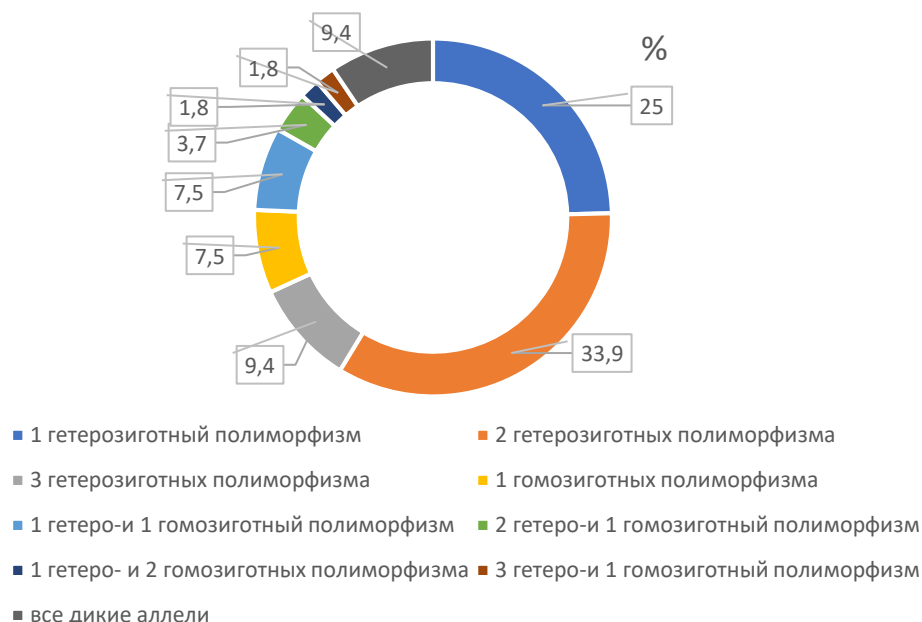


Рисунок 29 – Распределение носительства частот аллелей и генотипов полиморфизмов  $rs1801133$  и  $rs1801131$  гена  $MTHFR$ ,  $rs1805087$  гена  $MTR$ ,  $rs1801394$  гена  $MTRR$

*Влияние носительства неблагоприятных аллелей и генотипов полиморфизмов  $rs1801133$  и  $rs1801131$  гена  $MTHFR$ ,  $rs1805087$  гена  $MTR$ ,  $rs1801394$  гена  $MTRR$  на результативность программ ВРТ у пациенток с бесплодием в казахской популяции*

Таблица 5 – Дисперсионный анализ ассоциации носительства неблагоприятных аллелей и генотипов полиморфизмов генов фолатного обмена ассоциировано с анамнестическими данными и исходами ВРТ

Показатель	<i>MTHFR</i> 677C>T*	<i>MTHFR</i> 1298A>C*	<i>MTRR</i> 66A>G*	<i>MTR</i> 275A>G*
Количество программ ВРТ	0.002	0.671	0.147	0.033
Количество пункций	<0.001	0.250	0.132	0.097
Переносов хор эмбрионов	0.955	0.789	0.078	0.432
Длительность бесплодия, лет	0.884	0.697	0.029	0.010
Кол-во берем-й	0.449	0.697	0.798	0.001
Кол-во замер, выкид	0.106	0.105	0.006	0.005
АМГ	0.051	0.941	0.113	0.422
CD138	0.063	0.774	0.060	0.349
Стимуляция, дней	0.032	0.076	0.645	0.692
Суммарный ФСГ	0.641	0.052	0.001	0.484
Кол-во аспирир. фолликулов	0.123	0.644	0.044	0.006
Кол-во пол ооцитов	0.122	0.995	0.063	0.004
Зрелых (МП)	0.058	0.404	0.072	0.002
Число оплодотворенных ооцитов	0.109	0.465	0.102	0.017
Кол-во бластоцист	0.012	0.153	0.328	0.005
Частота анеуплоидии	0.374	0.151	0.013	0.819
* – представлена p-Value One-Way ANOVA (Non-parametric)				

В соответствии с рисунком 5, дисперсионный анализ показал, что носительство неблагоприятных аллелей и генотипов полиморфизмов *rs1801133* и *rs1801131* гена *MTHFR* ассоциировано с анамнестическими данными и исходами ВРТ.

Как видно из таблицы 5, носительство аллелей *C/T* и *T/T* гена *MTHFR* *677C>T* статистически значимо ассоциировано с большим количеством программ ВРТ и пункций яичников, дней стимуляции и меньшим количеством полученных бластоцист. Тенденция к статистической значимости наблюдалась в ассоциации с более низким уровнем АМГ, более выраженным хроническим эндометритом и меньшим количеством зрелых яйцеклеток у носителей аллелей *C/T* и *T/T* гена *MTHFR* *677C>T*.

Ассоциация носительства аллелей *A/C* и *C/C* гена *MTHFR* *1298A>C* с длительностью стимуляции яичников и суммарной дозой гонадотропинов имеет тенденцию к статистической значимости,  $p=0,076$  и  $0,052$  соответственно.

Установлено, что носительство генотипов *A/G* и *G/G* по полиморфизму гена *MTRR* *66A>G* достоверно связано с рядом неблагоприятных репродуктивных показателей. В частности, отмечена статистически значимая ассоциация с увеличенным числом проведённых программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), большей продолжительностью бесплодия, повышенным числом потерь беременности в анамнезе, необходимостью применения более высокой суммарной дозы экзогенного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), сниженным количеством отпунктированных фолликулов, а также с повышенной частотой анеуплоидий у эмбрионов.

Носительство аллелей *A/G* и *G/G* гена *MTR 275A>G* статистически значимо ассоциировано с большим количеством программ ВРТ, длительностью бесплодия, количеством беременностей, количеством неразвивающихся беременностей/выкидышей, количеством отпунктированных фолликулов, количеством полученных ооцитов, количеством зрелых ооцитов, частотой оплодотворения, количеством бластоцист.

Не было выявлено статистически значимых отличий в частоте наступления беременности в зависимости от носительства полиморфизмов генов фолатного обмена, как и от количества полиморфизмов,  $p > 0,05$ . Это связано с тем, что проводился перенос только исследованных эуплоидных эмбрионов. Вместе с тем, частота анеуплоидии коррелировала с количеством полиморфизмов,  $r = 0,169$ ,  $p = 0,056$ . На рисунке 30 представлена частота анеуплоидии в зависимости от количества полиморфизмов генов фолатного обмена у женщины [167].



Рисунок 30 – Частота анеуплоидии в зависимости от количества полиморфизмов генов фолатного обмена у женщины

Таким образом, носительство неблагоприятных аллелей генов фолатного обмена ассоциировано с большим количеством программ ВРТ, отягощенным акушерским анамнезом по потерям беременности, выраженным хроническим эндометритом, меньшим количеством полученных яйцеклеток, количеством зрелых яйцеклеток, низкой частотой оплодотворения, меньшим количеством бластоцист.

### **3.3 Полиморфизмы FSHR и их влияние на эффективность программ** *Популяционное исследование*

В таблице 6 представлены полиморфизмы, указан идентификатор (SNP Identifier), расположение полиморфизма на хромосоме - физическое расстояние в спаренных основаниях (base-pair position - bp).

Таблица 6 – Генетические характеристики полиморфизмов гена FSHR

Название гена	Хромосома	rs	Позиция
FSHR	2	rs6166	48962782
		rs6165	48963902

Таблица 7 – Частоты аллелей и генотипов SNP полиморфизмов гена FSHR в казахской популяции

Название гена	rs	MAF	N	A1	A2	GENO
FSHR	rs6166	0,45	1989	G	A	601/986/402
	rs6165	0,4523	1990	G	A	593/994/403

Примечания:

1. rs идентификатор полиморфизма (SNP Identifier).
2. MAE частота минорного аллеля.
3. N - число прогенотипированных.
4. A1 аллель дикого типа и A2 минорный аллель.
5. GENO – число выявленных генотипов

Как видно из таблицы 7, частоты минорных аллелей в исследуемой выборке казахов для полиморфизмов rs6166 и rs6165 гена FSHR составляет 45%.

В таблице 8 приведены частоты аллелей и генотипов SNP полиморфизмов *rs6166* и *rs6165* гена FSHR в казахской популяции.

Таблица 8 – Частоты аллелей и генотипов SNP полиморфизмов гена FSHR в казахской популяции

Локус	Генотипы, аллели	n	Частота, %
<i>rs6166</i>	GG	601	30.22
	GA	986	49.57
	AA	402	20.21
	Всего	1989	100
	G	601	30.22
	A	1388	69.78
	Всего	1989	100
Локус <i>rs6166</i>	Генотипы, аллели	n	Частота, %
	GA	994	49,95
	AA	403	20,25
	Всего	1990	100
	G	593	29,8
	A	1397	70,2
	Всего	1990	100

При проведении генетических исследований с целью изучения вклада конкретных генетических вариантов в развитие определенного признака или

заболевания важно учитывать ряд факторов для обеспечения точности и достоверности полученных результатов. Одним из ключевых факторов, влияющих на интерпретацию генетических ассоциаций, является феномен неравновесного сцепления. Неравновесное сцепление (linkage disequilibrium, LD) представляет собой неслучайное сочетание частот аллелей различных локусов. Подобное распределение может возникать не только вследствие физической близости генов на хромосоме, но также быть обусловлено селективным преимуществом определённых аллельных комбинаций, которые передаются совместно чаще, чем это ожидалось бы при случайном распределении аллелей [166]. Коэффициенты сцепления в казахской популяции полиморфизмов *rs6165* и *rs6166* представлены в таблице 9.

LD между парами SNP измеряли с использованием абсолютного значения Левонтина ( $D'$ ) и коэффициента корреляции Пирсона  $r$ , где в большой выборке абсолютное значение  $D'=1$  и  $r^2=1$  отражает полное сцепление, а 0 соответствует состоянию полного равновесия. Программа PLINK использовалась для получения параметра LD для казахской популяции [168]. Пары SNP были классифицированы как находящиеся в высоком LD, где значение  $D'$  и  $r^2$  было 20,9 ( $p>0,05$  – значимых различий не обнаружено).

Высокое значение LD предполагает, что существует сильная ассоциация между двумя SNP, которая может быть обусловлена физической близостью (1120 bp) или тем, что они функционально связаны.

Таблица 9 – Информация о LD для пары SNP *rs6166* и *rs6165* по данным биобанка ДНК «Мирас»

Гаплотип <i>rs6166</i> и <i>rs6165</i>	Наблюдаема частота гаплотипов	Ожидание равновесного сцепления (LE)
	0,447	0,204
<i>G1A2</i>	0,004	0,246
<i>A1G2</i>	0,006	0,249
<i>G1G2</i>	0,544	0,301
Коэффициенты неравновесного сцепления генов (LD)		
$D'=0,962$	$D'=0,986$	$p>0,05$

По данным The International Genome Sample Resource (IGSR) аллели полиморфизмов *rs6166* и *rs6165* гена FSHR для популяций Европы, Восточной Азии и Южной Азии так же находятся в тесном генетическом сцеплении ( $D'$  и  $r^2$  20,9) [169]. Одновременно можно заметить, что для групп населения африканского происхождения коэффициент корреляции Пирсона  $r^2$  демонстрирует диапазон колебаний от 0,07 до 0,20, что указывает на низкую степень LD ( $p<0,05$ ) [170].

Однако, чтобы правильно интерпретировать обнаруженные ассоциации, важно иметь хорошее представление о популяционной генетике и основополагающих принципах, которые управляют тем, как генетическая изменчивость поддерживается и распределяется в популяциях. Закон Харди-Вайнберга – это фундаментальный принцип популяционной генетики, который

описывает взаимосвязь между частотами аллелей и генотипов в большой популяции, скрещивающейся случайным образом, на которую не влияют мутации, миграция, отбор или генетический дрейф [170, p. 516-530].

Этот закон полезен в медико-генетических исследованиях, поскольку он обеспечивает основу для понимания того, как частота определенного гена или признака меняется в популяции от поколения к поколению. Согласно закону Харди-Вайнберга соотношение гомозигот и гетерозигот можно предсказать на основе частоты аллелей в популяции. Соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга представлено в таблице 10.

Для полиморфизмов *rs6166* и *rs6165* гена *FSHR* распределение генотипов находится в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ( $p > 0,05$ ).

Был проведен сравнительный анализ аллельных частот двух изученных полиморфизмов гена *FSHR* в казахстанской популяции с частотами, наблюдаемыми в популяциях по всему миру (таблица 11). Изучение генетической изменчивости среди различных популяций имеет исключительное значение, поскольку оно позволяет получить ценную информацию об эволюционных и миграционных процессах различных популяций.

Таблица 10 – Соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга полиморфизмов гена *FSHR* в казахской популяции по данным биобанка ДНК «Мирас»

Название гена	rs	N	GENO	O(НЕТ)	E(НЕТ)	N
<i>FSHR</i>	<i>rs6166</i> 2	1989	601/986/402	0,4957	0,495	0,9639
	<i>rs6166</i> 1	132	31/49/52	0,37	-	-
	<i>rs6165</i> 2	1990	593/994/403	0,4995	0,4954	0,7514
	<i>rs6165</i> 1	132	31/49/52	-	-	-

Примечания:

1. rs – идентификатор однонуклеотидного полиморфизма (SNP ID, Single Nucleotide Polymorphism Identifier).
2. MAF (Minor Allele Frequency) – частота минорного (реже встречающегося) аллеля.
3. N – общее количество проанализированных (прогенотипированных) образцов.
4. GENO – общее число зарегистрированных генотипов.
5. O (НЕТ) – ожидаемая частота гетерозигот по закону Харди–Вайнберга.
6. E (НЕТ) – наблюдаемая частота гетерозигот по закону Харди–Вайнберга.
7. p – уровень статистической значимости отклонений от равновесия Харди–Вайнберга

Таблица 11 – Сравнение частот распространенности полиморфизмов гена *FSHR* в казахской популяции с бесплодием и здоровых

Ген (SNP)	Генотипы	Основная группа		Популяционный контроль		X <sup>2</sup>	p-Value
		N=150	%	N=1990	%		
<i>FSHR</i> <i>rs 6165</i> <i>Thr 307Ala</i> <i>307 G&gt;A</i>	G/G	60	40	593	29,8	6,373	0,0116
	A/G	54	36	994	49,95	10,31	0,0013
	A/A	36	24	403	20,25	0,983	0,3214
	Всего	150	100	1990	100	-	-

Продолжение таблицы 11

Ген (SNP)	Генотипы	N=150	%	N=1989	%	X <sup>2</sup>	p-Value
<i>FSHR</i> <i>rs 6166</i> <i>Asn680Ser</i> <i>680 A&gt;G</i>	A/A	57	38	601	30,22	3,627	0,0569
	A/G	54	36	986	49,57	9,713	0,0018
	G/G	39	26	402	20,21	2,524	0,1122
	Всего	150	100	1989	100		

Из таблицы 11 видно, что частота носительства неблагоприятных аллелей в группе бесплодия статистически значимо не отличалась от общей казахской популяции,  $p > 0,05$ .

Частота носительства минорного аллеля для полиморфизмов *rs6166* и *rs6165* гена *FSHR* в казахской популяции достоверно не отличается от аналогичного показателя популяций Европы и Южной Азии ( $p > 0,05$ ), но достоверно превышала его частоту в популяциях Восточной Азии ( $p < 0,001$ ), таблица 12.

Таблица 12 – Сравнительный анализ аллельных частот 2 исследуемых полиморфизмов гена *FSHR* в казахской популяции по данным биобанка ДНК «Мирас» с популяциями мира

Популяция	N	MAF	$\chi^2$	p
<b>FSHR (rs6166)</b>				
Казахстан	1989	0,45	-	-
Европа	503	0,449	0,001	0,979
Восточная Азия	504	0,322	27,207	<0,001
Южная Азия	489	0,445	0,028	0,869
<b>FSHR (rs6165)</b>				
Казахстан	1990	0,4523	-	-
Европа	503	0,451	0,002	0,969
Восточная Азия	504	0,340	20,949	
Южная Азия	489	0,456	0,023	0,881
Примечания:				
1. N – количество исследованных образцов донорских яйцеклеток (ДЯ).				
2. MAF – частота минорного (реже встречающегося) аллеля.				
3. $\chi^2$ – значение критерия хи-квадрат.				
4. p – уровень статистической значимости.				
5. Различия считались статистически достоверными при значении $p < 0,05$ .				
6. Составлено по источнику [170]				

Формирование генетической структуры этноса происходит в результате сложного взаимодействия исторических, социально-демографических, миграционных, религиозных, климатических и прочих факторов, приводящих к отбору отдельных вариантов генов для каждой популяции.

*Влияние носительства аллелей и генотипов полиморфизмов rs6166 и 136165 гена FSHR в казахской популяции на результаты программ ВРТ*

При проведении одномерного анализа дисперсии дней стимуляции, суммарной дозы экзогенного ФСГ, количества полученных яйцеклеток, количества зрелых яйцеклеток в зависимости от носительства генов и аллелей рецепторов ФСГ статистически значимых различий найдено не было, данные представлены в таблицах 13, 14, 15, 16.

Таблица 13 – Зависимость суммарной дозы ФСГ от носительства генов РФСГ

Источник	Сумма квадратов типа III	ст.св.	Средний квадрат	F	знач.	Частичная эта-квadrat
1	2	3	4	5	6	7
Скорректированная модель	1053061,177 <sup>a</sup>	3	351020,392	0,546	0,653	0,034
Свободный член	198278891,57	1	198278891,576	308,289	<,001	0,870
<i>rs6165FSHR</i>	146157,853	1	146157,853	0,227	0,636	0,005
<i>rs6166FSHR</i>	203789,474	1	203789,474	0,317	0,576	0,007
<i>rs6165FSHR</i> * <i>rs6166FSHR</i>	0,000	0	.	.	.	0,000
ошибка	29585281,943	46	643158,303	-	-	-
Всего	382357194,00	50	-	-	-	-
Скорректированный итог	30638343,120	49	-	-	-	-

Примечание – <sup>a</sup> – R-квадрат = 0,034 (Скорректированный R-квадрат = -0,029)

Таблица 14 – Зависимость дней стимуляции от носительства генов FSHR

Источник	Сумма квадратов типа III	ст.св.	Средний квадрат	F	знач.	Частичная эта-квadrat
Скорректированная модель	4,538 <sup>a</sup>	3	1,513	0,351	0,788	0,022
Свободный член	2988,821	1	2988,821	694,506	<,001	0,938
<i>rs6165FSHR</i>	0,923	1	0,923	0,214	0,645	0,005
<i>rs6166FSHR</i>	1,516	1	1,516	0,352	0,556	0,008
<i>rs6165FSHR</i> <i>rs6166FSHR</i>	0,000	0	.	.	.	0,000
ошибка	197,962	46	4,304	-	-	-
Всего	5507,000	50	-	-	-	-
Скорректированный итог	202,500	49	-	-	-	-

Примечание – <sup>a</sup> – R-квадрат = 0,022 (Скорректированный R-квадрат = -0,041)

Таблица 15. Зависимость количества полученных ооцитов от носительства генов РФСГ

Источник	Сумма квадратов типа III	ст.св.	Средний квадрат	F	знач.	Частичная эта-квadrat
Скорректированная модель	180,801 <sup>a</sup>	3	60,267	1,371	,263	0,082

Продолжение таблицы 15

Свободный член	4428,325	1	4428,325	100,758	<,001	0,687
rs6165FSHR	108,333	1	108,333	2,465	0,123	0,051
rs6166FSHR	151,579	1	151,579	3,449	0,070	0,070
rs6165FSHR rs6166FSHR	0,000	0	.	.	.	0,000
ошибка	2021,699	46	43,950	-	-	-
Всего	8143,000	50	-	-	-	-
Скорректированный итог	2202,500	49	-	-	-	-
Примечание – <sup>a</sup> – R-квадрат = 0,082 (Скорректированный R-квадрат = 0,022)						

Таблица 16 – Зависимость количества полученных зрелых ооцитов от носительства генов РФСГ

Источник	Сумма квадратов типа III	ст.св.	Средний квадрат	F	знач.	Частичная эта-квadrat
Скорректированная модель	111,855 <sup>a</sup>	3	37,285	1,327	,277	0,080
Свободный член	3131,099	1	3131,099	111,404	<,001	0,708
rs6165FSHR	92,308	1	92,308	3,284	0,076	0,067
rs6166FSHR	107,379	1	107,379	3,821	0,057	0,077
rs6165FSHR rs6166FSHR	0,000	0	.	.	.	0,000
ошибка	1292,865	46	28,106	-	-	-
Всего	5600,000	50	-	-	-	-
Скорректирован ный итог	1404,720	49	-	-	-	-
Примечание – <sup>a</sup> – R-квадрат = 0,080 (Скорректированный R-квадрат = 0,020)						

Учитывая данные представленные в таблицах 13-16, демонстрирующих отсутствие взаимосвязи носительства вариантов генов и аллелей рецепторов ФСГ *rs6165FSHR* и *rs6166FSHR* у пациенток казахской популяции, высокую стоимость анализа, можно считать рутинное использование данных тестов не обоснованным.

### 3.4 Морфология и морфокинетика эмбрионов

Морфологическая структура всех включенных в исследование эмбрионов 5-6 дня (в основной группе – 387 бластоцист, в группе сравнения – 695) была оценена на момент заморозки по Гарднеру [96, р. 367-381]. Эмбрионы 5-6 дня были разделены по размеру, качеству внутриклеточной массы и трофэктодермы. Для удобства проведения анализа решено было разделить эмбрионы 5-6 дня в зависимости от их морфологической оценки на группы. В литературе нет единой классификации эмбрионов на «отличные» или «плохие», разные авторы по-разному делят бластоцисты по их морфологической оценке: на 4 группы – отличные, хорошие, средние и плохие (неклассифицированные) [163, р. 989-

1034], на 3 группы – хорошие, средние и плохие [172], некоторые считают бластоцисты высокого качества, если оценка по Гарднеру  $\geq 3\text{BB}$  [173, 174], другие авторы – если оценка  $\geq 4\text{BB}$  [173, р. 705-707]. Учитывая данные литературы, бластоцисты в исследуемых группах были разделены на 3 группы по их морфологической характеристике: хорошие – 3-6 AA, AB и BA; средние – 3-6 BB; плохие – 2-6 BC, CB, AC, CA. В таблице 17 представлены данные по группам эмбрионов в исследуемых группах.

Таблица 17 – Морфологическое качество эмбрионов

Качество эмбрионов	Основная группа, n=387	Группа сравнения, n=695	p-Value
Хорошие – 3-6 AA, AB и BA*	144 (37,21%)	309 (44,46%)	p=0,021
Средние – 2-6 BB	103 (26,61%)	181 (26,04%)	p=0,838
Плохие – 2-6 BC, CB*	140 (36,18%)	205 (29,5%)	p=0,024
* – Представлены абсолютные числа и проценты			

При проведении анализа данных, приведенных в таблице 17, выявлено, что эмбрионы хорошего качества встречались в 37,21% в основной группе и в 44,46% случаев в группе сравнения, p=0,021. Достоверная разница не выявлена в количестве эмбрионов среднего качества, в основной группе – 26,61% и 26,04%, p=0,838. Количество эмбрионов плохого качества достоверно часто наблюдалось в основной группе – 36,18%, в группе сравнения – 29,5%, p=0,024.

Расчет относительного риска показал, что у женщин старшего репродуктивного возраста риск получения эмбрионов хорошего морфологического качества выше на 16,3% (RR = 0,837; 95% ДИ 0,718–0,976), и на 22,6% выше риск получения эмбрионов низкого качества (RR = 1,226; 95% ДИ 1,029–1,446).

Таким образом, выявлены достоверные различия в исследуемых группах по морфологическому качеству полученных эмбрионов 5-6 дня: у пациенток старшего репродуктивного возраста реже наблюдаются эмбрионы хорошего морфологического качества и чаще – плохого качества.

С целью изучения влияния морфологического качества эмбрионов 5-6 дня (оценка по Гарднеру) на частоту наступления беременности в исследуемых группах пациенток была проанализирована частота клинической беременности в 3 группах эмбрионов: с хорошей, средней и плохой оценкой по Гарднеру.

Таблица 18 – Частота наступления беременности в зависимости от морфологического качества эмбриона и возраста женщины

Качество эмбрионов	Основная группа $\geq 35$ лет, n=387	Группа сравнения $< 35$ лет, n=695	p
Хорошие	55,56% (80 из 144)	63,1% (195 из 309)	0,126
Средние	48,54% (50 из 103)	55,8% (101 из 181)	0,239
Плохие	24,28% (34 из 140)	45,36% (93 из 205)	<0,001

При анализе данных, представленных в таблице 18, выявлено, что частота наступления беременности в основной группе статистически не отличалась у эмбрионов хорошего качества и среднего качества, они имплантировались в 55,56%, и в 48,54%, соответственно. Эмбрионы плохого морфологического качества имплантировались реже всего, 24,28%,  $p < 0,05$ .

В группе сравнения эмбрионы хорошего качества имплантировались в 63,1% (195 из 309), среднего качества – в 55,8% (101 из 181), и низкого качества – 45,36% (93 из 205).

В обеих группах эмбрионы низкого качества давали беременность статистически значимо реже.

Так же у женщин  $\geq 35$  лет эмбрионы низкого качества давали беременность статистически значимо реже, 24,28% в основной группе и 45,36% в группе сравнения,  $p < 0,001$ .

Так же были проанализированы исходы беременности в группах (рисунок 31).

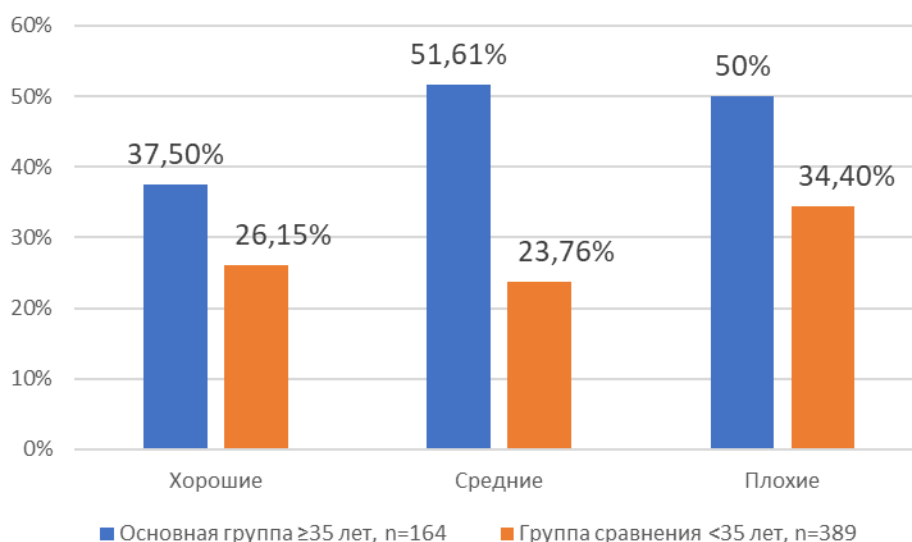


Рисунок 31 – Частота потери беременности в зависимости от морфологического качества эмбриона и возраста женщины

Потери беременности: биохимические беременности, неразвивающиеся беременности, самопроизвольные выкидыши, - наблюдались в обеих группах, с ухудшением качества эмбриона частота потерь беременности повышалась.

В основной группе после переноса эмбриона хорошего морфологического качества потери беременности случились в 37,5% (30 из 80), при переносе эмбриона среднего качества - 51,61% (48 из 93), низкого качества – 50% (17 из 34), имелась тенденция к статистической значимости  $p = 0,063$ .

В группе сравнения не было статистически значимой разницы в частоте потерь беременности при переносе эмбриона хорошего или среднего качества, 26,15% (51 из 195) и 23,76% (24 из 101), соответственно,  $p > 0,05$ . При переносе эмбрионов низкого качества каждая третья беременность прервалась – 34,4% (32 из 93),  $p = 0,041$ .

При сравнении частоты потери беременности между основной и группой сравнения выявлено, что статистически значимая разница наблюдалась только при переносе эмбрионов среднего качества 51,61% в основной группе против 23,76% в группе сравнения,  $p < 0,001$ . Тенденция к статистической разнице наблюдалась при переносе эмбрионов хорошего морфологического качества – 37,5% против 26,15% соответственно,  $p = 0,061$ . Перенос эмбрионов низкого морфологического качества в обеих группах одинаково часто заканчивался потерей беременности 50 и 34,4% соответственно.

Таким образом, возраст женщины влияет на качество эмбрионов, после 35 лет вероятность получения эмбрионов низкого морфологического качества выше, чем до 35 лет. Эмбрионы низкого морфологического качества у молодых женщин чаще имплантируются, чем в старшем репродуктивном возрасте. Вероятность имплантации и наступления беременности оказывается сопоставимой при переносе как морфологически «хороших», так и «субоптимальных» эмбрионов. Эмбрионы среднего качества имеют одинаковый потенциал имплантации с эмбрионами хорошего качества.

### 3.5 Влияние возраста на эмбриональное развитие и исходы ВРТ

Для определения вероятности наступления беременности в зависимости от возраста женщины и оценки морфокинетики эмбриона ИИ нами было построено дерево решений с помощью метода CHAID. В исследование было включено 431 перенос единственного эмбриона, культивировавшихся в инкубаторе MIRI® Time-Lapse Incubator и оцененные ИИ CHLOE™. В процессе проведения анализа женщины были поделены CHAID на 2 группы по возрасту  $\leq 35$  лет и  $< 35$  лет. В результате была получена следующая модель (рисунок 32). В полученном дереве решений наблюдались 6 терминальных узлов, характеристики которых представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Характеристика терминальных узлов дерева решений

Наличие факторов риска	Число пациентов		Отклик, %	Индекс, %
	всего	+рез-том		
Возраст женщины $\leq 35$ лет, оценка ИИ $> 9,4$	51	37	72,5	178,7
Возраст женщины $\leq 35$ лет, оценка ИИ 5,1-9,4	130	61	46,9	115,6
Возраст женщины $> 35$ лет, оценка ИИ $> 6,6$	101	47	46,5	114,6
Возраст женщины $\leq 35$ лет, оценка ИИ $\leq 5,1$	66	20	30,3	74,6
Возраст женщины $> 35$ лет, оценка ИИ $\leq 1,1$	19	5	26,3	64,8
Возраст женщины $> 35$ лет, оценка ИИ 1,1-6,6	64	5	7,8	19,2

Из рисунка 25 видно, что общая частота наступления беременности составила 40,6%. Женщин  $\geq 35$  лет вошло 247 (57,3%),  $> 35$  лет - 184 (42,7%).

Согласно представленным данным, у женщин до 35 лет частота наступления беременности колебалась от 30,3% до 72,5% в зависимости от оценки ИИ. Эмбрионы в этой группе разделились на 3 группы в зависимости от оценки ИИ  $\leq 5,1$  баллов, 5,1-9,4 балла и  $> 9,4$  балла. У женщин до 35 лет с оценкой эмбриона с

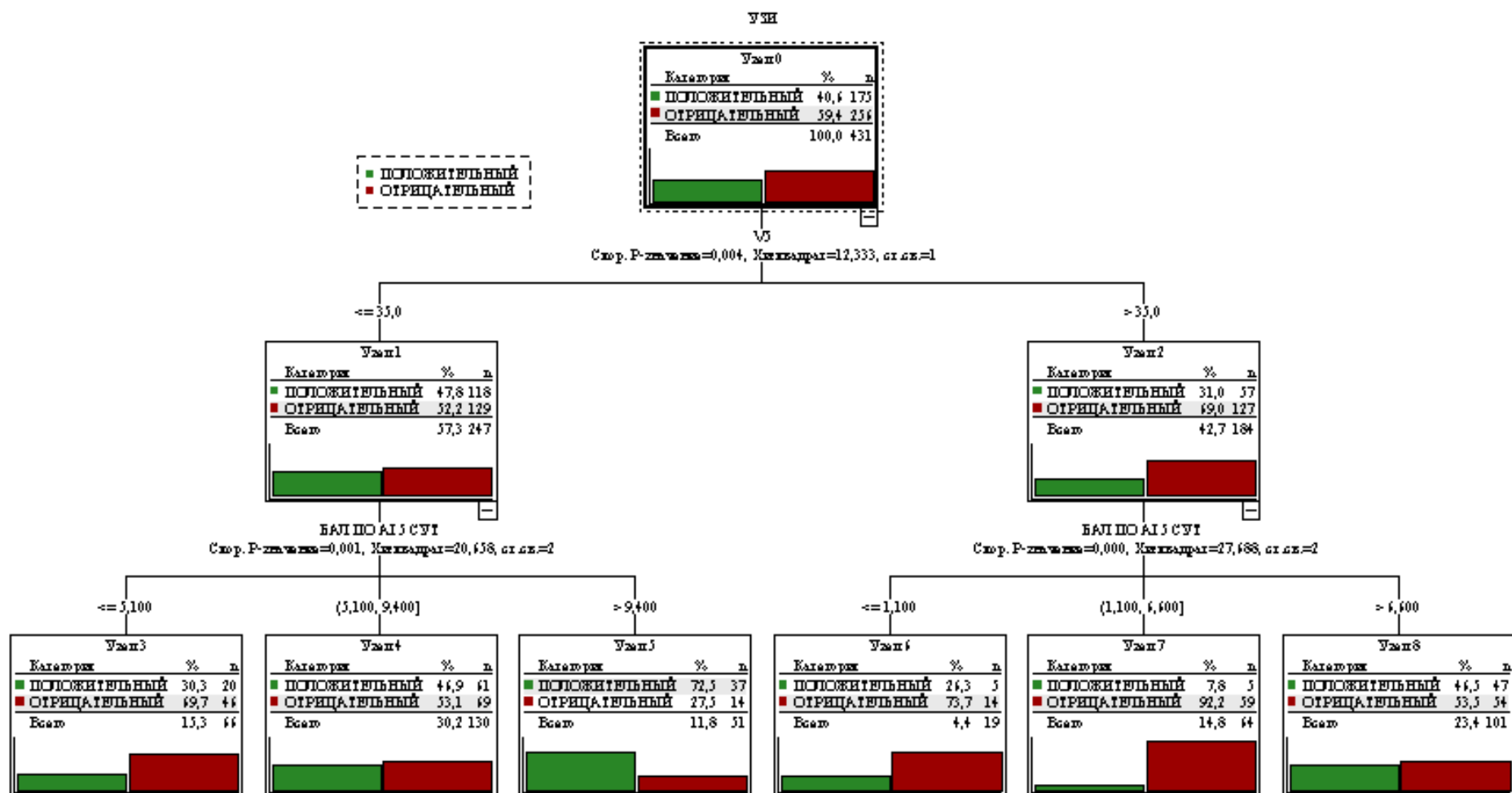


Рисунок 32 – Дерево решений зависимости наступления беременности от возраста и оценки ИИ эмбриона 5 дня

помощью ИИ на 5 сутки развития  $\leq 5,1$  баллов частота наступления беременности составила 30,3%, с оценкой эмбриона с помощью ИИ на 5 сутки развития 5,1-9,4 баллов – ЧНБ 46,9%, при оценке  $>9,4$  балла – ЧНБ 72,5% ( $p=0,01$ ).

У женщин старше 35 лет ЧНБ колебалась от 7,8% до 46,5%. Их эмбрионы поделились на 3 группы в зависимости от оценки ИИ:  $\leq 1,1$ ; 1,1-6,6 и  $>6,6$  баллов. При оценке эмбриона с помощью ИИ на 5 сутки развития  $\leq 1,1$  ЧНБ составляет 26,3%; при оценке эмбриона с помощью ИИ на 5 сутки развития 1,1-6,6 ЧНБ составила 7,8%, при оценке эмбриона  $>6,6$  ЧНБ составляет 41,3% ( $p<0,001$ ).

Из рисунка 32 видно, что при переносе эмбриона с высокой оценкой ИИ ЧНБ значительно увеличивалась: до 35 лет в 2,4 раза, после 35 лет – в 1,7 раза.

Чувствительность полученной модели составила 94,5%, специфичность – 21,1%. Общий процент верно предсказанных значений зависимой переменной –  $64,7 \pm 2,3\%$ .

Таким образом, из представленных данных видно, что оценка морфокинетики эмбрионов имеет большое значение для прогнозирования исхода программ ВРТ. К эмбрионам женщин 35 лет и старше предъявляются более жесткие требования. При получении эмбрионов с высокой оценкой ИИ на 5 сутки развития шанс беременности не зависит от возраста [176].

### 3.7 Генетические характеристики эмбрионов

С целью изучения особенностей генетической характеристики эмбрионов 5-6 дня женщин старшего репродуктивного возраста, полученным в результате программ ЭКО, был проведен преимплантационный генетический скрининг методом аСГН.

На рисунке 33 представлена генетическая структура эмбрионов женщин старшего репродуктивного возраста по результатам исследования методом аСГН.

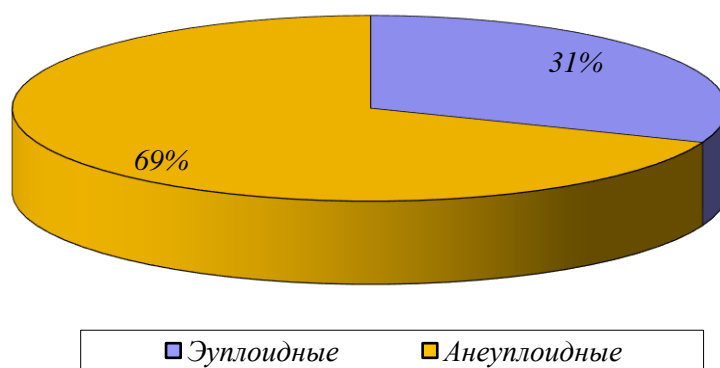


Рисунок 33 – Генетическая характеристика эмбрионов женщин старшего репродуктивного возраста

В исследование было включено 262 эмбриона на 5-6-й день развития, которые подвергались анализу методом сравнительной геномной гибридизации

(aCGH). По результатам скрининга 181 эмбрион (69%) пациенток старшего репродуктивного возраста был выявлен с хромосомными аномалиями, тогда как 81 эмбрион (31%) имел нормальный (эуплоидный) кариотип. Полученные данные коррелируют с опубликованными в литературе наблюдениями, свидетельствующими о возрастании частоты анеуплоидий у ооцитов у женщин старше 35 лет, что обусловлено накоплением мейотических ошибок [177, 178], что приводит к нарушению процессов оплодотворения и получению генетически аномальных эмбрионов. В результате исследования эмбрионов методом aCGH были выявлены различные аномалии: количественные аномалии соматических хромосом – моносомии, трисомии, нульсомии; структурные перестройки – делеции, дупликации; смешанные – количественные+структурные; аномалии половых хромосом.

Особенности выявленных генетических патологий представлены на рисунке 34.

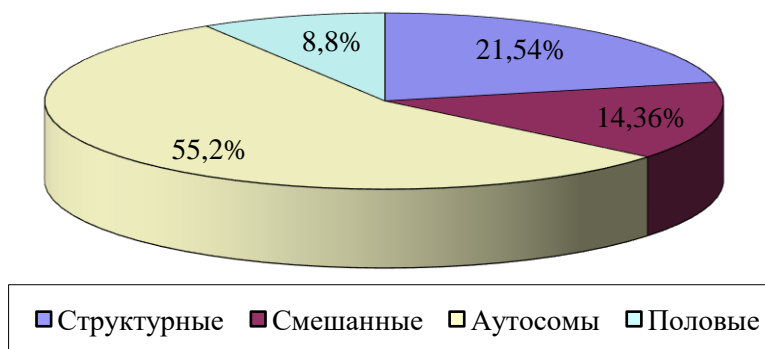


Рисунок 34 – Характеристика генетических патологий эмбрионов по результатам aCGH

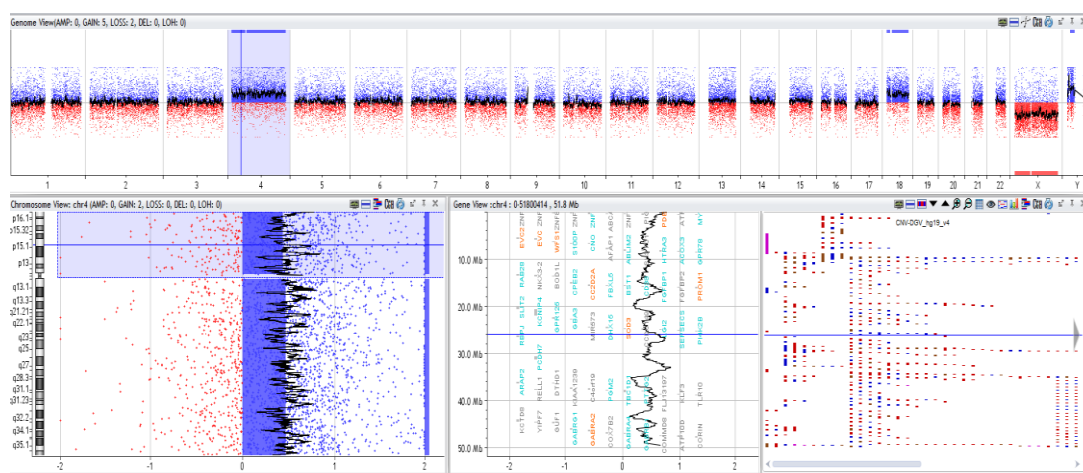


Рисунок 35 – Пример результата ПГС – трисомия по 18 и 4 парам хромосом

В соответствии с рисунком 35, при проведении преимплантационного генетического скрининга методом aCGH эмбрионов 5-6 дня женщин старшего репродуктивного возраста выявлены следующие несбалансированные

хромосомные аномалии: в 55,2% случаев наблюдались аутосомные аномалии – нарушение количества аутосом; в 21,54% эмбрионов были определены структурные перестройки – делеции, дупликации; в 14,36% - смешанные изменения (рисунок 36), т.е. количественные и качественные аномалии; в 8,8% изменения коснулись половых хромосом – выявлены были синдром Шерешевского-Тернера, синдром Клайнфельтера (рисунок 37), трисомия X хромосомы, нульсомии половых хромосом.

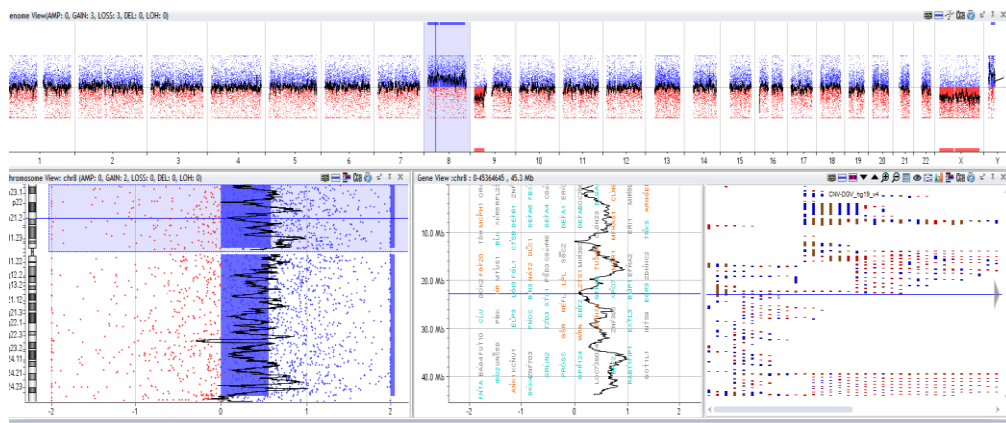


Рисунок 36 – Пример результата ПГС – смешанная патология (трисомия 8 пары хромосом и делеция короткого плеча 9 хромосомы)



Рисунок 37 – Пример результата ПГС -47XXY

Преобладание аутосомной патологии согласуется с литературными данными [79, р. 893-898; 80, р. 170-1-170-13], так как нарушения мейоза в ооците приводит к нарушению процессов расхождения именно аутосом, причем чаще мелких пар – 8,9,10,13,14,15,18, 20,21,22 пары хромосом: моносомии составили 40,8%, трисомии 36,7%, множественные смешанные – 22,5%.

Полученные нами данные показали, что только треть (31%) эмбрионов женщин старшего репродуктивного возраста имеют нормальный набор хромосом, то есть способны привести к имплантации и рождению здорового ребенка. Перенос же аномальных эмбрионов не привел бы к наступлению беременности, или беременность могла закончиться самопроизвольным абортom, или бы ребенок мог иметь хромосомную патологию.

Полученные нами данные частоты анеуплоидии (69%) согласуются с исследованиями зарубежных коллег. В работе Hsiao-Ling Lee et al. [179] частота

анеуплоидии составила 74,3%, в данное исследование были включены женщины 40-43 лет. В работе Antonio Capalbo [124, p. 1173-1180] частота анеуплоидии оставила 55,5%, но возраст женщин, включенных в исследование, колебался 24-44 лет. Учитывая возраст пациенток, включенных в наше исследование, 35-46 лет, частота анеуплоидии укладывается в интервал 55-74%.

Так как в литературе нет точных данных о взаимосвязи морфологической оценки бластоцисты и ее генетической характеристики, был проведен анализ исследованных бластоцист, с целью выявить связь между морфологией эмбриона и его плоидностью. В таблице 20 приведены данные о морфологической оценке исследованных аСГН бластоцист.

Таблица 20 – Морфологическая оценка эмбрионов основной группы, исследованных методом аСГН

Качество эмбрионов	Эуплоидные эмбрионы, n=81	Анеуплоидные эмбрионы, n= 181	p-Value
Хорошие – 3-6 АА, АВ и ВА*	24 (29,6%)	49 (27,1%)	$\chi^2=0,182$ $p=0,669$
Средние – 2-6 ВВ	36 (44,4%)	71 (39,2%)	$\chi^2=0,630$ $p=0,427$
Плохие - 2-6 ВС, СВ*	21( 26%)	61 (33,7%)	$\chi^2=1,573$ $p=0,209$
* – Представлены абсолютные числа и проценты			

Среди эмбрионов хорошего морфологического качества, таблица 20, с оценкой по Гарднеру 3-6 АА, АВ и ВА, в 29,6% наблюдались эуплоидные эмбрионы и в 27,1% - аномальные эмбрионы,  $p=0,669$ . Эмбрионы среднего качества, с оценкой по Гарднеру 2-6 ВВ, в 44,4% были эуплоидными и в 39,2% анеуплоидными,  $p=0,427$ . 26% плохих по морфологическому качеству эмбрионов, с оценкой по Гарднеру 2-6 ВС, СВ, были признаны эуплоидными, и 33,7% - анеуплоидными,  $p=0,209$ , таблица 20.

По данным, представленным в таблице 20, не выявлено достоверной разницы в морфологической оценке эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов, что так же подтверждается литературными данными [177, p. a023119; 180, 181].

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что у пациенток старшего репродуктивного возраста, особенно старше 40 лет, морфологической характеристики бластоцист на 5–6 сутки развития недостаточно для обоснованного выбора эмбриона для переноса в полость матки. Даже эмбрионы, демонстрирующие высокие морфологические показатели по критериям Гарднера (например, 5АА), нередко оказываются анеуплоидными по результатам преимплантационного генетического тестирования. Это указывает на их неспособность к имплантации, нормальному развитию беременности и рождению здорового ребёнка, несмотря на внешне благоприятную морфологическую оценку.

Количество и качество яйцеклеток снижается с увеличением возраста женщины, в связи с чем увеличивается количество аномальных эмбрионов. Для

выявления зависимости количества эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов от возраста женщины был проведен корреляционный анализ.

Наибольшее количество эмбрионов, пригодных для проведения преимплантационного генетического скрининга, получено у женщин до 41 года включительно. С 42 лет отмечается резкое снижение общего количества эмбрионов 5-6 дня, пригодных для исследования, и доля эуплоидных эмбрионов, что подтверждается многочисленными литературными данными [121, р. 718-723; 122, р. 146-149; 123, р. 1377-1383; 124, р. 1173-1180; 125, р. 1377-1380; 126, р. 95-101; 127, р. 685]. Сильная отрицательная корреляционная связь была получена между возрастом женщины и количеством эмбрионов, пригодных для исследования,  $r=-0,705$ ; возрастом женщины и количеством эуплоидных эмбрионов,  $r=-0,797$ , что согласуется с литературными данными. Достоверно большее количество эуплоидных эмбрионов выявлена только у женщин 35 лет, 19,7% - эуплоидных, 9,9% - анеуплоидных эмбрионов,  $p=0,030$ , что также согласуется с литературными данными. С увеличением возраста женщины, после 36 лет разницы в доли эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов не выявлено.

Таким образом, можно заключить, что с увеличением возраста женщины уменьшается количество эмбрионов, получаемых в программах экстракорпорального оплодотворения и пригодных для проведения преимплантационного генетического скрининга, уменьшается количество эуплоидных эмбрионов, что повышает риск неудачных попыток ЭКО, потерь беременности или рождения ребёнка с хромосомными аномалиями.

### 3.7 Полость матки и её влияние на имплантацию

Нами проведено ретроспективное сплошное поперечное исследование амбулаторных карт пациенток, которым была проведена гистероскопия с биопсией эндометрия, ИГХ [182].

Всего было проанализировано 569 протокола гистероскопии у 509 пациенток.

Пациентки были разделены на 2 группы: 1 группа до 34 лет, 2 группа – 35 лет и старше для выявления влияния возраста на частоту патологии полости матки. Характеристика групп представлена в таблице 21.

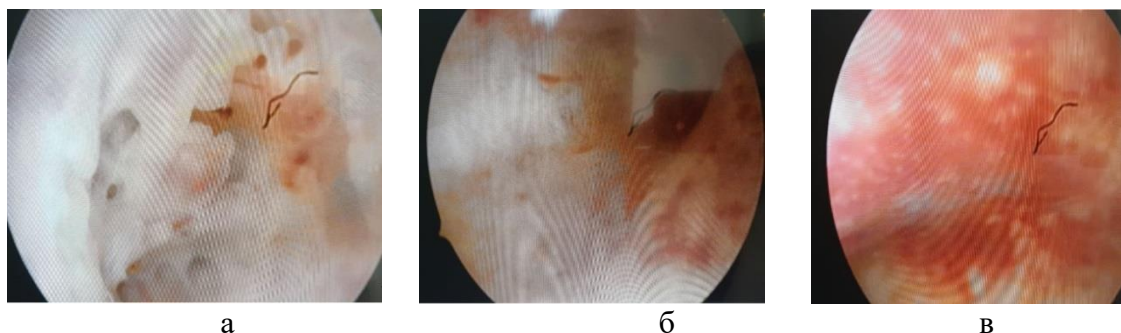
Таблица 21 – Характеристика пациенток, прошедших гистероскопию

Показатель	1 группа, $\geq 34$ лет	2 группа, $\leq 35$ лет	P Value
n	256	313	-
Возраст, лет*	$30,26 \pm 3,08$	$40,61 \pm 3,94$	-
Первичное бесплодие, %	60,7	19,2	$p < 0,001$
Вторичное бесплодие, лет*	39,3	80,8	$p < 0,001$
* – представлено в виде M, средней			

Патология полости матки отсутствовала в 19,53% (n=50) случаев в 1 группе и в 14,64% (n=46) – во второй группе,  $p > 0,05$ .

Хронический эндометрит был выявлен в 80,47% в 1 группе и в 85,3% случаев во 2 группе,  $p > 0,05$ .

В ходе проведения офисной гистероскопии оценивали состояние эндометрия, соответствие фазе цикла. При наличии микрополипов, отека стромы, фокальной или диффузной гиперемии выставлялся диагноз хронического эндометрита, рисунок 38.



а – микрополипы; б – отек стромы эндометрия; в – диффузная гиперемия эндометрия

Рисунок 38 – Гистероскопическая картина хронического эндометрита

В зависимости от экспрессии иммунокомпетентных клеток в эндометрии степень выраженности была разделена на 3 степени:

- слабо выраженный хронический эндометрит до 6 CD138 клеток в поле зрения;
- умеренно выраженный хронический эндометрит до 15 CD138 клеток в поле зрения;
- выраженный хронический эндометрит 16 и более CD138 клеток в поле зрения.

Распределение частоты различных степеней хронического эндометрита в исследуемых группах представлено в таблице 22.

Таблица 22 – Частота различных степеней хронического эндометрита

Показатель	1 группа, $\geq 34$ лет	2 группа, $\leq 35$ лет	P Value
Норма, %	19,53	14,64	$p > 0,05$
Слабо выраженный ХЭ, %	49,51	41,57	$p = 0,074$
Умеренно выраженный ХЭ, %	44,17	45,69	$p > 0,05$
Выраженный ХЭ, %	6,3	12,74	$p = 0,021$

Как видно из таблицы 22 статистически значимой разницы в частоте отсутствия патологии эндометрия, слабо выраженного и умеренно выраженного хронического эндометрита не было выявлено. Вместе с тем, выраженный хронический эндометрит встречался статистически значимо чаще во 2 группе 12,73% против 6,3% в первой группе,  $p = 0,021$ . На рисунке 39 представлена иммуногистохимическая картина экспрессии клеток CD138+.

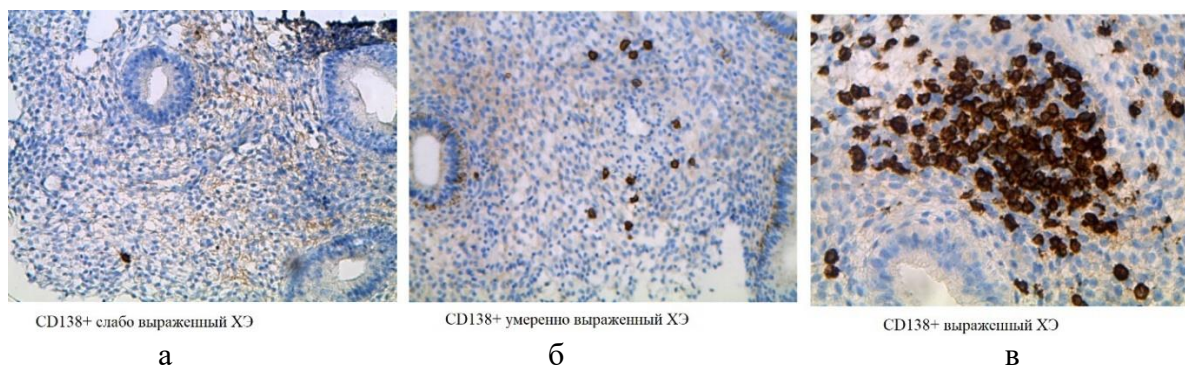


Рисунок 39 – Гистологическая картина хронического эндометрита

Примечание – Экспрессия клеток CD138+

Таблица 23 – Экспрессия CD138 при различных степенях выраженности хронического эндометрита.

Показатель	1 группа, $\geq 34$ лет	2 группа, $\leq 35$ лет	P Value
Слабо выраженный ХЭ	2,51 $\pm$ 1,78	2,67 $\pm$ 1,79	p>0,05
Умеренно выраженный ХЭ	9,01 $\pm$ 6,34	7,12 $\pm$ 3,67	p>0,05
Выраженный ХЭ	28,53 $\pm$ 19,09	28,41 $\pm$ 18,27	p>0,05
Примечание – Данные представлены в виде средней $\pm$ среднеквадратичное отклонение, M $\pm$ m количества клеток с экспрессией CD138 в поле зрения			

В соответствии с таблицей 23, проведенное нами исследование не выявило достоверной разницы в экспрессии клеток CD138 в группах с различной степенью выраженности хронического эндометрита.

Патология полости матки была представлена хроническим эндометритом, фиброзом или склерозом стромы эндометрия, лимфо-моноцитарной инфильтрацией, полипами, гипоплазией эндометрия, гиперплазией эндометрия, а так же сочетанием нескольких патологий. В таблице 24 представлена частота встречаемости различной патологии по данным гистологического исследования биоптатов эндометрия.

Таблица 24 – Частота патологии эндометрия по данным гистологического исследования

Показатель	1 группа, $\geq 34$ лет, n=201	2 группа, $\leq 35$ лет, n=267	P Value
Фиброз/склероз стромы, %	40,29	33,33	p=0,122
Инфильтрация, %	3,4	5,61	p>0,05
Полип, %	1,99	3,74	p>0,05
Гиперплазия, %	1,49	0,37	p>0,05
Гипоплазия, %	1,49	2,99	p=0,288
Сочетание нескольких патологий, %	23,38	23,59	p>0,05

Как видно из таблицы 24, наиболее частой по распространенности патологией был фиброз или склероз стромы эндометрия, он встречался одинаково часто в обеих группах: в 40,29% в 1 группе и в 33,33% во второй

группе. Второй по распространённости была сочетанная патология – 23,38% и 23,59% соответственно, и представляла собой такие сочетания как фиброз+лимфо-моноцитарная инфильтрация 13,93% в 1 группе и 16,01% во второй группе; фиброз и гипоплазия эндометрия; фиброз и полип эндометрия.

Таким образом, из представленных данных видно, что патология эндометрия достаточно часто встречается у пациенток с бесплодием и не зависит от возраста женщины, однако выраженные формы хронического эндометрита достоверно чаще встречаются у пациенток старшего репродуктивного возраста. Игнорирование роли эндометрия в результативности программ ВРТ может приводить к проведению «напрасных» переносов эмбрионов в нерцептивную полость матки, увеличению расходов пациентов и сроков достижения желанной беременности. В связи с чем, пациенткам старшего репродуктивного возраста рекомендуется делать офисную гистероскопию до вступления в программу ВРТ [180].

### 3.8 Выбор протокола стимуляции и мониторинга: влияние на результат ВРТ

На рисунке 40 представлена корреляция уровня ФСГ и количества зрелых ооцитов, количества нормально оплодотворенных ооцитов, количества бластоцист, количества эмбрионов высокого качества, корреляция уровня ФСГ.

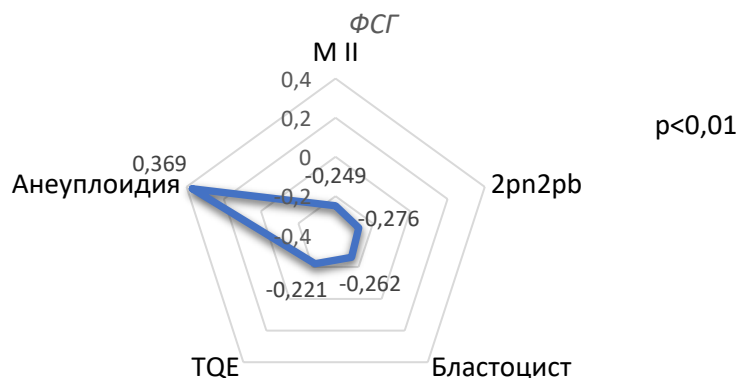


Рисунок 40 – Корреляция уровня ФСГ с эмбриологическими исходами ВРТ

Выявлена статистически значимая умеренная отрицательная корреляция уровня ФСГ и количества зрелых ооцитов ( $r=-0.249$ ,  $p=0.002$ ), количества нормально оплодотворенных ооцитов ( $r=-0.276$ ,  $p<0.001$ ), количества бластоцист ( $r=-0.262$ ,  $p<0.001$ ), количества эмбрионов высокого качества ( $r=-0.221$ ,  $p=0.007$ ). Статистически значимая умеренная положительная корреляция уровня ФСГ выявлена с частотой анеуплоидии эмбрионов.

Рандомизированное клиническое исследование [183] показало, что добавление препаратов ЛГ в схемы стимуляции у пациенток с неблагоприятным прогнозом исходов программы ВРТ повышает число полученных ооцитов, частоту наступления беременности, на примере комбинированного

рекомбинантного препарата ФСГ+ЛГ по сравнению с чистым рекомбинантным ФСГ.

Нами было проведено исследование зависимости получения общего числа ооцитов, зрелых ооцитов, эмбрионов хорошего качества от вида ЛГ – рекомбинантного или мочевого [184]. Результаты представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Эмбриологические исходы программ ВРТ в зависимости от типа экзогенного ЛГ

Показатель	Группа 1, n = 30	Группа 2, n = 30	P-Value
Общее количество ооцитов	8.86±5.14	11±8.89	0.835
Общее количество зрелых ооцитов (MII)	6.87±4.32	7.9± 7.81	0.908
Частота оплодотворения	5.5±3.52	6.1±6.19	0.993
Эмбрионы 3 дня развития (n)	5.4±3.57	5.97±6.08	0.935
Число бластоцист 5-6 дня развития	2.23±2.08	2.97±4.24	0.876
Количество эмбрионов высокого качества ( $\geq 3AB$ )	0.93±1.36	1.17±2.01	0.921

Как видно из таблицы 25, статистически значимой разницы эмбриологических исходов программ ВРТ в зависимости от типа экзогенного ЛГ выявлено не было.

### 3.9 Влияние образа жизни и веса на результат ВРТ

С целью выявления влияния ИМТ на результаты ВРТ проведен корреляционный анализ по Спирмену. ИМТ не влиял на суммарную дозу экзогенного ФСГ,  $r=0,114$ ,  $p=0,164$ . Вместе с тем, выявлена умеренная отрицательная корреляция ИМТ с количеством зрелых ооцитов,  $r=-0,347$ ,  $p<0,001$ ; количеством бластоцист,  $r=-0,448$ ,  $p<0,001$ ; частотой наступления беременности,  $r=-0,385$ ,  $p<0,001$ . Также слабая положительная корреляция выявлена между ИМТ и хроническим эндометритом ( $r=0,096$ ) и экспрессией CD138 ( $r=0,141$ ), рисунок 41.

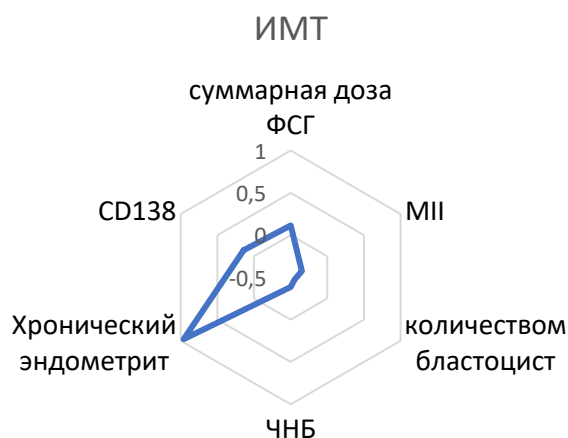


Рисунок 41 – Корреляция ИМТ и исходов ВРТ

## АЛГОРИТМ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК СТАРШЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Обследование и лечение проводилось за 1-2 месяца до программы ВРТ и включает в себя модификацию образа жизни, нормализацию ИМТ и нижеследующее [185]:

1. Подготовка к ВРТ: генотипирование на носительство полиморфизма аллелей генов и генотипов *rs1801133* и *rs1801131* гена *MTHFR*, *rs1805087* гена *MTR*, *rs1805087* гена *MTRR*. Генотипические дозы фолатов: группа высокого риска (гомозиготы и гетерозиготы по неблагоприятному аллелю гена *MTHFR*) - 5мг фолиевой кислоты, группа низкого риска (гомозиготам по благоприятному аллелю гена *MTHFR*) – 400мкг фолиевой кислоты. Носителям неблагоприятных аллелей генов *MTR* и *MTRR* дополнительно препараты витамина В12 – 2,6 мкг.

2. Гистероскопия с биопсией эндометрия+ИГХ, лечение хронического эндометрита.

3. Старт КОС при базальном уровне ФСГ  $\leq 9,3$  МЕ/л, включать препараты ЛГ. При базальном уровне ФСГ  $\geq 9,3$  МЕ/л назначение эстрогенового прайминга для снижения уровня ФСГ.

4. Культивирование эмбрионов в ТаймЛапс инкубаторе, оценка ИИ, отбор эмбрионов на ПГТ-А

5. Проведение ПГТ-А

6. Криоперенос эуплоидного эмбриона (рисунок 42), согласно приложению А.

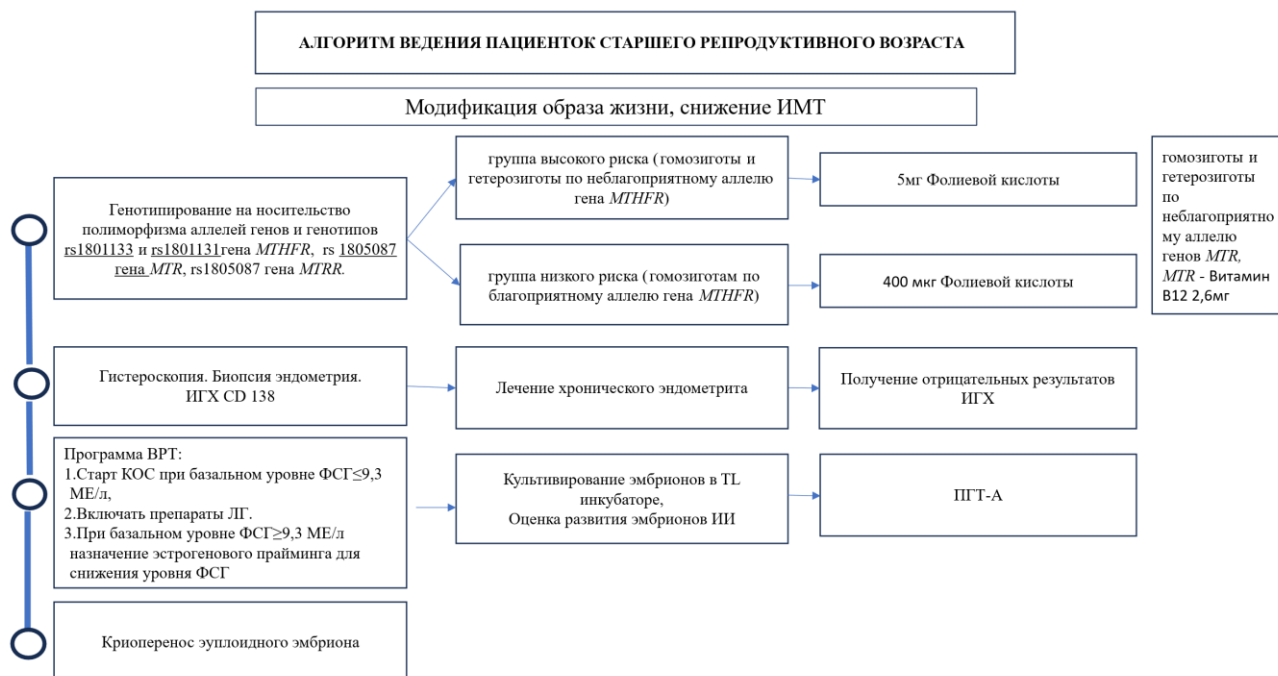


Рисунок 42 – Алгоритм ведения пациенток старшего репродуктивного возраста

С целью оценки эффективности алгоритма персонализированного ведения пациенток старшего репродуктивного возраста казахской популяции было проведено когортное проспективное исследование в период с января по декабрь 2023 года. В основную группу были включены 30 женщин, которым проводилась индивидуализированная предгравидарная подготовка. Контрольную группу составили 39 пациенток, получавших стандартное обследование и подготовку к программе ЭКО с последующим преимплантационным генетическим тестированием (ПЭ). Сравнительная характеристика исследуемых групп приведена в таблицах 26, 27, 28, 29, 30.

Пациентки основной группы получали рекомендации по модификации образа жизни: увеличение физической нагрузки, низкокалорийная средиземноморская диета.

Таблица 26 – Данные акушерско-гинекологического анамнеза в группах

Показатель	Основная группа, n=30	Контрольная группа, n=39	p-Value
Возраст, М±SD	38,8±2,9	37,56±2,57	p=0.749
Длительность бесплодия, М±SD	3,71±2,61	5,46±4,7	p=0.745
Бесплодие 1	11 (43,33%)	12 (30,77%)	p=0.282
Бесплодие 2	17 (56,67%)	27 (69,23%)	-
Количество беременностей, М±SD	1,29±1,46	1,2±1,36	p=0.964
Количество родов, М±SD	1,44±1,72	1,8±0,79	p=0.849
Количество аборт, М±SD	1,17±0,41	1	p>0,05
Количество выкидышей/замерших беременностей, М±SD	1	1,25±0,46	p>0,05
АМГ, нг/мл, М±SD	2,06±1,9	1,94±1,44	p=0.960
ФСГ, МЕ/л, М±SD	8,31±5,39	7,66±3,15	p=0,861

Как видно из таблицы 26, данные акушерско-гинекологического анамнеза в группах статистически значимо не отличались друг от друга.

Таблица 27 – Частоты аллелей и генотипов генов фолатного обмена

Ген (SNP)	Генотипы	Основная группа (n=30)		Популяционный контроль		p-Value
		n	%	n	%	
1	2	3	4	5	6	7
<i>MTHFR rs1801131</i> (1298 A>C)	A/A	16	53,33	179	59.1	p>0,05
	A/C	12	40	119	39.24	p>0,05
	C/C	2	6,67	5	1.66	p>0,05
Всего	-	30	100	303*	100	p>0,05
<i>MTHFR rs1801133</i> (677C>T)	C/C	15	50	110	55.5	p>0,05
	C/T	13	43,33	74	37.4	p>0,05
	T/T	2	6,67	14	7.1	p>0,05
Всего	-	30	100	198**	100	p>0,05
<i>MTR rs1805087</i> (275 A>G)	-	n	%	n	%	p>0,05

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5	6	7
	A/A	22	73,33	119	60.1	p>0,05
	A/G	7	23,33	71	35.9	p>0,05
	G/G	1	3,34	8	4.0	p>0,05
Всего	-	30	100	198**	100	p>0,05
<i>MTRR rs1801394</i> (66A>G)	A/A	12	40	64	32.3	p>0,05
	A/G	15	50	91	46.0	p>0,05
	G/G	3	10	43	21.7	p>0,05
Всего	-	30	100	198**	100	p>0,05
* – данные контрольной группы взяты из источника [53, с. 14-26]						
** – данные контрольной группы взяты из источника [60, р. 986-988]						

Распределение частот аллелей и генотипов генов фолатного обмена представлено в таблице 27. Частоты не отличались от общей казахской популяции.

После генотипирования на носительство аллелей и генотипов генов фолатного обмена 25 пациенток были отнесены в группу высокого риска, так как имели хотя бы 1 минорный аллель по *MTHFR*, и получали 5мг фолиевой кислоты. Из них 15 пациенток имели хотя бы 1 минорный аллель по *MTR* и/или *MTRR*, и дополнительно получали 2,6 мг витамина В<sub>12</sub>. Через 2 недели был взят анализ на гомоцистеин, при достижении уровня гомоцистеин 5-7 мкмоль/л, пациентка допускалась к старту ВРТ.

За 1-2 цикла до планируемого старта программы ВРТ всем пациенткам основной группы была проведена офисная гистероскопия с биопсией эндометрия, ИГХ CD138. В контрольной группе 38,5% (n=15) пациенток прошли предварительно гистероскопию, данные представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Данные гистероскопии в группах

Показатель	Основная группа, n=30	Контрольная группа, n=39	p-Value
Доля проведенных гистероскопий, %	100 (30)	38,46 (15)	<0,001
Частота выявленного хронического эндометрита, %	66,67% (20)	40% (6)	0,088

Доля пациенток, прошедших гистероскопию в контрольной группе, была статистически значимо ниже, чем в основной, p<0,001. Частота выявленного хронического эндометрита имела тенденцию к статистической значимости, p=0,88. Из чего можно сделать вывод, что, если бы все пациентки контрольной группы прошли гистероскопию и получили лечение хронического эндометрита, возможно частота наступления беременности была выше, а число потерь беременности (биохимический беременности, неразвивающиеся беременности, самопроизвольные выкидыши) была бы ниже. В основной группе при выявлении

хронического эндометрита пациентки получали лечение как в ранее нами проведенном исследовании [186].

Наиболее частой схемой стимуляции в основной группе и контрольной группе был протокол с антагонистами ГнРГ, 50% и 64,1% соответственно,  $p=0,240$ . Протокол с прогестинового праймирования (PPOS) в контрольной группе не применялся в связи с невозможностью свежего переноса, таблица 29.

Таблица 29 – Протоколы стимуляции в исследуемых группах

Протокол	Основная группа, n=30	Контрольная группа, n=39	p-Value
С антагонистами ГнРГ	15 (50%)	25 (64,1%)	0,240
Длинный протокол с агонистами ГнРГ	5 (16,67%)	14 (35,9)	0,077
PPOS	10 (33,33)	0	<0,001

В таблице 30 приведены характеристики эмбриологического этапа в группах.

Среднее количество полученных ооцитов, оплодотворенных ооцитов, бластоцист и бластоцист высокого морфологического качества в группах статистически значимо не отличалось. Вместе с тем, количество зрелых ооцитов в основной группе было выше с тенденцией к статистически значимой разнице (таблица 30).

Таблица 30 – Данные эмбриологического этапа в группах

Показатель	Основная группа, n=30	Контрольная группа, n=39	p-Value
Количество ооцитов, $M\pm SD$	12,21±6,36	10,23±5,4	$p=0,812$
Количество зрелых ооцитов, $M\pm SD$	9,89±4,49	7,77±4,46	0,059
Количество 2pn2pb, $M\pm SD$	7,4±3	6,2±3,8	0,805
Количество бластоцист, $M\pm SD$	4,5±2,33	2,5±2,1	0,525
Количество эмбрионов хорошего качества, $M\pm SD$	3,64±2,16	1,1±1,3	0,317

Подготовка к переносу замороженных-оттаяных эмбрионов проводилась согласно современных принципов в искусственных циклах [187].

Исходы программ ВРТ – частота наступления беременности, частота живорождения и частота потери беременности представлена в таблице 31.

Таблица 31 – Сравнение исходов ВРТ в группах

Показатель, %	Основная группа, n=30	Контрольная группа, n=39	p-Value
Частота наступления беременности	63,3% (19)	30,76 (12)	0,008
Частота живорождения	53,33% (16)	17,95 (7)	0,022
Частота потери беременности	15,78% (3)	41,67 (5)	0,043

Частота наступления клинической беременности в основной группе составила 63,3% (19 беременностей из 30 пациенток), тогда как в контрольной группе данный показатель достиг 30,76%, что было статистически достоверно выше в основной группе,  $p=0,008$ , таблица 31. Частота живорождения также продемонстрировала статистически значимое преимущество в основной группе – 53,33% против 17,95% в контрольной группе ( $p=0,022$ ), что подтверждает эффективность персонифицированного подхода к ведению пациенток старшего репродуктивного возраста. Так же обращает внимание частота потерь беременности в контрольной группе – 41,67%, т.е. каждая вторая беременность прервалась, что в 2,6 раза чаще, чем в основной группе – 15,78%,  $p=0,043$ .

Таким образом, представленные данные свидетельствуют статистически значимые различия по исходам программ ВРТ при применении персонифицированной предгравидарной подготовки к ЭКО и ПЭ у женщин  $\geq 35$  лет в казахской популяции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема преодоления бесплодия актуальна во всем мире, в том числе и в Казахстане. На сегодняшний день самым эффективным методом борьбы с бесплодием являются вспомогательные репродуктивные технологии. Несмотря на применение ВРТ уже более 40 лет, результативность значительно не увеличивается в последние годы. Одной из причин является увеличение среднего возраста женщин, обращающихся за помощью репродуктологов.

Старший репродуктивный возраст характеризуется меньшим количеством и качеством яйцеклеток, эмбрионов, большей частотой выраженной патологии полости матки, анеуплоидии эмбрионов. То есть низкими шансами на положительный результат ВРТ и высокими рисками потери беременности. Учитывая ограниченные временные возможности использования собственных яйцеклеток женщиной, важно своевременно предпринять шаги для планирования беременности, учитывая индивидуальные медицинские и репродуктивные особенности. Для этого нужна комплексная персонифицированная подготовка к программе ВРТ.

В результате нашего исследования установлено, что носительство неблагоприятных аллелей генов фолатного обмена (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*) статистически значимо влияет на количество программ ВРТ, продолжительность бесплодия и частоту потерь беременности. Так, носительство аллелей *A/G* и *G/G* гена *MTRR* ассоциировано с повышенной частотой анеуплоидии эмбрионов и снижением их качества.

Частота носительства минорных аллелей генов *FSHR* (*rs6166*, *rs6165*) в казахской популяции достоверно не отличается от популяций Европы и Южной Азии, но выше по сравнению с Восточной Азией. Это подчеркивает важность учета популяционных различий в генетических исследованиях. В нашем исследовании не было статистически значимой разницы в исходах стимуляции женщин в зависимости от носительства генотипов и аллелей генов *FSHR* *rs6166*, *rs6165*. Исходя из чего, мы не рекомендуем этот тест как рутинный перед началом программы ЭКО и ПЭ.

У женщин старшего репродуктивного возраста с увеличением возраста наблюдается снижение количества эуплоидных эмбрионов. Корреляционный анализ показал отрицательную связь между возрастом женщины и числом генетически нормальных эмбрионов ( $r = -0,797$ ).

Эмбрионы высокого морфологического качества (оценка по Гарднеру  $\geq 3AA$ ) чаще наблюдались в основной группе пациенток, проходивших преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ-А), чем в группе сравнения. Однако даже морфологически качественные эмбрионы у женщин старшего возраста могут быть генетически аномальными.

Частота наступления беременности существенно выше при переносе эмбрионов, прошедших ПГТ-А: 63,3% для эмбрионов высокого качества против 30,76% в группе без тестирования.

Морфологическая оценка эмбрионов средней и низкой категории не всегда коррелирует с их генетическим статусом, что подтверждает необходимость применения генетического скрининга.

Пациентки, прошедшие персонализированную подготовку, включающую генотипирование, гистероскопию и лечение хронического эндометрита, имели лучшие результаты программ ВРТ. Частота живорождения в основной группе составила 53,33%, что было достоверно выше по сравнению с группой стандартной подготовки, где данный показатель составил 17,95% ( $p = 0,040$ ). Кроме того, частота потерь беременности в основной группе была статистически значимо ниже – 15,78% против 41,67% в контрольной группе ( $p = 0,043$ ), что свидетельствует о преимуществе персонифицированного подхода в снижении риска неблагоприятных репродуктивных исходов у пациенток старшего репродуктивного возраста

#### *Практические рекомендации*

1. *Сокращение времени до наступления беременности:* Персонализированный подход подготовки пациентов к программе ВРТ (вспомогательных репродуктивных технологий) позволяет учитывать индивидуальные особенности репродуктивного здоровья, гормонального фона и ответ яичников, что способствует более быстрой и эффективной имплантации эмбриона.

2. *Повышение частоты наступления и исхода беременности:* Индивидуализация протокола стимуляции овуляции, выбора эмбрионов и времени переноса способствует повышению вероятности клинической беременности и, как следствие, увеличивает частоту живорождений.

3. *Снижение риска репродуктивных потерь:* благодаря более точной оценке факторов, влияющих на имплантацию и ранние сроки гестации, персонализированный подход снижает частоту ранних выкидышей, биохимических беременностей и других форм потерь.

4. *Оптимизация общего репродуктивного прогноза:* Индивидуальный подбор схемы подготовки улучшает переносимость лечения, снижает количество неэффективных циклов ВРТ и повышает шансы на благополучное завершение программы с рождения здорового ребёнка.

Таким образом, возраст женщины является ключевым фактором успеха программ ВРТ. У женщин старше 35 лет требуется более тщательная подготовка. Морфологическая оценка эмбрионов недостаточна для предсказания их имплантационного потенциала, особенно у женщин старшего возраста. Генетический анализ (в частности, ПГТ-А) способствует снижению частоты потерь беременности за счёт отбора и переноса исключительно эуплоидных эмбрионов. Внедрение персонализированного подхода на этапе подготовки к программам ВРТ достоверно повышает их эффективность, способствует увеличению частоты живорождений и снижает риск репродуктивных потерь у женщин старшего репродуктивного возраста.

На основании проведенного исследования сделаны следующие **выводы:**

1. Женщины старшего репродуктивного возраста составляют 49-58% всех пациенток, обращающихся за ВРТ в РК. Частота беременности в возрасте < 34

лет после криопереноса достигает 70%, в возрасте 41-43 лет – 25% ( $p < 0,001$ ), после 44 лет – 1% ( $p < 0,001$ ).

2. Носительство неблагоприятных полиморфизмов аллелей генов и генотипов *rs1801133* и *rs1801131* гена *MTHFR*, *rs1805087* гена *MTR*, *rs1805087* гена *MTRR* в казахской популяции женщин с бесплодием достигает 90% и ассоциировано с отрицательными исходами программ ВРТ. При наличии 4 полиморфизмов частота анеуплоидии достигает 63,64%.

Частота носительства полиморфизма аллелей генов и генотипов *rs6165*, *rs6166* гена *FSHR* в казахской популяции не отличается от мировых популяций. Носительство минорного аллеля не оказывает влияния на результаты программ ВРТ.

3. Выраженный хронический эндометрит у женщин старшего репродуктивного возраст встречается в 2 раза чаще, чем у женщин до 35 лет (6,3% против 12,74%,  $p = 0,021$ ). Старший репродуктивный возраст пациенток с бесплодием является показанием к исследованию полости матки путем гистероскопии с биопсией эндометрия и ИГХ на CD138.

4. У женщин старшего репродуктивного возраста риск получения эмбрионов хорошего морфологического качества ниже на 16,3% ( $RR = 0,837$ ; 95% ДИ 0,718–0,976), и на 22,6% выше риск получения эмбрионов низкого качества ( $RR = 1,226$ ; 95% ДИ 1,029–1,446). У женщин старше 35 лет морфокинетика эмбрионов характеризуется снижением на 16,8% частоты эмбрионов с высокой оценкой морфокинетического развития по данным искусственного интеллекта. У женщин старше 35 лет 69% эмбрионов анеуплоидные. Оценка морфокинетики эмбрионов ИИ и ПГТ-А и перенос эуплоидного эмбриона позволяет повысить частоту наступления беременности и родов и снизить потери беременности.

5. Внедрение алгоритма персонифицированной предгравидарной подготовки к программе ВРТ повышает частоту наступления беременности в 2 раза (63,3% против 30,76%,  $p = 0,008$ ), частоту живорождения в 2,9 раз (53,33% против 17,95%,  $p = 0,022$ ) и снижает потери беременности в 2,6 раз (15,78% против 41,67%,  $p = 0,043$ ).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Hanson B., Johnstone E., Dorais J. et al. Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review // *J Assist Reprod Genet.* – 2017. – Vol. 34, Issue 2. – P. 167-177.
- 2 Lokshin V., Valiev R., Rybina A. et al. Poor responders – modern ideas, principles of management in art programs. Review // *Bulletin the National academy of sciences of the Republic of Kazakhstan.* – 2019. – Vol. 2, Issue 378. – P. 177-188.
- 3 Lokshin V., Omar M., Karibaeva S. Assisted Reproductive Technologies in the Republic of Kazakhstan: A 6-Year Trend Analysis from Efficacy to Availability // *J Reprod Infertil.* – 2022. – Vol. 23, Issue 1. – P. 61-66.
- 4 La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: From theory to practice // *Hum Reprod Update.* – 2014. – Vol. 20, Issue 1. – P. 124-140.
- 5 Gleicher N., Kushnir V.A., Albertini D.F. et al. Improvements in IVF in women of advanced age // *J Endocrinol.* – 2016. – Vol. 230, Issue 1. – P. F1-F6.
- 6 Gruhn J.R., Zielinska A.P., Shukla V. et al. Europe PMC Funders Group Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span // *Science.* – 2020. – Vol. 365, Issue 6460. – P. 1466-1469.
- 7 Yeun Tan T. et al. Female ageing and reproductive outcome in assisted reproduction cycles // *Singapore Med J.* – 2014. – Vol. 55, Issue 6. – P. 305-309.
- 8 De Geyter C., Calhaz-Jorge C., Kupka M.S. et al. ART in Europe, 2015: results generated from European registries by ESHRE // *Hum Reprod Open.* – 2020. – Vol. 2020, Issue 1. – P. hoz038.
- 9 Lokshin V.N., Omar M.D., Karibaeva S.K. et al. Assisted reproductive technologies in kazakhstan in 2018: A brief performance and availability report // *Reprod Med.* – 2021. – Vol. 2, Issue 47. – P. 9-13.
- 10 Grisendi V. et al. Definition of ovarian reserve markers // *Ovarian Reserve Markers to Identify Poor Responders in the Context of Poseidon Classification // Front Endocrinol (Lausanne).* – 2019. – Vol. 10. – P. 281-2-281-3.
- 11 Lensen S.F. et al. Individualised gonadotropin dose selection using markers of ovarian reserve for women undergoing in vitro fertilisation plus intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2018. – Vol. 2018, Issue 2. – P. 12693.
- 12 Ilgaz N.S., Aydos O.S.E., Karadag A. et al. Impact of follicle-stimulating hormone receptor variants in female infertility // *J Assist Reprod Genet.* – 2015. – Vol. 32, Issue 11. – P. 1659-1668.
- 13 O'Brien T.J., Kalmin M.M., Harralson A.F. et al. Association between the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR) rs4073366 polymorphism and ovarian hyperstimulation syndrome during controlled ovarian hyperstimulation // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2013. – Vol. 11, Issue 1. – P. 71.
- 14 Yan Y., Gong Z., Zhang L. et al. Association of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Polymorphisms with Ovarian Response in Chinese Women: A Prospective Clinical Study // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, Issue 10. – P. 1-8.
- 15 Ganesh V. et al. Association of estrogen, progesterone and follicle stimulating

hormone receptor polymorphisms with in vitro fertilization outcomes // *Syst Biol Reprod Med.* – 2018. – Vol. 64, Issue 4. – P. 260-265.

16 Lindgren I., Nenonen H., Henic E. et al. Gonadotropin receptor variants are linked to cumulative live birth rate after in vitro fertilization // *J Assist Reprod Genet.* – 2019. – Vol. 36, Issue 1. – P. 29-38.

17 Biswas L., Tyc K., El Yakoubi W. et al. Meiosis interrupted: the genetics of female infertility via meiotic failure // *Reproduction.* – 2021. – Vol. 161, Issue 2. – P. R13-R35.

18 Zeng S., Wang X., Wang Y. et al. MTHFR C677T polymorphism is associated with follicle-stimulating hormone levels and controlled ovarian hyperstimulation response: a retrospective study from the clinical database // *Fertil Steril.* – 2019. – Vol. 111, Issue 5. – P. 982-990.

19 Wang X., Sun X., Tang B. et al. Effect of polymorphisms of MTHFR in controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis // *J Assist Reprod Genet.* – 2021. – Vol. 38, Issue 9. – P. 2237-2249.

20 Ishitani H., Ikeda S., Egashira K. et al. Embryonic MTHFR contributes to blastocyst development // *J Assist Reprod Genet.* – 2020. – Vol. 37, Issue 8. – P. 1807-1814.

21 Chalova L., Lokshin V., Rybina A. et al. Modern methods of diagnosis and treatment of chronic endometritis, in preparing patients for assisted reproductive treatment technologies (literature review) // *Reports.* – 2020. – Vol. 2, Issue 330. – P. 21-28.

22 Chen Y.-Q., Fang R.-L., Luo Y. et al. Analysis of the diagnostic value of CD138 for chronic endometritis, the risk factors for the pathogenesis of chronic endometritis and the effect of chronic endometritis on pregnancy: a cohort study // *BMC Womens Health.* – 2016. – Vol. 16, Issue 1. – P. 60-1-60-7.

23 Park H.J., Kim Y.S., Yoon T.K. et al. Chronic endometritis and infertility // *Clin Exp Reprod Med.* – 2016. – Vol. 43, Issue 4. – P. 185-192.

24 Vitagliano A., Saccardi C., Noventa M. et al. Effects of chronic endometritis therapy on in vitro fertilization outcome in women with repeated implantation failure: a systematic review and meta-analysis // *Fertil Steril.* – 2018. – Vol. 110, Issue 1. – P. 103-112.

25 Локшин В.Н., Сулейменова М.Д., Карибаева Ш.К. и др. Вспомогательные репродуктивные технологии в Казахстане (данные Национального регистра ВРТ за 2020 г.) // *Репродуктивная медицина.* – 2024. – №1. – С. 8-16.

26 Локшин В.Н., Сулейменова М.Д., Ахметова А.А. и др. Вспомогательные репродуктивные технологии в Казахстане (данные Национального регистра, 2021 г.). // *Репродуктивная медицина.* – 2025. – №1. – С. 10-19.

27 Mascarenhas M.N., Flaxman S.R., Voerma T. et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys // *PLoS Med.* – 2012. – Vol. 9, Issue 12. – P. e1001356.

28 Практическая репродуктология / Коллектив авторов под редакцией академика НАН РК В.Н. Локшина.- Алматы: KazMedPrint.2023.- 386 с.

29 Niederberger C., Pellicer A., Cohen J. et al. Forty years of IVF // *Fertil Steril.*

– 2018. – Vol. 110, Issue 2. – P. 185-324.

30 Рыбина А.Н., Хорошилова И.Г., Исенова С.С. и др. Современные методы повышения эффективности вспомогательных репродуктивных технологий в Казахстане // Вестник КазНМУ. – 2019. – №1. – С. 23-26.

31 Кодекс Республики Казахстан. О здоровье народа и системе здравоохранения: принят 7 июля 2020 года, №360 // <https://adilet.zan>. 10.10.2025.

32 Приказ и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан. Об утверждении Правил проведения донорства и хранения половых клеток: 30 октября 2009 года, №624 // [https://adilet.zan.kz/rus/docs/V090005903\\_](https://adilet.zan.kz/rus/docs/V090005903_). 10.10.2025.

33 Бесплодный брак. Версии и контраверсии / под ред. В.Е. Радзинского. – М., 2018. – 404 с.

34 Infertility / WHO // <https://www.who.int/news-room>. 10.10.2024.

35 Wiltshire A. et al. Infertility and assisted reproductive technology outcomes in Afro-Caribbean women // <https://doi.org/10.1007/s10815-020>. 10.11.2024.

36 Anderson R.A. et al. ESHRE guideline: female fertility preservation // Human Reproduction Open. – 2020. – Vol. 4. – P. 1-17.

37 Alviggi C., Humaidan P., Howles C.M. et al. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology // Reprod Biol Endocrinol. – 2009. – Vol. 7, Issue 1. – P. 101.

38 Sadecki E., Weaver A., Zhao Y. et al. Fertility trends and comparisons in a historical cohort of US women with primary infertility // Reprod Health. – 2022. – Vol. 19, Issue 1. – P. 1-11.

39 Ferraretti A.P. et al. Results generated from European registers by ESHRE † The European IVF-monitoring (EIM), Consortium, for The European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) // Hum Reprod. – 2013. – Vol. 28, Issue 9. – P. 2318-2331.

40 Calhaz-Jorge C. et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2012: Results generated from European registers by ESHRE // Hum Reprod. – 2016. – Vol. 31, Issue 8. – P. 1638-1652.

41 van Loendersloot L.L. et al. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): A systematic review and meta-analysis // Hum Reprod Update. – 2010. – Vol. 16, Issue 6. – P. 577-589.

42 Корсак В.С., Смирнова А.А., Шурыгина О.В. Регистр ВРТ Российской Ассоциации Репродукции Человека. Отчет за 2019 // Проблемы репродукции. – 2021. – Т. 27, №6. – С. 14-29.

43 Fertility problems : assessment and treatment // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK247932/>. 10.10.2025.

44 Grisendi V., Mastellari E., La Marca A. et al. Ovarian Reserve Markers to Identify Poor Responders in the Context of Poseidon Classification // Front Endocrinol (Lausanne). – 2019. – Vol. 10. – P. 281-1-281-8.

45 Younis J.S. et al. The Bologna criteria for poor ovarian response: A contemporary critical appraisal // J Ovarian Res. – 2015. – Vol. 8, Issue 1. – P. 1-10.

46 Esteves S.C. et al. The POSEIDON Criteria and Its Measure of Success Through the Eyes of Clinicians and Embryologists // Front Endocrinol (Lausanne). – 2019. – Vol. 10. – P. 1-8.

47 Alviggi C. et al. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept // *Fertil Steril* [Internet]. 2016 Jun;105(6):1452–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.02.005>

48 Esteves S.C. et al. Estimation of age-dependent decrease in blastocyst euploidy by next generation sequencing: development of a novel prediction model // *Panminerva Med.* – 2019. – Vol. 61, Issue 1. – P. 3-10.

49 Ларина Т., Larina T., Супрун С. et al. Folate cycle: pathogenetic mechanisms of pregnancy complications (Review) // *Bull Physiol Pathol Respir.* – 2018. – Vol. 1, Issue 70. – P. 113-120.

50 Thaler C.J. Folate metabolism and human reproduction // *Geburtshilfe Frauenheilkd.* – 2014. – Vol. 74, Issue 9. – P. 845-851.

51 Yuan D., Chu J., Lin H. et al. Mechanism of homocysteine-mediated endothelial injury and its consequences for atherosclerosis // *Front Cardiovasc Med.* – 2023. – Vol. 9. – P. 1109445.

52 Dai C., Fei Y., Li J. et al. A Novel Review of Homocysteine and Pregnancy Complications // *Biomed Res Int.* – 2021. – Vol. 2021. – P. 6652231.

53 Святова Г, Махмутова З. Популяционно-генетический анализ полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы при дефектах нервной трубки в казахской популяции: монография. – Алматы, 2008. – 156 с.

54 Karimian M. et al. Methionine synthase A2756G transition might be a risk factor for male infertility: Evidences from seven case-control studies // *Mol Cell Endocrinol.* – 2016. – Vol. 425. – P. 1-10.

55 Gonzales M.C., Yu P., Shiao S.P.K. MTHFR Gene Polymorphism-Mutations and Air Pollution as Risk Factors for Breast Cancer: A Metaprediction Study // *Nurs Res.* – 2017. – Vol. 66, Issue 2. – P. 152-163.

56 Tan X., Yu Z., Sao J. et al. Association between in vitro fertilization outcomes and inherited thrombophilias: a meta-analysis // *J Assist Reprod Genet.* – 2016. – Vol. 33, Issue 8. – P. 1093-1098.

57 Murto T. et al. Folic acid supplementation and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene variations in relation to in vitro fertilization pregnancy outcome // *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 2015. – Vol. 94, Issue 1. – P. 65-71.

58 Reyes-Engel A. et al. Implications of human fertility of the 677C→T and 1298A→C polymorphisms of the MTHFR gene: Consequences of a possible genetic selection // *Mol Hum Reprod.* – 2002. – Vol. 8, Issue 10. – P. 952-957.

59 Isotalo P.A., Wells G.A., Donnelly J.G. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: An examination of C677T and A1298C mutations // *Am J Hum Genet.* – 2000. – Vol. 67, Issue 4. – P. 986-990.

60 Kalimagambetov A.M. et al. Association of folate cycle polymorphic genes with pregnancy complications in women of the Kazakh ethnic group // *Exp Biol.* – 2020. – Vol. 82, Issue 1. – P. 110-119.

61 D'Elia P.Q. et al. MTHFR polymorphisms C677T and A1298C and associations with IVF outcomes in Brazilian women // *Reprod Biomed Online.* – 2014. – Vol. 28, Issue 6. – P. 733-738.

62 Zeng H., Liu Z., Zhang L. et al. MTHFR 677TT is associated with decreased number of embryos and cumulative live birth rate in patients undergoing GnRHa short protocol: a retrospective study // BMC Pregnancy Childbirth. – 2022. – Vol. 22, Issue 1. – P. 1-13.

63 Boudjenah R., Molina-Gomes D., Torre A. et al. Genetic Polymorphisms Influence the Ovarian Response to rFSH Stimulation in Patients Undergoing In Vitro Fertilization Programs with ICSI. Lobaccaro J-MA, editor // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, Issue 6. – P. e38700.

64 Dobson A.T., Davis R.M., Rosen M.P. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C variants do not affect ongoing pregnancy rates following IVF // Hum Reprod. – 2006. – Vol. 22, Issue 2. – P. 450-456.

65 Ren Z.-J., Zhang Y.-P., Ren P.-W. et al. Contribution of MTR A2756G polymorphism and MTRR A66G polymorphism to the risk of idiopathic male infertility // Medicine. – 2019. – Vol. 98, Issue 51. – P. e18273.

66 Ivanov AV., Dedul A.G., Fedotov Y.N. et al. Toward optimal set of single nucleotide polymorphism investigation before IVF // Gynecol Endocrinol. – 2016. – Vol. 32. – P. 11-18.

67 Jarrett H. et al. Vitamin B-6 and riboflavin, their metabolic interaction, and relationship with MTHFR genotype in adults aged 18-102 years // Am J Clin Nutr. – 2022. – Vol. 116, Issue 6. – P. 1767-1778.

68 Pavlik R. et al. Reduced Steroid Synthesis in the Follicular Fluid of MTHFR 677TT Mutation Carriers: Effects of Increased Folic Acid Administration // Geburtshilfe Frauenheilkd. – 2022. – Vol. 82, Issue 10. – P. 1074-1081.

69 Dattilo M., Giuseppe D., Ettore C. et al. Improvement of gamete quality by stimulating and feeding the endogenous antioxidant system: mechanisms, clinical results, insights on gene-environment interactions and the role of diet // J Assist Reprod Genet. – 2016. – Vol. 33, Issue 12. – P. 1633-1648.

70 Leijdekkers J.A. et al. Individualized ovarian stimulation in IVF/ICSI treatment: It is time to stop using high FSH doses in predicted low responders // Hum Reprod. – 2020. – Vol. 35, Issue 9. – P. 1954-1963.

71 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析 (No Y. Title // Orphanet J Rare Dis. – 2009. – Vol. 21, Issue 1. – P. 1-9).

72 Camp T.A. et al. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary // Mol Endocrinol. – 1991. – Vol. 5, Issue 10. – P. 1405-1417.

73 Lokshin V.N., Rybina A.N., Abshekenova A.T. et al. Personalization of assisted reproductive technologies – myth or reality? // Probl reproduktsii. – 2022. – Vol. 28, Issue 2. – P. 76-80.

74 Jing M., Lin C., Zhu W. et al. Cost-effectiveness analysis of GnRH-agonist long-protocol and GnRH-antagonist protocol for in vitro fertilization // Sci Rep. – 2020. – Vol. 10, Issue 1. – P. 1-8.

75 Guan S., Feng Y., Huang Y. et al. Progestin-Primed Ovarian Stimulation Protocol for Patients in Assisted Reproductive Technology: A Meta-Analysis of

Randomized Controlled Trials // Front Endocrinol (Lausanne). – 2021. – Vol. 12. – P. 702558.

76 Mol B.W. et al. Personalized ovarian stimulation for assisted reproductive technology: study design considerations to move from hype to added value for patients // Fertil Steril. – 2018. – Vol. 109, Issue 6. – P. 968-979.

77 Conforti A., Vaiarelli A., Cimadomo D. et al. Pharmacogenetics of FSH action in the female // Front Endocrinol (Lausanne). – 2019. – Vol. 10. – P. 1-7.

78 Zalewski G. et al. Association of rs6166 polymorphism with FSH receptor transcript variants and steroid production in human granulosa cell cultures // Syst Biol Reprod Med. – 2013. – Vol. 59, Issue 4. – P. 191-198.

79 Sudo S., Kudo M., Wada S.I. et al. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene // Mol Hum Reprod. – 2002. – Vol. 8, Issue 10. – P. 893-899.

80 Tafazoli A. et al. Pharmacogenomic Biomarkers of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Malfunction in Females with Impaired Ovarian Response—A Genetic Survey // J Clin Med. – 2021. – Vol. 10, Issue 2. – P. 170-1-170-14.

81 Huang W., Cao Y., Shi L. Effects of FSHR polymorphisms on premature ovarian insufficiency in human beings: A meta-analysis // Reprod Biol Endocrinol. – 2019. – Vol. 17, Issue 1. – P. 1-6.

82 Lledo B., Guerrero J., Turienzo A. et al. Effect of follicle-stimulating hormone receptor N680S polymorphism on the efficacy of follicle-stimulating hormone stimulation on donor ovarian response // Pharmacogenet Genomics. – 2013. – Vol. 23, Issue 5. – P. 262-268.

83 Kuijper E.A.M. et al. Frequency distribution of polymorphisms in the FSH receptor gene in infertility patients of different ethnicity // Reprod Biomed Online. – 2011. – Vol. 22, Issue S1. – P. S60-S65.

84 Mohiyiddeen L. et al. A common Asn680Ser polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is not associated with ovarian response to gonadotropin stimulation in patients undergoing in vitro fertilization // Fertil Steril. – 2013. – Vol. 99, Issue 1. – P. 149-155.

85 Falconer H., Andersson E., Aanesen A. et al. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in a population of infertile women // Acta Obstet Gynecol Scand. – 2005. – Vol. 84, Issue 8. – P. 806-811.

86 Klinkert E.R. et al. FSH receptor genotype is associated with pregnancy but not with ovarian response in IVF // Reprod Biomed Online. – 2006. – Vol. 13, Issue 5. – P. 687-695.

87 Allegra A., Marino A., Raimondo S. et al. The carriers of the A/G-G/G allelic combination of the c.2039 A>G and c.-29 G>A FSH receptor polymorphisms retrieve the highest number of oocytes in IVF/ICSI cycles // J Assist Reprod Genet. – 2017. – Vol. 34, Issue 2. – P. 263-273.

88 Lindgren I., Baath M., Uvebrant K. et al. Combined assessment of polymorphisms in the LHCGR and FSHR genes predict chance of pregnancy after in vitro fertilization // Hum Reprod. – 2016. – Vol. 31, Issue 3. – P. 672-683.

89 Chang Q., Qiang H., Qian J. et al. Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Status and Response to Tyrosine Kinase Inhibitors in Advanced Chinese

Female Lung Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Study // *Front Oncol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 1-10.

90 Huang L. et al. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. – Vol. 6, Issue 1. – P. 1-20.

91 Khoroshilova K.I.G. et al. Features of karyotypes in married couples with reproductive functional problems in Kazakhstan // *Akush Ginekol (Sofia)*. – 2020. – Vol. 2020, Issue 1. – P. 141-145.

92 Wang Q., Qi D., Zhang L. et al. Association of the Cumulative Live Birth Rate with the Factors in Assisted Reproductive Technology: A Retrospective Study of 16,583 Women // *J Clin Med.* – 2023. – Vol. 12, Issue 2. – P. 493-1-493-12.

93 Wang S., Zhang Y., Mensah V. et al. Discordant anti-müllerian hormone (AMH) and follicle stimulating hormone (FSH) among women undergoing in vitro fertilization (IVF): Which one is the better predictor for live birth? // *J Ovarian Res.* – 2018. – Vol. 11, Issue 1. – P. 1-8.

94 Ligon S., Lustik M., Levy G. et al. Low antimüllerian hormone (AMH) is associated with decreased live birth after in vitro fertilization when follicle-stimulating hormone and AMH are discordant // *Fertil Steril.* – 2019. – Vol. 112, Issue 1. – P. 73-81.

95 Ceyhan T., Ozturk M., Yıldız U.G. et al. Repeated application of luteal phase oestradiol/GnRH antagonist priming increases IVF success for poor ovarian reserve patients // *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. – 2023. – Vol. 43, Issue 2. – P. 2211664.

96 Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? // *Hum Reprod Update.* – 1997. – Vol. 3, Issue 4. – P. 367-382.

97 Van den Abbeel E. et al. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer // *Reprod Biomed Online.* – 2013. – Vol. 27, Issue 4. – P. 353-361.

98 Lundin K., Park H. Time-lapse technology for embryo culture and selection // *Ups J Med Sci.* – 2020. – Vol. 125, Issue 2. – P. 77-84.

99 Nadir Ciray H., Campbell A. et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group // *Hum Reprod.* – 2014. – Vol. 29, Issue 12. – P. 2650-2660.

100 Armstrong S., Bhide P., Jordan V. et al. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2018. – Vol. 5, Issue 5. – P. CD011320.

101 Bellver J. BMI and miscarriage after IVF // *Curr Opin Obstet Gynecol.* – 2022. – Vol. 34, Issue 3. – P. 114-121.

102 Kassi L.A., McQueen D.B., Kimelman D. et al. Body mass index, not race, may be associated with an alteration in early embryo morphokinetics during in vitro fertilization // *J Assist Reprod Genet.* – 2021. – Vol. 38, Issue 12. – P. 3091-3098.

103 Dietrich J.E., Freis A., Franziska B. et al. Intraindividual Embryo Morphokinetics Are Not Affected by a Switch of the Ovarian Stimulation Protocol Between GnRH Agonist vs. Antagonist Regimens in Consecutive Cycles // *Front Endocrinol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 246.

104 Fréour T. et al. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro

fertilization- intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women // *Fertil Steril.* – 2013. – Vol. 99, Issue 7. – P. 1944-1950.

105 Boynukalin F.K., Serdarogullari M., Gultomruk M. et al. The impact of endometriosis on early embryo morphokinetics: a case-control study // *Syst Biol Reprod Med.* – 2019. – Vol. 65, Issue 3. – P. 250-257.

106 Akhter N., Shahab M. Morphokinetic analysis of human embryo development and its relationship to the female age: a retrospective time-lapse imaging study // *Cell Mol Biol.* – 2017. – Vol. 63, Issue 8. – P. 84-92.

107 Fishel S., Campbell A., Montgomery S. et al. Live births after embryo selection using morphokinetics versus conventional morphology: a retrospective analysis // *Reprod Biomed Online.* – 2017. – Vol. 35, Issue 4. – P. 407-416.

108 Verlinsky Y., Kuliev A. Preimplantation diagnosis of common aneuploidies in infertile couples of advanced maternal age // *Hum Reprod.* – 1996. – Vol. 11, Issue 10. – P. 2076-2077.

109 Gleicher N., Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review // *J Ovarian Res.* – 2017. – Vol. 10, Issue 1. – P. 21-1-21-7.

110 Verlinsky Y., Cieslak J., Ivakhnenko V. et al. Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first-and second-polar body FISH analysis // *J of Assisted Reproduction and Genetics.* – 1998. – Vol. 15, Issue 5. – P. 285-289.

111 Rubio C. et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study // *Fertil Steril.* – 2017. – Vol. 107, Issue 5. – P. 1122-1129.

112 Mastenbroek S. et al. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs // *Hum Reprod Update.* – 2011. – Vol. 17, Issue 4. – P. 454-466.

113 Карибаева Ш.К., Малик А., Локшин В.Н. Первые программы преимплантационного генетического скрининга в Казахстане // *Репродуктивная медицина.* – 2017. – №2(31). – С. 26-29.

114 Capalbo A., Valero R.A., Jimenez-Almazan J. et al. Optimizing clinical exome design and parallel gene-testing for recessive genetic conditions in preconception carrier screening: Translational research genomic data from 14,125 exomes // *PLOS Genet.* – 2019. – Vol. 15, Issue 10. – P. e1008409.

115 Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: Microarrays and CGH // *Mol Hum Reprod.* – 2008. – Vol. 14, Issue 12. – P. 703-710.

116 Валиев Р.К., Локшин В.Н., Карибаева Ш.К. и др. Возможности PGS в преодолении влияния возрастного фактора на результаты ВРТ // *Репродуктивная медицина.* – 2017. – №4(33). – С. 20-23.

117 Harton G., Braude P., Lashwood A. et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening // *Hum Reprod.* – 2011. – Vol. 26, Issue 1. – P. 14-24.

118 Локшин В.Н., Исенова С.Ш., Рыбина А.Н. и др. Современные возможности повышения эффективности программ ВРТ у женщин старшего репродуктивного возраста // *Репродуктивная медицина.* – 2017. – №3(32). – С. 67-

73.

119 Ajduk A., Zernicka-Goetz M. Advances in embryo selection methods // *F1000 Biol Rep.* – 2012. – Vol. 4, Issue 1. – P. 1-5.

120 Yang Z., Zhang J., Salem S.A. et al. Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: A prospective study with sibling oocytes // *BMC Med Genomics.* – 2014. – Vol. 7, Issue 1. – P. 1-13.

121 Forman E.J., Upham K.M., Cheng M. et al. Comprehensive chromosome screening alters traditional morphology-based embryo selection: A prospective study of 100 consecutive cycles of planned fresh euploid blastocyst transfer // *Fertil Steril.* – 2013. – Vol. 100, Issue 3. – P. 718-724.

122 Chen C.K., Yu H.T., Soong Y.K. et al. New perspectives on preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic screening // *Taiwan J Obstet Gynecol.* – 2014. – Vol. 53, Issue 2. – P. 146-150.

123 Treff N.R., Fedick A., Tao X. et al. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease // *Fertil Steril.* – 2013. – Vol. 99, Issue 5. – P. 1377-1384.

124 Capalbo A., Rienzi L., Cimadomo D. et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: An observational study in two centers involving 956 screened blastocysts // *Hum Reprod.* – 2014. – Vol. 29, Issue 6. – P. 1173-1181.

125 Sazegari A., Kalantar S.M., Pashaiefar H. et al. The T657C polymorphism on the SYCP3 gene is associated with recurrent pregnancy loss // *J Assist Reprod Genet.* – 2014. – Vol. 31, Issue 10. – P. 1377-1381.

126 Irani M., O'Neill C., Palermo G.D. et al. Blastocyst development rate influences implantation and live birth rates of similarly graded euploid blastocysts // *Fertil Steril.* – 2018. – Vol. 110, Issue 1. – P. 95-102.

127 De Los Santos M.J., Apter S., Coticchio G. et al. ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs // *Hum Reprod.* – 2015. – Vol. 23. – P. 685-686.

128 Simón C., Giudice L.C. *The Endometrial Factor: A Reproductive Precision Medicine Approach.* – London: CRC Press, 2017. – 284 p.

129 Greenwood S.M., Moran J.J. Chronic endometritis: morphologic and clinical observations // *Obstet Gynecol.* – 1981. – Vol. 58, Issue 2. – P. 176-184.

130 Kitaya K., Takeuchi T., Mizuta S. et al. Endometritis: new time, new concepts // *Fertil Steril.* – 2018. – Vol. 110, Issue 3. – P. 344-350.

131 Romero R., Espinoza J., Mazor M. Can endometrial infection/inflammation explain implantation failure, spontaneous abortion, and preterm birth after in vitro fertilization? // *Fertil Steril.* – 2004. – Vol. 82, Issue 4. – P. 799-804.

132 Zolghadri J. et al. The value of hysteroscopy in diagnosis of chronic endometritis in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2011. – Vol. 155, Issue 2. – P. 217-220.

133 Bouet P.E., El Hachem H., Monceau E. et al. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: Prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis // *Fertil Steril.* – 2016. – Vol. 105, Issue 1. – P. 106-110.

134 Kasius J.C., Broekmans F.J.M., Sie-Go D.M.D.S. et al. The reliability of the histological diagnosis of endometritis in asymptomatic IVF cases: a multicenter observer study // *Hum Reprod.* – 2012. – Vol. 27, Issue 1. – P. 153-158.

135 McQueen D.B., Bernardi L.A., Stephenson M.D. Chronic endometritis in women with recurrent early pregnancy loss and/or fetal demise // *Fertil Steril.* – 2014. – Vol. 101, Issue 4. – P. 1026-1030.

136 Kannar V., Lingaiah H.K.M., Sunita V. Evaluation of Endometrium for Chronic Endometritis by Using Syndecan-1 in Abnormal Uterine Bleeding // *J Lab Physicians.* – 2012. – Vol. 4, Issue 2. – P. 69-73.

137 McQueen D.B., Perfetto C.O., Hazard F.K. et al. Pregnancy outcomes in women with chronic endometritis and recurrent pregnancy loss Presented at the American Society for Reproductive Medicine Meeting, Honolulu, Hawaii, October 18-22, 2014 // *Fertil Steril.* – 2015. – Vol. 104, Issue 4. – P. 927-931.

138 Cicinelli E., Matteo M., Tinelli R. et al. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy // *Hum Reprod.* – 2015. – Vol. 30, Issue 2. – P. 323-330.

139 Yang R., Du X., Wang Y. et al. The hysteroscopy and histological diagnosis and treatment value of chronic endometritis in recurrent implantation failure patients // *Arch Gynecol Obstet.* – 2014. – Vol. 289, Issue 6. – P. 1363-1369.

140 Ma J., Gao W., Li D. Recurrent implantation failure: A comprehensive summary from etiology to treatment // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2023. – Vol. 13. – P. 1-21.

141 Oshina K., Kuroda K., Nakabayashi K. et al. Gene expression signatures associated with chronic endometritis revealed by RNA sequencing // *Front Med.* – 2023. – Vol. 10. – P. 1-10.

142 Cicinelli E., Matteo M. et al. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment // *Reprod Sci.* – 2014. – Vol. 21, Issue 5. – P. 640-647.

143 Johnston-MacAnanny E.B. et al. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization // *Fertil Steril.* – 2010. – Vol. 93, Issue 2. – P. 437-441.

144 Kitaya K., Tada Y., Taguchi S. et al. Local mononuclear cell infiltrates in infertile patients with endometrial macropolyps versus micropolyps // *Hum Reprod.* – 2012. – Vol. 27, Issue 12. – P. 3474-3480.

145 Cheng X., Huang Z., Xiao Z. et al. Does antibiotic therapy for chronic endometritis improve clinical outcomes of patients with recurrent implantation failure in subsequent IVF cycles? A systematic review and meta-analysis // *J Assist Reprod Genet.* – 2022. – Vol. 39 Issue 8. – P. 1797-1813.

146 Lundin K., Bentzen J.G., Bozdogan G. et al. Good practice recommendations on add-ons in reproductive medicine // *Hum Reprod.* – 2023. – Vol. 38, Issue 11. – P. 2062-2104.

147 Fact sheet “Obesity and overweight” / WHO // <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. 10.10.2025.

148 Snider A.P., Wood J.R. Obesity induces ovarian inflammation and reduces

oocyte quality // *Reproduction*. – 2019. – Vol. 158, Issue 3. – P. R79-R90.

149 Wang H., Cheng Q., Li X. et al. Loss of TIGAR Induces Oxidative Stress and Meiotic Defects in Oocytes from Obese Mice // *Mol Cell Proteomics*. – 2018. – Vol. 17, Issue 7. – P. 1354-1364.

150 Liu S., Hong L., Lian R. et al. Transcriptomic Analysis Reveals Endometrial Dynamics in Normoweight and Overweight/Obese Polycystic Ovary Syndrome Women // *Front Genet*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1-14.

151 Gonnella F., Konstantinidou F., Donato M. et al. The Molecular Link between Obesity and the Endometrial Environment: A Starting Point for Female Infertility // *Int J Mol Sci*. – 2024. – Vol. 25, Issue 13. – P. 1-15.

152 Garcia-Ferreira J., Carpio J., Zambrano M. et al. Overweight and obesity significantly reduce pregnancy, implantation, and live birth rates in women undergoing In Vitro Fertilization procedures // *JBRA Assist Reprod*. – 2021. – Vol. 25, Issue 3. – P. 394-402.

153 Jungheim E.S., Schon S.B., Schulte M.B. et al. IVF outcomes in obese donor oocyte recipients: A systematic review and meta-analysis // *Hum Reprod*. – 2013. – Vol. 28, Issue 10. – P. 2720-2727.

154 Sermondade N. et al. Female obesity is negatively associated with live birth rate following IVF: a systematic review and meta-analysis // *Hum Reprod Update*. – 2019. – Vol. 25, Issue 4. – P. 439-451.

155 Hawkins Bressler L. et al. Factors Associated With Second-Trimester Pregnancy Loss in Women With Normal Uterine Anatomy Undergoing In Vitro Fertilization // *Obstet Gynecol*. – 2015. – Vol. 125, Issue 3. – P. 621-627.

156 Kim S.J., Lee D., Kim S.K. et al. Cumulative live birth rate after up to three consecutive embryo transfer cycles in women with poor ovarian response // *Clin Exp Reprod Med*. – 2020. – Vol. 47, Issue 2. – P. 135-139.

157 Song B.B., Mandelbaum R.S., Anderson Z.S. et al. Pregnancy following assisted reproductive technology in morbidly obese patients: assessment of fetomaternal outcomes // *J Assist Reprod Genet*. – 2024. – Vol. 41, Issue 4. – P. 903-914.

158 Sanderman E.A., Willis S.K., Wise L.A. Female dietary patterns and outcomes of in vitro fertilization (IVF): a systematic literature review // *Nutr J*. – 2022. – Vol. 21, Issue 1. – P. 1-16.

159 Jeong H.G., Cho S., Ryu K.J. et al. Effect of weight loss before in vitro fertilization in women with obesity or overweight and infertility: a systematic review and meta-analysis // *Sci Rep*. – 2024. – Vol. 14, Issue 1. – P. 1-9.

160 Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан. Об утверждении правил и условий проведения вспомогательных репродуктивных методов и технологий: утв. 15 декабря 2020 года, №КР ДСМ-272/2020 // <https://adilet.zan.kz/rus/docs/V2000021816>. 10.10.2025.

161 Dikke D.G.B., Olina O.A.A., Kuznetsova K.I.V. et al. Algorithm for treating uterine factor infertility in patients with endometrial dysfunction secondary to chronic endometritis // *Akush Ginekol (Sofia)*. – 2024. – Suppl. 9. – P. 4-20.

162 Лечение бесплодия с помощью вспомогательных репродуктивных технологий: клинический протокол медицинского вмешательства // <https://diseases.medelement.com/disease>. 10.10.2025.

- 163 Coticchio G., Ahlström A., Arroyo G. et al. The Istanbul consensus update: a revised ESHRE/ALPHA consensus on oocyte and embryo static and dynamic morphological assessment // *Hum Reprod.* – 2025. – Vol. 40, Issue 6. – P. 989-1035.
- 164 Руководство по клинической эмбриологии / под ред. В.С. Корсака. – М., 2011. – 216 с.
- 165 Gliozheni O., Hambartsoumian E., Strohmer H. et al. ART in Europe, 2019: results generated from European registries by ESHRE // *Hum Reprod.* – 2023. – Vol. 38, Issue 12. – P. 2321-2338.
- 166 Рыбина АН, Кемел АБ, Валиев РК, Аскар Е, Танышева ГА, Элленбоген А. Современные методы ведения пациенток с бедным овариальным ответом на контролируруемую овариальную стимуляцию: обзор литературы. *Репродуктивная медицина (Центральная Азия)* [Internet]. 2024 Dec 31;(4):9–18. Available from: <https://repromed.kz/index.php/journal/article/view/283>
- 167 Рыбина АН, Ellenbogen A, Мукушкина ДД, Карибаева ШК, Валиев РК. Исходы программ ВРТ в зависимости от статуса генов фолатного обмена в казахской популяции. *Репродуктивная медицина* [Internet]. 2024 Apr 1;(1):17–26. Available from: <https://repromed.kz/index.php/journal/article/view/359>
- 168 Mueller J.C. Linkage disequilibrium for different scales and applications // *Brief Bioinform.* – 2004. – Vol. 5, Issue 4. – P. 355-364.
- 169 Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // *Am J Hum Genet.* – 2007. – Vol. 81, Issue 3. – P. 559-575.
- 170 Vinet L., Zhedanov A. A “missing” family of classical orthogonal polynomials // *Kaos GL Derg.* – 2010. – Vol. 8, Issue 75. – P. 147-154.
- 171 Hurley C.K., Kempenich J., Wadsworth K. et al. Common, intermediate and well-documented HLA alleles in world populations: CIWD version 3.0.0 // *Hla.* – 2020. – Vol. 95, Issue 6. – P. 516-531.
- 172 Lowy-Gallego E., Fairley S., Zheng-Bradley X. et al. Variant calling on the GRCh38 assembly with the data from phase three of the 1000 Genomes Project // *Wellcome Open Res.* – 2019. – Vol. 4. – P. 50-1-50-41.
- 173 Storr A., Venetis C.A., Cooke S. et al. Inter-observer and intra-observer agreement between embryologists during selection of a single Day 5 embryo for transfer: a multicenter study // *Hum Reprod.* – 2017. – Vol. 32, Issue 2. – P. 307-314.
- 174 Kim M.K., Park J.K., Jeon Y. et al. Effects of paternal age on human embryo development in in vitro fertilization with preimplantation genetic screening // *Clin Exp Reprod Med.* – 2019. – Vol. 46, Issue 1. – P. 22-29.
- 175 Hsieh C.E., Lee R.K.K., Sun F.J. et al. Early blastulation (EB) of day 4 embryo is predictive of outcomes in single embryo transfer (SET) cycles // *Taiwan J Obstet Gynecol.* – 2018. – Vol. 57, Issue 5. – P. 705-708.
- 176 Бегимбаева АА, Рыбина АН, Нигметова КТ, Сайлау ЖК, Ермакова АШ, Карибаева ШК, et al. Искусственный интеллект — ключ к развитию эмбриологической лаборатории. *Репродуктивная медицина* [Internet]. 2024 Oct 2;(3):42–9. Available from: <https://repromed.kz/index.php/journal/article/view/406>
- 177 Hyde K.J. et al. Genetic Considerations in Recurrent Pregnancy Loss // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2015. – Vol. 5, Issue 3. – P. a023119.

178 Carp H.J.A. Recurrent Pregnancy Loss // *Clinical Management of Infertility: problems and solutions.* – Cham, 2025. – P. 315-334.

179 Lee H.L., McCulloh D.H., Hodes-Wertz B. et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening improves implantation and live birth in women age 40 through 43 // *J Assist Reprod Genet.* – 2015. – Vol. 32, Issue 3. – P. 435-444.

180 AlSaad R., Abd-alrazaq A., Choucair F. et al. Harnessing Artificial Intelligence to Predict Ovarian Stimulation Outcomes in In Vitro Fertilization: Scoping Review // *J Med Internet Res.* – 2024. – Vol. 26, Issue 1. – P. e53396.

181 Barash O.O., Ivani K.A., Willman S.P. et al. Association between growth dynamics, morphological parameters, the chromosomal status of the blastocysts, and clinical outcomes in IVF PGS cycles with single embryo transfer // *J Assist Reprod Genet.* – 2017. – Vol. 34, Issue 8. – P. 1007-1016.

182 Humaidan P., Chin W., Rogoff D. et al. Efficacy and safety of follitropin alfa/lutropin alfa in ART: A randomized controlled trial in poor ovarian responders // *Hum Reprod.* – 2017. – Vol. 32, Issue 3. – P. 544-555.

183 Рыбина, А., Валиев, Р., Кемел, А., Аскар, Е., & Бищекова, Б. (2025). Сравнение эффективности и безопасности препаратов ЧМГ и r-ФСГ+ЛГ, получающих свою биологическую активность ЛГ из разных источников: когортное одноцентровое исследование. *Репродуктивная медицина (Центральная Азия)*, (2), 107–111. <https://doi.org/10.37800/RM.2.2025.476>

184 Lokshin V.N., Rybina A.N., Abshekenova A.T. et al. The uterine cavity state in older reproductive age patients // *Obstet Gynecol Reprod.* – 2025. – Vol. 19, Issue 4. – P. 506-513.

185 Рыбина АН, Абшекенова АТ, Аскар Е, Карибаева ШК, Валиев РК. Эффективность персонифицированного алгоритма подготовки пациенток старшего репродуктивного возраста к программе ЭКО: проспективное когортное исследование. *Репродуктивная медицина (Центральная Азия)* [Internet]. 2025 Jul 1;2025(2):92–101. Available from: <https://repromed.kz/index.php/journal/article/view/535>

186 Lokshin V., Askar Y., Rybina A. et al. Antibiotics and Uterine Flushing versus Antibiotics Alone for Chronic Endometritis with Thin Endometrium in Assisted Reproductive Technology: A Single-Center Retrospective Cohort Study // *Int J Fertil Steril.* – 2025. – Vol. 19, Issue 2. – P. 186-192.

187 В.Н. Локшин, Ш.К. Карибаева, Г.К. Рапильбекова, Р.К. Валиев, А.Н. Рыбина, Ю.Л. Тюгай, А.Т. Абшекенова, А.А. Ахметова. Поддержка лютеиновой фазы в программах вспомогательных репродуктивных технологий: Практическое руководство/ 2025// Алматы: Международная академия репродуктологии, 2025. – 76 с.

