

Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Крылова Ксения Викторовна

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕРЕНОСА РАЗМОРОЖЕННОГО ЭМБРИОНА
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДИКИ ПОДГОТОВКИ ЭНДОМЕТРИЯ
И ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОГО ЭТАПА**

3.1.4. Акушерство и гинекология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Дружинина Елена Борисовна

Иркутск – 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Глава 1. ВРТ В ПРЕОДОЛЕНИИ БЕСПЛОДИЯ: ПРОБЛЕМЫ И ДОСТИЖЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
1.1 Социальные аспекты проблемы бесплодия.....	14
1.1 Программа ЭКО.....	16
1.2 Культивирование эмбрионов	17
1.3 Сравнение методов криоконсервации эмбрионов человека	19
1.4 Значение криоконсервации в лечении бесплодия.....	22
1.5 Основные показания для замораживания эмбрионов.....	23
1.6 Криоконсервация и синдром гиперстимуляции яичников.....	25
1.7 Криоконсервация и состояние эндометрия в протоколе ЭКО.....	26
1.8 Криоконсервация и сохранение эмбрионов.....	29
1.9 Схемы подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона.....	30
1.10 Эмбриологические методики: вспомогательный хетчинг и среда для переноса эмбриона с высоким содержанием гиалуроновой кислоты.....	35
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
2.1 Характеристика базы и объект исследования	44
Дизайн исследования.....	48
2.2 Методы исследования.....	49
Классификация оценки степени зрелости бластоцисты.....	54
2.2.1 Подготовка эндометрия к переносу размороженного эмбриона (I этап исследования):	56
2.2.2 Эмбриологический этап в криопротоколе (II этап исследования)	57
2.2.3 Статистический анализ полученных результатов	59
3.1 I этап исследования. Клинико-anamnestическая характеристика пациенток при назначении двух схем подготовки эндометрия	61
3.2 Анализ программы овариальной стимуляции, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы	69
3.3 Сравнительная характеристика параметров криопротокола при назначении двух схем подготовки эндометрия.....	74
3.4 II этап исследования. Клинико-anamnestическая характеристика пациенток при использовании эмбриологических методик	78
3.5 Анализ предшествующего цикла овариальной стимуляции, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы	85
3.6 Сравнительная характеристика параметров криопротокола при использовании двух эмбриологических методик	89
3.7 Модели прогнозирования отрицательного исхода эмбриологического этапа у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием.....	94
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	105
ВЫВОДЫ.....	120
Практические рекомендации	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	123
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

По определению ВОЗ, бесплодием считается заболевание репродуктивной системы, определяемое невозможностью достижения клинической беременности после 12 месяцев регулярной половой жизни [21].

В условиях экономического кризиса, демографического старения, падения рождаемости, высокого уровня общей смертности, уменьшения числа потенциальных матерей, изменения образа жизни бесплодие приобретает особую социальную значимость. По данным литературы, бесплодием страдают от 10 до 20 % пар репродуктивного возраста во всем мире, женское и мужское бесплодие встречается с одинаковой частотой [43, 50]. Трубно-перитонеальный фактор является ведущим среди женского бесплодия и составляет до 35 % в его структуре [21, 24].

На сегодняшний день самым эффективным методом лечения бесплодия являются вспомогательные репродуктивные технологии [20]. Европейское общество репродукции человека и эмбриологии (European Society of Human Reproduction and Embryology, далее – ESHRE) в своем 23-м ежегодном отчете сообщает об очередном выполненном миллионе лечебных циклов ВРТ в 2019 году. За все время ведения отчетов ESHRE показывает постоянный рост числа зарегистрированных случаев лечения и количества живорождений в результате ВРТ в Европе и сообщает о выполнении более 10 миллионов лечебных циклов [150].

В России, по данным Российской ассоциации репродукции человека (РАРЧ), в 2021 году зафиксировано увеличение количества программ ВРТ – проведено более 160 тысяч лечебных циклов, перенос размороженных эмбрионов выполнен в 33,5 % случаев [25].

Эффективность программ ВРТ оценивается по частоте наступления клинической беременности и частоте живорождений. По данным РАРЧ, в 2021 году частота наступления беременности в расчете на цикл составила

28,6 %, на пункцию – 29,9 %, на перенос эмбриона – 34,8 %. В программах с размороженными эмбрионами: частота наступления беременности на цикл – 41,4 %, на перенос эмбрионов – 41,7 % [25].

Совершенствование ВРТ направлено на увеличение эффективности программ за счет повышения частоты наступления беременности и живорождений. Одним из важных достижений репродукции в XX веке считается открытие технологии криоконсервации эмбрионов человека с последующим их размораживанием и переносом в полость матки.

Криоконсервация эмбрионов рационально решает проблему хранения и дальнейшего использования их после проведенной программы ЭКО: отсрочить время переноса эмбриона в связи с развитием или предупреждением синдрома гиперстимуляции яичников. Замораживание эмбрионов способно отложить наступление беременности на неопределенно долгое время, учитывая пожелания женщины, или сохранить эмбрионы при одномоментном получении их большого количества. За счет применения криоконсервации представляется возможной отмена «свежего» переноса при изменениях со стороны эндометрия, при необходимости сегментировать цикл ЭКО для проведения планового лечения женщины, также для сохранения генетического материала до назначения гонадотоксичной терапии в рамках программ онкофертильности [55, 139, 148].

Криоконсервация эмбрионов оптимально снижает частоту повторных стимуляций яичников, уменьшает риск развития внематочной беременности, снижает медикаментозную нагрузку на пациентку в целом. Ранняя диагностика наследственных заболеваний, в том числе проведение предимплантационной генетической диагностики, связана с криоконсервацией, поскольку протокол ЭКО у пациентов предусматривает плановое замораживание биоматериала и проведение генетического тестирования, что позволяет исключить из программы эмбрионы с ограниченным потенциалом развития [52, 55, 148, 173].

Криопротоколы привели к значительному улучшению клинических

результатов: новая стратегия «freeze-all» – «заморозить все», которая активно используется во всем мире, повышает результативность программ ВРТ при сравнении со «свежим» переносом [3, 65, 85].

Криопротocolы способствуют повышению кумулятивной частоты живорождений [111, 126, 158]. Процедура криоконсервации нивелирует негативное влияние овариальной стимуляции на рецептивность эндометрия [63, 103]. Таким образом, криоконсервация позволяет сохранить фертильность в долгосрочной перспективе [73].

Криопротocol состоит из следующих этапов: подготовка эндометрия, размораживание и перенос эмбриона. В клинической практике используются различные схемы препаратов для подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона. Каждый из протоколов имеет свои преимущества и недостатки, однако возможность адаптировать гормональный фон женщины и состояние эндометрия к характерному для естественного цикла делает технологию переноса размороженных эмбрионов более совершенной [63]. В 2006 году Роберт Эдвардс (R. Edwards) назвал имплантацию эмбриона «последним барьером ВРТ», именно поэтому оптимизация схем подготовки эндометрия в период имплантации эмбриона представляет важное значение для благоприятных исходов программ ВРТ [86, 144]. Кроме того, на эмбриологическом этапе постоянно предлагаются новые методики, направленные на повышение эффективности лечения методами ВРТ, одним из которых является вспомогательный хетчинг.

Размороженные эмбрионы затрачивают определенное время и силы, чтобы освободиться из блестящей оболочки, вспомогательный хетчинг облегчает данный процесс [56, 102]. В ВРТ термин «хетчинг» обозначает выход эмбриона из блестящей оболочки (происходит от английского hatchihg – «вылупление»). Процедура вспомогательного хетчинга введена в эмбриологическую практику для повышения вероятности имплантации эмбрионов и улучшения результативности программ экстракорпорального оплодотворения [95, 115].

Также для повышения результативности программ ВРТ было предложено использование среды для переноса эмбриона с высокой концентрацией гиалуроновой кислоты, которая имеет важное значение для взаимодействия эмбриона и эндометрия. Среда приближена по составу к натуральной, что скорее благоприятно влияет на процесс имплантации [101]. Однако имеющиеся разноречивые данные об эффективности данной среды вызывают ряд вопросов. Так, например, в настоящее время не определены точные показания для использования среды с высокой концентрацией гиалуроновой кислоты [104, 172].

Проведенный обзор литературных данных по тематике диссертационной работы свидетельствует о наличии неоднозначных данных по поводу оптимальной схемы подготовки эндометрия в криопротоколах при трубно-перитонеальном бесплодии, вспомогательного хетчинга и среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты, что и послужило основанием для проведения данного исследования.

На основании вышеизложенного нами была сформулирована **цель исследования** – оптимизировать подходы к подготовке эндометрия и ведению эмбриологического этапа в криопротоколе у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием для повышения результативности программ с переносом размороженных эмбрионов.

Для реализации поставленной цели последовательно решались **задачи исследования:**

1. Оценить эффективность схем подготовки эндометрия с назначением эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин рилизинг - гормона в циклах с переносом размороженного эмбриона у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием.
2. Установить результативность применения вспомогательного хетчинга на эмбриологическом этапе при переносе размороженного эмбриона в циклах вспомогательных репродуктивных технологий у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием.

3. Дать характеристику результатов криопротокола при применении среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты на эмбриологическом этапе циклов вспомогательных репродуктивных технологий при женском трубно-перитонеальном бесплодии.

4. Разработать модель прогноза результатов применения вспомогательного хетчинга и среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты при переносе размороженного эмбриона у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием.

Степень разработанности темы исследования

Проведен углубленный анализ отечественных и зарубежных информационных источников, тесно связанных с темой настоящего исследования. Важность изучения схем подготовки эндометрия и эмбриологических методик обусловлена высокой частотой встречаемости трубно-перитонеального бесплодия, отсутствием в настоящее время единых данных, подтверждающих преимущество одного метода подготовки эндометрия над другим, отсутствием стандартных подходов к эмбриологическим методикам и уровнем результативности программ с переносом размороженного эмбриона. Перечисленные проблемы свидетельствуют о недостаточном изучении подготовки эндометрия и использования эмбриологических методик в криопротоколах у женщин в возрасте до 35 лет при трубно-перитонеальном бесплодии.

Научная новизна исследования

Продемонстрирована сопоставимая клиническая эффективность протоколов подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в возрасте до 35 лет при переносе размороженного эмбриона. Так, частота наступления беременности составила 28,6 % и 32,1 % соответственно ($p=0,7$) и частота родов – 23,8 % и 17,9 % соответственно ($p=0,8$).

Показана более высокая клиническая эффективность вспомогательного

хетчинга и среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в криопотоколах у женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия в возрасте до 35 лет при сравнении с группой контроля. Частота наступления беременности при использовании вспомогательного хетчинга достоверно увеличилась на 20,3 % при сравнении с контрольной группой (46,7 % и 26,4 % соответственно, $p=0,03$). При использовании среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты частота наступления беременности достоверно увеличилась на 22,5 % при сравнении с контрольной группой, (48,9 % и 26,4 % соответственно, $p=0,02$), а частота родов – на 17,3 % (38,1 % и 20,8 % соответственно, $p=0,03$).

В рамках исследования впервые разработаны и апробированы две математические модели прогноза результатов применения вспомогательного хетчинга и среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в криопотоколе у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием на основании комплексного анализа клинико-anamнестических, лабораторных, ультразвуковых данных, параметров цикла овариальной стимуляции.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе исследования новые научные данные позволяют обосновать применение эстроген/гестагенов как изолированно, так и в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона при подготовке эндометрия, а также демонстрируют преимущества вспомогательного хетчинга и среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты при проведении криопотокола у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием в возрасте до 35 лет.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение вспомогательного хетчинга на этапе переноса размороженного эмбриона улучшает результативность криопотоколов по частоте наступления беременности, тогда как использование среды для переноса размороженного эмбриона существенно улучшают исходы криопотоколов не только по

частоте наступления беременности, но и по частоте родов, что обуславливает необходимость расширения использования данных эмбриологических методик в программах вспомогательных репродуктивных технологий у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием.

Практическая значимость диссертации состоит в том, что изученные методики позволяют повысить эффективность криопротокола за счет проведения вспомогательного хетчинга или применения среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты, что будет способствовать повышению частоты наступления клинической беременности и живорождений при переносе размороженных эмбрионов.

Применение моделей прогноза эффективности эмбриологических методик (вспомогательный хетчинг или среда для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты) позволит врачу индивидуализировать тактику ведения при вступлении пациентки в криопротокол и повысит шансы на положительный исход. Результаты данного исследования позволяют оптимизировать подход по ведению криопротоколов у женщин с изолированным трубно-перитонеальным бесплодием на основании данных анамнеза, гормонального профиля и параметров овариальной стимуляции с помощью математического моделирования.

Разработанные в исследовании предложения и практические рекомендации могут быть внедрены в деятельность медицинских организаций, оказывающих медицинскую помощь пациентам с бесплодием. Предложенные математические модели применяются в клинической практике Центра охраны здоровья семьи и репродукции Областного перинатального центра ГБУЗ «Иркутская областная ордена «Знак почета» клиническая больница» г. Иркутск, в клинической практике центра «Мать и Дитя», г. Иркутск.

Методология и методы исследования

В период с января 2018 г. по декабрь 2022 г. было проведено открытое

нерандомизированное контролируемое исследование. Всем женщинам накануне вступления в криопротокол проводились оценка клинко-анамнестических и клинко-лабораторных данных, ультразвуковое исследование органов малого таза, исследование уровней гормонов репродуктивной системы, оценка результатов инструментальных методов исследования, параметров цикла овариальной стимуляции, в результате которого были получены криоконсервированные эмбрионы, показатели эмбриологического этапа – размораживание, перенос эмбриона, оценивались отдаленные результаты протоколов – частота наступления беременности, родов и самопроизвольных выкидышей.

Достоверность и объективность полученных результатов подтверждается репрезентативностью выборочных совокупностей объектов исследования, достаточным объемом наблюдений и использованием адекватных методов исследования. Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью методов описательной статистики, одномерного анализа с использованием как параметрических, так и непараметрических методов тестирования гипотез. Для определения вклада изучаемых параметров применялся метод логистической регрессии с последующим построением математических моделей.

Положения, выносимые на защиту

1. Частота наступления беременности и родов в циклах с переносом размороженного эмбриона сопоставима при назначении на подготовительном этапе эстроген/гестагенов или эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона у женщин до 35 лет с изолированным трубно-перитонеальным бесплодием.
2. Усовершенствование эмбриологического этапа с применением вспомогательного хетчинга и среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты при переносе размороженного эмбриона у женщин молодого репродуктивного возраста с изолированным трубно-перитонеальным бесплодием ассоциировано с повышением эффективности

программы вспомогательных репродуктивных технологий.

3. При трубно-перитонеальном бесплодии применение математических моделей с учетом данных анамнеза, гормонального профиля и параметров цикла овариальной стимуляции обеспечивает индивидуальный прогноз эффективности применения эмбриологических методик (вспомогательного хетчинга или среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты), с точностью 80 % и 76 % соответственно.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Научные положения и выводы диссертационного исследования обоснованы достаточным объёмом выполненных исследований; в работе использованы современные методы исследований, сертифицированное оборудование и реактивы. Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью адекватных методов, с применением современных статистических компьютерных программ.

Апробация результатов исследования

Материалы и основные положения диссертации доложены и обсуждены на Международной конференции молодых ученых Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (г. Иркутск, 2018); на конференции «Актуальные проблемы современной медицинской науки» в Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Иркутск, 2018); на III Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (г. Иркутск, 2019 г.); на конференции «Актуальные проблемы современной медицинской науки», посвященной 40-летию Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Иркутск, 2019 г.); на XI

Конференции акушеров-гинекологов Забайкальского края с Всероссийским участием «Здоровье женщины в XXI веке: от менархе к менопаузе» (г. Чита, 2024 г.); на VIII Межрегиональной научно-практической конференции «Байкальское лето – 2024» (г. Улан-Удэ, 2024 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту и шифру научной специальности «3.1.4. Акушерство и гинекология».

Реализация и внедрение полученных результатов

Полученные результаты внедрены в практику Центра охраны здоровья семьи и репродукции Областного перинатального центра ГБУЗ «Иркутская областная ордена «Знак почета» клиническая больница» г. Иркутск.

Материалы исследования используются для практических занятий и лекций со слушателями семинаров кафедры акушерства и гинекологии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения Российской Федерации

Публикации

По теме научно-квалификационной работы опубликовано 11 научных работ, из них 5 публикаций в ведущих научных рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, в том числе 5 работ – в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Russian Science Citation Index, Web of Science и Scopus; опубликовано одно учебно-методическое пособие; зарегистрирована база данных «Показатели персональных клинических данных и высокотехнологичных методов лечения бесплодия супружеских пар на территории Иркутской области». Свидетельство № 2020620233, зарегистрировано 07.02.2020 г.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автором работы проведен анализ отечественных, зарубежных научных источников литературы. Диссертантом самостоятельно разработана методика настоящего исследования. Организован и осуществлен сбор первичного материала – сбор данных, отбор пациенток и их подготовка к криопротоколу, оформление первичного материала, формирование и регистрация электронной базы данных. Автор принимал непосредственное участие в анализе полученных данных и подготовке публикаций. Автором диссертационного исследования лично проводилась математико-статистическая обработка результатов работы. Автором проведена аналитическая работа с последующей интерпретацией полученных результатов исследования, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, состоит из введения и 4 глав (обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты исследования, обсуждение полученных результатов), выводов, списка сокращений и библиографического списка научной литературы. Работа иллюстрирована таблицами и рисунками. Список научной литературы включает 178 источников, из них 125 источников на английском и 53 – на русском языках.

Глава 1. ВРТ В ПРЕОДОЛЕНИИ БЕСПЛОДИЯ: ПРОБЛЕМЫ И ДОСТИЖЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Социальные аспекты проблемы бесплодия

ВОЗ определяет бесплодие как заболевание репродуктивной системы, при котором достижение клинической беременности невозможно после 12 месяцев регулярной половой жизни [21]. В условиях негативной тенденции снижения рождаемости в мире, демографического старения, высокого уровня общей смертности, уменьшения числа потенциальных матерей, экономического кризиса проблема охраны репродуктивного здоровья нации приобретает особую социальную значимость [161, 162].

Во всем мире от 8-12 % пар репродуктивного возраста страдают бесплодием [72, 161, 162]. Европейское общество репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) в 2019 году опубликовало пресс-релиз, где привело следующие данные: около 20–30 % бесплодия обусловлены мужским фактором, 20–35% – женским фактором, а 25–40 % – это сочетание женского и мужского факторов бесплодия, и оставшиеся 10–20 % характеризуется как идиопатическое бесплодие [150].

В России около 65,5 % семей имеют одного ребенка и только 12,9 % семей – трех и более детей. Среди всего населения страны число женщин составляет более 53 %, из которых только 27,5 % (около 36 млн.) находятся в репродуктивном возрасте. По данным эпидемиологических исследований, в нашей стране прогнозируется не только снижение численности женщин репродуктивного возраста (20-29 лет) – с 11 млн. в 2014 году до 7,5 млн. в 2021 году, но и ухудшение репродуктивного здоровья – абсолютное количество здоровых женщин не превышает 6 %[43].

По данным исследований, в России бесплодием страдают 7-8 млн. женщин и 3-4 млн. мужчин среди населения репродуктивного возраста, в структуре бесплодия 40 % случаев приходится на мужской фактор и 45 % случаев – на женский [2, 30]. Причины женского бесплодия разнообразны, могут быть как врожденного, так и приобретенного характера – отсутствие

или непроходимость маточных труб, спаечный процесс малого таза как следствие перенесенных воспалительных заболеваний. Анализ литературы показал, что значимое место в структуре женского бесплодия занимает трубно-перитонеальная форма, с частотой от 35 до 68 % случаев [43]. Отмечено, что в нашей стране каждая 7-я супружеская пара, активно живущая половой жизнью и не использующая контрацепцию, сталкивается с проблемой бесплодия. Частота бесплодия в браке достигает 8-17 % [2, 48].

Глобальная распространенность бесплодия способствует разработке и совершенствованию методов его лечения. К эффективным способам преодоления бесплодия относят вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), когда отдельные или все этапы зачатия и раннего развития эмбрионов осуществляются вне материнского организма – *in vitro*. На сегодняшний день в мире насчитывается более 7 миллионов детей, рожденных в результате лечения методами ВРТ [60].

Показателем успешности лечения методами ВРТ или критерием эффективности лечения бесплодия является доля (% от числа пролеченных) женщин, у которых беременность подтверждена с помощью ультразвукового исследования [41]. Также в программах ВРТ учитываются частота наступления беременности в расчете на цикл, на пункцию, на перенос эмбрионов в программе ЭКО и криопротоколе [26].

Частота наступления клинической беременности и частота живорождений являются показателями эффективности и находятся в непосредственной зависимости от совершенствования методов вспомогательных репродуктивных технологий: в 2021 году, по данным ежегодного 27-го отчета регистра Российской Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ), в результате использования ВРТ наступило более 46 тысяч беременностей, из которых 30 тысяч завершились родами. Таким образом, частота наступления клинической беременности в протоколе ЭКО составила в расчете на перенос – 34,8 % и в криопротоколе в расчете на перенос размороженного эмбриона – 41,7 %. Всего с 1995 года основания регистра

РАРЧ были накоплены данные более чем о полутора миллионах циклов ВРТ, а число рожденных детей превысило 369 тысяч [25].

Таким образом, криоконсервация эмбрионов вносит глобальный вклад в показатели успешности методов вспомогательных репродуктивных технологий.

1.1 Программа ЭКО

Процедура ЭКО состоит из нескольких последовательных этапов, включающих овариальную стимуляцию, трансвагинальную пункцию фолликулов и получение ооцитов, инсеминацию ооцитов и культивирование эмбрионов, перенос эмбрионов в полость матки и поддержку посттрансферного периода [20].

Одной из современных тенденций в протоколах ЭКО является одномоментное получение большого количества эмбрионов, для последующего их рационального использования в криопротоколах [179]. Криоконсервация гамет и эмбрионов является важным аспектом ВРТ. Ее широкое применение позволило повысить безопасность и эффективность лечения протоколами ЭКО [70]. В России и Европе растет доля циклов переноса криоконсервированных эмбрионов по сравнению с циклами переноса «свежих» эмбрионов. По данным литературы было подсчитано, что более 28 % циклов ЭКО приводят к получению большого количества эмбрионов, которые после выполненного «свежего» переноса подвергаются криоконсервации [70].

В зависимости от клинической ситуации возможно применение тактики сегментации цикла или отсроченного переноса, когда после этапа культивирования сразу выполняется криоконсервация эмбрионов при нарушениях роста эндометрия в протоколе или профилактике синдрома гиперстимуляции яичников.

Выполнение криоконсервации части эмбрионов возможно при одномоментном получении их большого количества, поскольку в полость матки допустимо переносить только 1 или 2 эмбриона [20].

Недавнее систематическое исследование показало, что применение криоконсервации по новым показаниям, таким как сегментация цикла, накопление ооцитов/эмбрионов и предимплантационное генетическое тестирование на стадии бластоцисты, будет способствовать дальнейшему увеличению доли криоконсервированных циклов в ближайшем будущем [70]. В последнее десятилетие количество циклов неуклонно растет (в расчете на начатый цикл ЭКО), и соответственно, увеличивается процент рожденных детей [148]. В настоящее время криоконсервация человеческих эмбрионов как никогда важна для совокупного показателя наступления беременности после ЭКО.

Таким образом, криоконсервация эмбрионов неразрывно связана с овариальной стимуляцией и необходима не только для обеспечения безопасности и эффективности циклов стимуляции яичников при ЭКО, но и для сохранения фертильности пациенток.

1.2 Культивирование эмбрионов

После оплодотворения зигота делится путем митоза на клетки меньшего размера, которые называются «бластомеры». Ранние этапы дробления бластомеров синхронизированы, затем синхронизация теряется. При естественном зачатии у млекопитающих зигота остается в маточной трубе в течение нескольких дней, претерпевая дробление. После третьего дробления эмбрион проходит через процесс организации в морулу. На стадии 32 клеток происходят морфологические изменения, дающие начало бластоцисте. На ранних стадиях развития эмбрион покрыт блестящей оболочкой (или *zona pellucida*), которая сдерживает клетки и предотвращает слияние нескольких эмбрионов. В месте имплантации клетки трофобласты продуцируют протеолитические ферменты, которые формируют отверстие в

блестящей оболочке, за счет чего бластоциста «рождается» и вступает в физиологический контакт с эндометрием, с этого момента начинается процесс имплантации [56].

У человека бластоциста полностью погружается в эндометрий и продолжает там свое развитие, такая имплантация называется «погружная» или «интерстициальная». Условно процесс имплантации бластоцисты можно разделить на фазы – аппозиция, прикрепление и инвазия [44]. Имплантация осуществляется достаточно быстро – бластоциста погружается полностью в эндометрий за 40 часов. Дефект, образовавшийся в слизистой, восстанавливается в течение 5 дней. На 6-е сутки эмбриогенеза бластоциста прикрепляется к эпителию эндометрия [29].

В рамках проведения программы экстракорпорального оплодотворения перенос эмбрионов может быть осуществлен на 3-и сутки (стадия дробления) или 5-6-е сутки развития (стадия бластоцисты). До недавнего времени в большинстве циклов ВРТ эмбрионы переносились на стадии дробления, однако в последнее время появилась тенденция к переносу эмбриона на стадии бластоцисты [97]. При кратком пребывании эмбрионов вне организма матери влияние условий культивирования минимально, однако выбор наилучшего эмбриона затруднен, так как только при продленном культивировании проявляется полная естественная селекция эмбрионов [82].

Авторы исследования Brown J., Daya S., Matson P. в 2016 году сравнили переносы эмбрионов на 2-е и 3-и сутки развития в циклах ЭКО и не нашли четких доказательств того, что культивирование до 2-х или 3-х суток влияет на число живорождений, течение беременности, наступление клинической беременности, многоплодие, выкидыши. Данных о частоте осложнений, патологиях плода, оценках процедуры самими женщинами представлено не было. Частота наступления беременности после переноса эмбрионов на стадии 2-х и 3-х суток культивирования достоверно не различалась и составила 39 % и 38-46 % [69].

В 2018 году группой авторов под руководством Holden Emily C. было

опубликовано ретроспективное когортное исследование по сравнению эффективности переносов размороженных эмбрионов на стадии бластоцисты и на стадии дробления (более 200 тысяч эмбрионов). По результатам была выявлена связь переноса размороженных эмбрионов на стадии бластоцисты с увеличением на 68 % шансов наступления клинической беременности и снижением шансов выкидыша на 7 %. Таким образом, у пациенток, перенесших криоконсервацию, перенос эмбриона на стадии бластоцисты связан с более высокой частотой живорождения по сравнению с переносом на стадии дробления [110].

В 2021 году были опубликованы данные крупного когортного исследования из Национального регистра ЭКО Швеции, проведенного под руководством Saket Z. и соавторов, включающее почти 125 тысяч процедур, проведенных в период с 2007 по 2017 г. Исследователи пришли к выводу, что неуклонный рост рождаемости можно объяснить двумя новыми клиническими тенденциями в ЭКО: замораживание бластоцист и перенос эмбрионов на стадии бластоцисты [142]. В 2022 году анализ более 5 тысяч циклов показал, что «свежий» перенос на стадии бластоцисты связан с более высокими результатами по частоте наступления беременности при сравнении с переносом на стадии дробления [97].

В современной научной литературе широко обсуждаются оптимальная стадия развития эмбрионов для переноса и эффективность применения различных методов замораживания. Эти исследования достаточно противоречивы. Отмечена тенденция к переносу эмбрионов на стадии дробления и стадии бластоцисты. Суммируя вышеизложенное, можно сказать, что имеющиеся данные о стадии переноса размороженного эмбриона в полость матки в литературе представлены разрозненно, что требует подробного изучения.

1.3 Сравнение методов криоконсервации эмбрионов человека

Современные технологии замораживания позволяют сохранить

эмбрионы хорошего качества, не использованные для «свежего» переноса по той или иной причине в циклах ЭКО. Замораживание позволяет сохранить функциональную способность и достигнуть сопоставимых с использованием нативного материала результатов [19]. В мире существует 2 популярных метода криоконсервации эмбрионов человека: метод медленной заморозки и метод витрификации [108].

Методика медленной заморозки эмбрионов была разработана в 80-х годах XX столетия: по этой технологии эмбрионы подвергаются постепенному воздействию относительно низких концентраций криопротекторов, после чего происходит их медленное охлаждение в «программируемых замораживателях» [108].

Главной проблемой при медленном замораживании является образование кристаллов льда за счет расширения воды при температуре ниже нуля [73]. Метод витрификации биологических объектов является альтернативным методом заморозки. В основе витрификации лежит ультрабыстрая технология охлаждения, в результате которой удается избежать образования кристаллов льда, повреждающих клетку. В ходе процедуры эмбрионы сначала подвергаются воздействию высоких концентраций криопротекторов, а затем погружаются в жидкий азот. С технической точки зрения, метод витрификации проводится быстрее и не требует строгого контроля за процессом охлаждения, поэтому он очень популярен и успешно используется для замораживания как ооцитов, так и для эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития.

Оба метода перед внедрением в клиническую практику претерпели различные модификации с целью повышения эффективности, которая оценивается по влиянию консервантов на размороженный эмбрион: процент жизнеспособных эмбрионов после разморозки и их способность к имплантации при последующем переносе в матку. Выживаемость гамет и эмбрионов после криоконсервации определяется их морфологической характеристикой [19]. В эмбриологических лабораториях криоконсервацию

эмбрионов можно производить на различных стадиях развития – на стадии дробления или на стадии бластоцисты.

Анализируя данные о сравнении медленной заморозки и витрификации, авторами рекомендуется эмбрионы на стадии 6-8 бластомеров и бластоцисты замораживать методом витрификации ввиду большей выживаемости после разморозки, в то время как результаты переноса эмбрионов после медленной заморозки не всегда удовлетворительные, что приводит к увеличению количества попыток ВРТ [113]. По результатам исследований, рекомендуется метод медленной заморозки заменить на витрификацию, с точки зрения клинических результатов: таких как большая выживаемость ооцитов, эмбрионов на стадии дробления и бластоцист [134].

Детальный анализ выживаемости эмбрионов после криоконсервации показал, что выживаемость эмбрионов после девитрификации на стадии дробления и бластоцисты остается очень высокой – 93 %, по некоторым данным – достигая 100 %. Российскими авторами в 2020 году при анализе более 1300 эмбрионов установлен широкий диапазон выживаемости бластоцист при витрификации от 75 до 100 %, также выявлена прямая связь между клинической эффективностью и качеством переносимых бластоцист [18].

В современных исследованиях была изучена еще одна характеристика замораживания – длительность хранения эмбрионов на исходы протоколов ВРТ. Авторы изучили связь долгосрочного хранения эмбрионов и неонатальные исходы, полученные данные свидетельствуют об отсутствии негативной связи между временем хранения эмбрионов (более 6 месяцев) и неблагоприятными исходами для новорожденных [119]. Существует альтернативная точка зрения: некоторые авторы не рекомендуют хранить эмбрионы более 6 лет, однако в исследовании не было отмечено достоверных различий в частоте выкидышей и внематочной беременности, а также в неонатальных исходах при длительном хранении

криоконсервированных бластоцист [167]. Таким образом, по результатам литературы установлено, что длительность хранения эмбрионов не влияет на отдаленные исходы криопротоколов.

В литературе имеются данные, подтверждающие приоритет витрификации над медленной заморозкой – это большая выживаемость эмбрионов после разморозки вне зависимости от стадии их развития в момент заморозки и возраста пациентки, возможность культивирования эмбрионов после девитрификации, что позволяет отобрать эмбрионы с высоким потенциалом развития для переноса в полость матки [65].

1.4 Значение криоконсервации в лечении бесплодия

История развития экстракорпорального оплодотворения неразрывно связана с научно-техническим прогрессом, а постоянное расширение знаний и внедрение новых методик являются необходимым условием для успешного зачатия и рождения здорового ребенка. Реализация вспомогательных репродуктивных технологий стала возможной благодаря успехам медицинских и биологических наук: генетика, эндокринология, акушерство и гинекология, эмбриология, хирургия и ультразвуковая диагностика. Также для проведения различных манипуляций необходима постоянно совершенствующаяся техническая и лабораторная база.

Со времен рождения Луизы Браун во всем мире на свет появилось более 12 миллионов детей в результате применения ВРТ [85]. Революцию в области вспомогательных репродуктивных технологий совершил метод витрификации на криотопах, при котором не происходит повреждения тканей за счет отсутствия кристаллов льда, выживаемость эмбрионов после применения данного метода составила более 60-90 % [9, 55, 152]. Благодаря достигнутым успехам качество размороженных эмбрионов и их потенциал для имплантации были аналогичны тем, которые наблюдаются у свежих эмбрионов [55, 129].

Значительно расширили возможности ЭКО доктора А. Trounson и С.

Kirby, сообщившие о первой беременности после переноса размороженного эмбриона в 1985 году, успех данной процедуры связан с разработкой технологии замораживания и размораживания эмбрионов млекопитающих [9]. Развитие науки и технологического прогресса способствовало разработке нового метода «быстрой заморозки» яйцеклеток и эмбрионов – витрификации, в результате чего в 1999 году появился на свет ребенок, рожденный посредством применения данной методики [117]. В 2012 году Американское общество репродуктивной медицины (ASRM) предложило не относить криоконсервацию яйцеклеток и эмбрионов к экспериментальным методикам, а внедрить их в клиническую практику [9]. Таким образом, криоконсервация ооцитов и эмбрионов необходима не только для максимизации безопасности и эффективности циклов стимуляции яичников при ЭКО, но и для сохранения фертильности.

1.5 Основные показания для замораживания эмбрионов

Криоконсервация эмбрионов является эффективной методикой сохранения фертильности, которая может быть использована не только для медицинских, но и для социальных показаний. Возможность реализации репродуктивной функции является одним из важных факторов, определяющих качество жизни женщины. Несмотря на то что, с биологической точки зрения, оптимальное время для зачатия у женщин составляет до 35 лет, число пациенток, принимающих решение отложить материнство на более поздний период, увеличивается с каждым годом. Сохранение фертильности при «отсроченном» материнстве подразумевает замораживание ооцитов или эмбрионов для последующего их использования по желанию женщины [73]. Замораживание решает проблему сохранения и дальнейшего использования эмбрионов при одномоментном получении их большого количества, позволяет снизить частоту повторных стимуляций в программах ЭКО [55]. Криоконсервация является безопасным, широко распространенным и экономически целесообразным методом увеличения

кумулятивной частоты наступления беременности и способствует повышению частоты живорождений, где кумулятивную частоту наступления беременности определяют, оценивая результат программы в расчете на пункцию, а не на перенос [89, 129, 133, 151, 158]. Витрификация морфологически нормальных гамет не ухудшает эффективность криопротоколов и способствует сохранению фертильной функции [17]. Некоторые авторы предполагают, что криоконсервация нивелирует негативное влияние стимуляции на рецептивность эндометрия, тем самым увеличивая частоту благоприятных исходов при переносе размороженных эмбрионов при сравнении со «свежими» [147, 159].

Проведение предимплантационной генетической диагностики у пациентов в программе ЭКО предусматривает криоконсервацию эмбрионов и позволяет исключить из программы эмбрионы с ограниченным потенциалом развития [53, 67]. Заморозка эмбрионов дает возможность отсрочить время переноса эмбриона в связи с развитием или предупреждением синдрома гиперстимуляции яичников [51, 125].

Криопротокولات имеют ряд преимуществ по сравнению со «свежими» циклами ЭКО: низкие риски материнских осложнений, такие как отслойки плаценты, предлежания плаценты и преждевременных родов, ассоциированы с переносом криоконсервированных эмбрионов [169]. В отдаленных исходах – дети, рожденные в результате замораживания и размораживания эмбрионов, имели относительно меньшие риски преждевременных родов, низкой массы тела при рождении и маленького роста для возраста гестации, при сравнении со «свежими» переносами в протоколах ЭКО. Между двумя группами не было различий в риске врожденных аномалий и перинатальной смертности [124]. В другом сравнительном анализе акушерских и перинатальных исходов в криопротокколах были определены низкие риски предлежания плаценты, отслойки плаценты, низкой массы тела при рождении, преждевременных родов, малых размеров ребенка для гестационного возраста и низкие риски перинатальной смертности [146].

Таким образом, резюмируя вышеприведенные данные, можно заключить о том, что протоколы ВРТ с переносом размороженных эмбрионов безопасны как для женщины, так и для плода.

1.6 Криоконсервация и синдром гиперстимуляции яичников

Гиперстимуляция яичников является грозным осложнением овариальной стимуляции за счет последовательного введения гонадотропинов и использование хорионического гонадотропина в качестве триггера овуляции в программе ЭКО [5]. Синдром гиперстимуляции яичников характеризуется чрезмерным системным ответом на стимуляцию овуляции, с разнообразным спектром клинических и лабораторных проявлений. Патогенез этого синдрома сложен, участие в нем принимает большое количество механизмов [137].

Синдром гиперстимуляции яичников классифицируется на легкой, умеренной и тяжелой степени, в соответствии со степенью напряженности асцита, увеличения яичников, дыхательных, метаболических, гемодинамических нарушений [14].

Первостепенное значение в профилактике СГЯ имеют идентификация групп риска пациенток и формирование индивидуального подхода с учетом имеющихся данных в протоколах ЭКО. К прогностически неблагоприятным факторам развития СГЯ относятся: молодой возраст пациентки – менее 35 лет, индекс массы тела менее 18 кг/см^2 , наличие СГЯ в анамнезе, количество антральных фолликулов более 20, синдром поликистозных яичников, уровень АМГ более 3,6 нг/мл [22, 42]. При продолжающейся беременности на фоне гиперстимуляции увеличиваются риски ранних репродуктивных потерь, преждевременных родов, рождения детей со сниженной массой тела и оперативного родоразрешения [39].

Главной мерой профилактики СГЯ является криоконсервация – необходимо рекомендовать пациенткам отказаться от «свежего» переноса эмбриона и предлагать криоконсервацию всех полученных эмбрионов [128,

139]. В протоколах ЭКО основными профилактическими мерами являются: модификация протокола овариальной стимуляции (уменьшение стартовой дозы гонадотропинов, выбор «мягких» протоколов стимуляции с низкой курсовой дозой гонадотропинов, назначение преимущественно протокола с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона); замена триггера овуляции на агонист гонадотропин-рилизинг гормона; аспирация максимального числа фолликулов при трансвагинальной пункции с последующей постановкой антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона; отказ от использования поддерживающих доз хорионического гонадотропина в посттрансферном периоде в пользу прогестерона [5, 22].

В клинической практике наиболее рациональным подходом в профилактике СГЯ является отказ от «свежего» переноса и криоконсервация эмбрионов с последующим переносом размороженного эмбриона в новом менструальном цикле [59]. Так, авторы исследования Hua Chen и др. после сравнения стадии культивирования эмбрионов у пациенток с рисками гиперстимуляции рекомендуют криоконсервацию эмбрионов на 5-е сутки культивирования, как наиболее эффективную методику для профилактики гипертимуляции и одновременного повышения эффективности протоколов ВРТ [78]. Стратегия «заморозить все» у пациенток с рисками гиперответа на овариальную стимуляцию увеличивает частоту живорождений и благоприятных исходов при сравнении со «свежими» переносами [66].

Таким образом, криоконсервация является одним из главных профилактических методов синдрома гиперстимуляции яичников.

1.7 Криоконсервация и состояние эндометрия в протоколе ЭКО

В 2006 г. лауреат Нобелевской премии Роберт Эдвардс прочитал свою знаменитую лекцию под названием «Имплантация человеческого эмбриона: последний барьер ВРТ?» [86]. Ученый отметил, что многие острые проблемы уже решены, однако эндометрий остается последней преградой на пути прогресса ВРТ. Действительно, уровень имплантаций за последние 10 лет

остается относительно стабильным [90]. Эмбрионы легко имплантируются во многие участки тканей, тогда как эндометрий уникален своей способностью «блокировать» имплантацию эмбрионов, за исключением периода, когда открывается «окно имплантации или окно восприимчивости» [86].

Имплантация эмбриона – сложный процесс, требующий синхронизации рецептивности эндометрия и компетентности эмбриона, связан с влиянием множества факторов: гормонов, иммуноглобулинов, цитокинов и других веществ, направленных на устремление бластоцисты в полости матки к месту будущей имплантации, последующую адгезию и инвазию в эндометрий [37]. Считается, что «окно имплантации» у фертильных женщин выпадает на середину лютеиновой фазы, процесс происходит за счет последовательного действия стероидных гормонов: эстрадиола и прогестерона, – и длится не более 48 часов [131].

Нарушения или аномальная восприимчивость эндометрия приводят к ряду репродуктивных проблем: неудачи имплантации в циклах ВРТ, потери беременности на различных сроках гестации, риск перинатальных осложнений и преждевременных родов, осложненное течение беременности (преэклампсия, синдром задержки роста плода, плацентарные нарушения) [7, 90].

В рутинной практике клиницисты используют простые методы исследования состояния эндометрия – определение толщины эндометрия и его эхографические особенности. Особенно важно в протоколе ЭКО проводить оценку состояния эндометрия в день назначения овуляторной дозы хорионического гонадотропина (триггера) и в день назначения прогестерона в криопротоколах. Корреляция толщины эндометрия и вероятность имплантации в программах ВРТ точно не определена: однако по данным научной литературы выделяют функциональную готовность в зависимости от толщины эндометрия: менее 7 мм – субоптимальная, более 8-10 мм – оптимальная готовность [99, 114].

Практический вопрос максимальной и минимальной толщины эндометрия очень важен для переноса эмбриона. В настоящее время не существует общепризнанного определения «тонкого» или гипопластичного эндометрия – толщина варьирует от 5-7 мм, однако некоторые авторы предлагают рассматривать толщину и структуру эндометрия в качестве прогностического критерия исходов имплантации [34].

По результатам анализа 12 тысяч циклов авторы не рекомендуют выполнять перенос в программах ВРТ при толщине эндометрия 6 мм и менее и 14 мм и более. Толщина эндометрия от 8 мм до 14 мм в сочетании с 3-слойной структурой эндометрия положительно влияет на клинические показатели беременности [120]. Независимо от структуры эндометрия «толстый» эндометрий (>14 мм) не оказывал негативного воздействия на исходы протоколов ЭКО [121]. Также авторы подчеркивают, что ультразвуковой контроль толщины и структуры эндометрия в день введения триггера обязателен [120].

Ряд авторов считает, что толщина эндометрия в протоколе ЭКО является главным предиктором рецептивности эндометрия и наступления беременности в криопротоколе. Пороговая толщина эндометрия в день забора ооцитов 8,75 мм увеличивает шансы для живорождения в криопротоколе [175]. Публикация Liu et al. продемонстрировала, что оптимальные показатели клинической и продолжающейся беременности после экстракорпорального оплодотворения наблюдались при толщине эндометрия ≥ 8 мм в более чем 24 000 циклах переноса свежих эмбрионов и ≥ 7 мм в более чем 20 000 криопротоколах [122].

Таким образом, в литературе отсутствует общепризнанный подход как к определению понятия тонкого эндометрия, так и к путям, ведущим к решению этой проблемы, однако использование криоконсервации позволяет проводить подготовку эндометрия и выполнять перенос эмбриона в лучших условиях, тем самым увеличивая вероятность наступления беременности.

1.8 Криоконсервация и сохранение эмбрионов

Социальные изменения, а также растущее желание и возможности сохранить фертильность увеличили спрос на эффективные вспомогательные репродуктивные технологии. Во многих странах наблюдается тенденция «отсроченного материнства», криоконсервация позволяет рационально решать проблему сохранения и последующего использования эмбрионов по желанию женщины при одномоментном получении их большого количества. Криоконсервация и последующее сохранение эмбрионов позволяет не зависеть от циклов стимуляции и выполнять перенос в удобное для пациентки время. При анализе текущих тенденций и перспективных трендов в лечении бесплодия в РФ в реальной клинической практике выявлена тенденция к замораживанию всех полученных эмбрионов – стратегия «заморозить все», которая позволяет выполнять перенос криоконсервированного эмбриона в менструальном цикле, отличном от стимулированного [179]. Эта стратегия впервые была описана в литературе более 20 лет назад. В самых ранних публикациях ее применяли в протоколах, в которых имплантация откладывается во избежание синдрома гиперстимуляции яичников, сейчас стратегия «заморозить все» чаще используется в преимплантационном генетическом тестировании. Авторы избирательной криоконсервации и отсроченного переноса эмбрионов начали применять термин «сегментация», когда стимуляция яичников и извлечение ооцитов/эмбрионов отделены от последующего процесса переноса эмбрионов [65]. По данным авторов, субоптимальные изменения в «свежих» циклах могут привести к нарушению рецептивности эндометрия и имплантации эмбриона, а также к повышенному риску преждевременных родов и снижению веса при рождении по сравнению с естественным зачатием и криопротоколами [59].

Существует большое количество данных, показывающих, что стратегия «заморозить все» приводит к значительному улучшению исходов родов. Рандомизированное контролируемое исследование подтверждает эту

гипотезу и показывает, что более высокие показатели продолжающейся беременности были достигнуты при использовании стратегии «заморозки всех», чем при стандартных циклах ЭКО с переносом свежих эмбрионов [148].

Другие авторы исследования пришли к выводу, что одноплодная беременность после переноса замороженных эмбрионов значительно реже осложняется перинатальной смертностью, малым весом для гестационного возраста плода, преждевременными родами, низким весом при рождении и послеродовыми кровотечениями [88].

Также криоконсервация в сочетании с селективным переносом одного эмбриона способствует снижению риска многоплодных беременностей, улучшает риски материнских и перинатальных исходов [61].

Таким образом, успех стратегии «заморозить все» базируется на основных принципах: более восприимчивый эндометрий в циклах без стимуляции яичников по сравнению с циклами со стимуляцией яичников; лучшие показатели здоровья детей, рожденных от переноса размороженных эмбрионов, по сравнению с детьми, рожденными от свежих циклов; возросшие показатели наступления беременности.

1.9 Схемы подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона

Имплантация отличается сложным физиологическим взаимодействием бластоцисты и эндометрия на клеточном и молекулярном уровнях, в процесс вовлекаются структуры различные как генетически, так и иммунологически, регуляция которых осуществляется аутокринными и паракринными факторами [1].

На успешный процесс имплантации влияет большое количество причин, таких как качество переносимых эмбрионов, взаимодействие эндометрия и бластоцисты, установление между ними полноценного диалога [82]. По данным авторов, рецептивности эндометрия, или способности

эндометрия обеспечить все необходимые этапы имплантации, отводят ведущую роль в процессе имплантации [28].

Считается, что размороженные эмбрионы необходимо переносить в матку в период, соответствующий ожидаемому «окну имплантации» [154]. Под данным термином понимается промежуток времени, в течение которого бластоциста может внедриться в эндометрий с последующим наступлением беременности. В любое другое время имплантация эмбриона невозможна, поскольку эндометрий нерцептивный [80].

На основании всего вышесказанного можно констатировать, что подготовке эндометрия принадлежит важная роль, от которой напрямую зависит эффективность протокола ВРТ.

Важным фактором для наступления беременности в криопротоколах является синхронизация между развитием эмбриона и эндометрием [74]. Большинство криопереносов выполняются в гормонально-контролируемых циклах, что делает криопротокол как для пациентов, так и для центров лечения бесплодия более удобным, поскольку можно контролировать сроки переноса эмбрионов [141].

Назначение препаратов эстрогенов и прогестерона в циклах подготовки эндометрия к переносу размороженных эмбрионов или перенос эмбриона в естественном менструальном цикле не гарантирует полноценной супрессии гипофиза, поскольку может происходить спонтанная лютеинизация доминантного фолликула, что ведет к десинхронизации эндометрия и стадии развития эмбриона [116]. В этом случае протокол заместительной гормональной терапии имеет недостаток, связанный со спонтанным ростом фолликулов [170]. Кроме того, повышение уровня ЛГ на более поздней стадии протокола, подобно пику эндогенного ЛГ, может влиять на рецептивность эндометрия и снижать частоту имплантации эмбрионов [118].

Для гарантированной супрессии гипофиза и предотвращения спонтанного роста фолликулов в криопротоколах допустимо использование

агонистов гонадотропин-рилизинг гормона. Подводя промежуточные итоги, можно сказать, что «искусственные» менструальные циклы делятся на два вида – с добавлением агонистов гонадотропин-рилизинг гормона (аГнРГ) либо без [156].

Механизм действия агонистов гонадотропин-рилизинг гормона состоит из двух фаз: активации и десенситизации. В фазу активации усиливается секреция гонадотропинов: ФСГ – в 2 раза, ЛГ – в 4 раза. При продолжающемся действии препарата фаза активации сменяется фазой десенситизации. Во время десенситизации происходит потеря функциональной активности рецепторов, связанных с агонистами, и их способность отвечать на секреторные сигналы, за счет чего происходит падение уровня гонадотропинов в крови, возникает блокада функциональной активности яичников со снижением уровня эстрадиола в плазме крови на 20–30 % (ниже 100 пмоль/л), сокращается объем яичников, и уменьшаются число и размеры антральных фолликулов [38]. По результатам недавнего исследования, предварительное назначение агонистов гонадотропин-рилизинг гормона достоверно улучшило частоту живорождения в криопротоколах при сравнении с заместительной гормональной подготовкой [165]. Показаниями для подготовки эндометрия с добавлением агонистов ГнРГ явились: возраст младше 40 лет, первичное бесплодие, СПКЯ и нерегулярные менструации [165]. По данным других авторов, применение агонистов ГнРГ благоприятно влияет на результаты переноса размороженных эмбрионов у пациенток с аденомиозом [93].

Анализ литературы показал, что чаще всего рутинно в клинической практике используется заместительная гормональная терапия эндометрия для переноса размороженного эмбриона – в этом случае последовательно назначаются препараты эстрогенов и прогестерона, однако перенос в естественном цикле также имеет место [123, 135]. В исследовании Hebisha S.A. и соавт. отмечено значительное увеличение частоты имплантаций в группе агонистов гонадотропин-рилизинг гормона по сравнению с группой,

принимавшей только эстроген и прогестерон (44,1 % против 21,1 %; $p = 0,002$). Частота наступления беременности также была значительно выше в группе агонистов ГнРГ (65,5 % против 42 %, $p = 0,013$)[105].

Hill M. и соавторы в своей научной работе выяснили, что при выполнении переносов размороженных эмбрионов частота живорождений существенно выше у женщин, получавших агонисты ГнРГ в комбинации с эстрогенами и прогестероном, по сравнению с женщинами группы естественного цикла [109]. Крупномасштабное ретроспективное исследование продемонстрировало улучшение показателей живорождения при добавлении агонистов гонадотропин-рилизинг-гормона в протокол заместительной гормональной терапии в циклах переноса замороженных и размороженных эмбрионов у пациенток без эндометриоза [157]. Ретроспективный когортный анализ 1003 криоциклов в зависимости от этиологии бесплодия (трубное бесплодие, СПКЯ, эндометриоз, мужское бесплодие и необъяснимое бесплодие) сравнил уровни живорождения. Полученные результаты свидетельствуют о повышении эффективности криопротоколов при назначении агонистов гонадотропин-рилизинг гормона при всех протестированных типах бесплодия, особенно у женщин с поликистозом яичников [164].

Но существует и альтернативная точка зрения на эффективность протоколов подготовки с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона. Результаты пилотного исследования подтверждают предположение о том, что для женщин с овуляторным циклом, подвергающихся переносу размороженных эмбрионов, результаты имплантации и живорождения аналогичны при использовании протокола с агонистами ГнРГ и протокола заместительной гормональной терапии [127]. Также обе схемы подготовки эндометрия не показали существенных различий в частоте имплантаций и живорождений у женщин с разными причинами бесплодия и неудачными протоколами ВРТ в анамнезе [83]. Некоторыми авторами было доказано отсутствие статистически значимых различий по частоте наступления

беременностей и частоте выкидышей при сравнении схемы подготовки эндометрия препаратами эстрогена и прогестерона и схемы подготовки с назначением агонистов гонадотропин-рилизинг гормона [145]. В ряде ретроспективных исследований установлено, что частота наступления беременности и родов живым плодом в криопротоколах сопоставима при переносе эмбрионов в естественном цикле и в цикле с использованием гормонотерапии в сочетании с назначением агонистов ГнРГ [94, 99]. В 2020 году авторами была изучена эффективность 288 криопротоколов при назначении гормональной терапии (препараты эстрогена и прогестерона) и в естественном цикле. Полученные результаты не показали значимых различий по частоте наступления беременности при использовании данных протоколов (41,2 % и 30,0 %, $p=0,08$) [38]. При анализе 722 криопротоколов сравнение схемы подготовки эндометрия препаратами эстрогенов и прогестерона при переносе одиночной бластоцисты не имеют различий по частоте живорождений с естественным циклом (50,0 % и 47,61 %, $p=0,3$) [112]. Кокрейновский обзор также не нашел достаточных доказательств в поддержку использования одного режима подготовки эндометрия перед другим в криопереносе у женщин с регулярными овуляторными циклами [96].

Безусловно, подготовка эндометрия к переносу размороженного эмбриона в криопротоколах играет важную роль в наступлении беременности, однако каждый из существующих протоколов имеет свои преимущества и недостатки [71]. Несмотря на это возможность приблизить состояние эндометрия к «характерному» для естественного менструального цикла делает технологию переноса размороженных эмбрионов более совершенной. Существует ряд исследований, сравнивающих схемы подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона с противоречивыми результатами, которые не позволяют выделить тот или иной протокол подготовки эндометрия.

Таким образом, в настоящее время нет данных, подтверждающих

преимущество одного метода подготовки эндометрия над другим, отсутствуют единые подходы к переносу размороженного эмбриона, что обуславливает актуальность нашего исследования.

1.10 Эмбриологические методики: вспомогательный хетчинг и среда для переноса эмбриона с высоким содержанием гиалуроновой кислоты

До оплодотворения блестящая оболочка (или *zona pellucida*), окружающая ооцит млекопитающего, действует как видоспецифический барьер для сперматозоидов и участвует в их связывании. Блестящая оболочка имеет двухслойную структуру: внешняя сторона утолщена, внутренняя оболочка отличается меньшей толщиной и упругостью. После оплодотворения блестящая оболочка играет значимую роль в блокировании полиспермического оплодотворения и механически защищает целостность преимплантационного эмбриона во время раннего развития [102]. Утолщение блестящей оболочки происходит естественным образом после оплодотворения, чтобы обеспечить эти функции.

Во время зачатия *in vivo* самопроизвольный хетчинг происходит на 5-6-й день развития эмбриона путем спонтанного разрыва оболочки и выхода бластоцисты через образованную щель. Разрыв блестящей оболочки обусловлен либо выделением протеолитического фермента «катепсина» клетками трофэктодермы, либо бластоциста увеличивается в размерах и механически разрывает оболочку. Чтобы освободиться от надорванной оболочки, бластоциста затрачивает некоторое время (от нескольких часов до суток) [130].

В циклах ВРТ можно наблюдать ооциты и эмбрионы с нарушенной блестящей оболочкой – с ее уплотнением, деформацией или изменением строения [56]. Также имеются данные, что утолщение или затвердевание блестящей оболочки может провоцироваться условиями культивирования или заморозкой эмбрионов [115].

Согласно клиническим рекомендациям по ВРТ, термин «вспомогательный хетчинг» называет микроманипуляцию, которая заключается в рассечении блестящей оболочки ооцита или эмбриона с целью получения материала для проведения преимплантационного генетического тестирования или для облегчения «вылупления» эмбриона [20].

Экспериментально было доказано, что в некоторых случаях измененная блестящая оболочка затрудняет выход эмбриона, что негативно влияет на исход программы ВРТ [16, 56, 102]. Jacques Cohen (1990 г.) одним из первых отметил, что неспособность бластоцисты выйти из прозрачной оболочки может быть одним из факторов неудачной имплантации у человека при проведении ЭКО [56]. Авторы исследований также отметили, что у некоторых эмбрионов может наблюдаться снижение или даже полная неспособность секретировать «фактор вылупления» – лизин, независимо от условий культивирования, которые могут препятствовать нормальному хетчингу [115].

В эмбриологической практике распространены методы лазерного, механического, химического и ферментативного хетчинга.

В 1988 г. было проведено первое механическое надсечение, или «хетчинг», блестящей оболочки эмбриона при помощи микроманипуляционной техники с последующим успешным наступлением беременности. Впервые механический вспомогательный хетчинг был произведен и описан Jacques Cohen и соавторами в 1990 г., данный метод носил название «частичное рассечение блестящей оболочки» [56]. Уже в 1991 г. D. Palanker предложил использование лазера для проведения «хетчинга» эмбрионам [9].

В современной эмбриологии широко используется лазерный хетчинг – когда лазерные импульсы ультракороткой длительности для микрохирургии прозрачной оболочки эмбрионов на разных сроках их преимплантационного развития разрушают блестящую оболочку в контролируемом объеме; импульсы локализованы во времени и пространстве, что позволяет

формировать отверстие именно в том месте, которое является наиболее предпочтительным, и таким образом управлять началом и местом процесса вылупления эмбриона [84]. В своем исследовании автором Захарченко Е.О. и соавт. установлено, что утончение половины окружности блестящей оболочки путем воздействия лазерного хетчинга и единичная лазерная перфорация оболочки ускоряли начало вылупления эмбрионов. Для выхода из блестящей оболочки эмбрионы всегда использовали вспомогательное отверстие, сделанное лазером, и не образовывали новых отверстий [15]. Авторы некоторых работ показали, что рассечение зоны пеллюцида с помощью лазера значительно увеличивает уровень имплантации и беременности по сравнению с контролем [68, 92]. А непосредственное проведение вспомогательного лазерного хетчинга размороженной бластоцисте не оказывает неблагоприятного воздействия на акушерские или перинатальные исходы в дальнейшей перспективе [87]. С другой стороны, имеется ряд работ, указывающих на одинаковую клиническую эффективность лазерного хетчинга в криопротоколах и «свежих» переносах [57].

На сегодняшний день однозначно не установлено, существует ли связь между проведением вспомогательного хетчинга и наступлением многоплодной беременности, можно предположить, что за счет повреждения зоны пеллюцида создается высокий риск потери межклеточных соединений между клетками внутриклеточной массы, вследствие чего возможно образование другого идентичного эмбриона.

В исследовании 2020 года было проанализировано более 2 тысяч циклов ВРТ, где проводилось сравнение эффективности лазерного хетчинга у криоконсервированных и «свежих» эмбрионов. Авторами не было выявлено достоверных различий по частоте зачатия, имплантации, клинической беременности и частоте многоплодных беременностей [130].

Абсолютно новым подходом к вспомогательному хетчингу является технология ферментативного хетчинга, которая позволяет полностью

удалить блестящую оболочку эмбриона с помощью воздействия фермента «проназа». Описаны следующие преимущества данного метода: полное удаление блестящей оболочки, что позитивно влияет на эффективность программ ВРТ и снижает риск монозиготной многоплодной беременности [12]. В 2019 году авторами Долгушиной Н.В. и соавт. были опубликованы данные сравнительного анализа лазерного и ферментативного хетчинга. Показаниями к проведению вспомогательного хетчинга были определены следующие параметры: уровень АМГ – менее 2 нг/мл и число полученных бластоцист – менее 4 штук. Результатами исследования стало увеличение частоты наступления клинической беременности в 1,9 раза при использовании ферментативного хетчинга, по сравнению с частичным удалением блестящей оболочки, также было зафиксировано снижение риска многоплодной беременности в 2 раза [12]. Однако использование проназного хетчинга требует от эмбриолога высокой скорости работы и точности выполнения методики, поскольку увеличение времени экспозиции раствором приводит к грубым морфологическим нарушениям трофэктодермы.

Согласно клиническим рекомендациям по диагностике и лечению женского бесплодия в РФ, показаниями для использования вспомогательного хетчинга являются [21]:

- изменение морфологии блестящей оболочки эмбриона;
- перенос криоконсервированных эмбрионов;
- необходимость биопсии эмбриона для проведения преимплантационного генетического тестирования;
- плохой прогноз (предыдущие неудачные попытки ЭКО, эмбрионы низкого качества).

Таким образом, проведение вспомогательного хетчинга способствует более раннему выходу бластоцисты из блестящей оболочки и сдвигу окна имплантации, часто наблюдаемому в циклах ВРТ. Истончение блестящей оболочки или ее удаление может приводить к улучшению взаимодействия между бластоцистой и эндометрием посредством метаболитов, факторов

роста и других мессенджеров. Анализируя все аспекты применения вспомогательного хетчинга, мы пришли к выводу о целесообразности подробного рассмотрения данной эмбриологической методики в нашем исследовании. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения показаний к проведению вспомогательного хетчинга и изучения его влияния на уровень живорождения.

На сегодняшний день имеется большой выбор культуральных сред, как универсальных, так и специализированных, для культивирования эмбрионов на разных этапах развития. Выбор среды определяется опытом и собственными предпочтениями эмбриологической лаборатории, соотношением цены и качества. Все среды, используемые для переноса эмбрионов, стерильны, поддерживают гомеостаз, имеют стабильную pH и осмолярность, нетоксичны, проходят тест-контроль на мышинных эмбрионах, в своём составе содержат все необходимые компоненты для развития эмбрионов, в том числе человеческий альбумин. В состав среды для переноса «EmbryoGlue» входит гиалуроновая кислота (гиалуронан) в высокой концентрации, за счет чего повышается ее вязкость, сахараиды и аминокислоты в составе необходимы для поддержания эмбриона во время переноса и имплантации, рекомбинантный альбумин является источником белка, гентамицин добавлен в качестве антибактериального агента [149].

Гиалуроновая кислота представляет собой внеклеточный гликозаминогликан, обнаруженный в большинстве типов внеклеточного матрикса млекопитающих. Гиалуронан – важная молекула, играющая множество ролей в клеточной физиологии, которая часто связана с ремоделированием тканей. Изменения уровней накопления молекул гиалуронона в эндометрии зависят от фазы менструального цикла – так, максимальные концентрации данной молекулы были зафиксированы во время средне-пролиферативной (5–10-й день) и средне-секреторной фазы (19–23-й день) цикла, что соответствовало времени быстрой клеточной пролиферации недифференцированных клеток. Вторая фаза совпадает со

временем, когда имплантация будет инициирована в фертильном цикле. Резкие изменения в концентрации гиалуронана и его корреляция с циклическим ростом и ремоделированием эндометрия человека позволяют предположить важную роль гиалуронана в физиологии эндометрия [58, 143].

Склеивающие соединения в средах для переноса эмбрионов активно используются в программах ВРТ с начала 2000-х годов. Начало исследованиям по изучению влияния гиалуроновой кислоты положил профессор Nobuo Yaegashi и др., в 1995 предположил положительное влияние гиалуроновой кислоты на экспрессию рецепторов CD44 в эндометрии, которые вовлечены в имплантацию оплодотворенной яйцеклетки [166].

В доступной для изучения литературе имелись неоднозначные и противоречивые данные о применении культуральной среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в свежих циклах ЭКО. В одном из первых клинических исследований в 1999 году группа ученых под руководством David K. Gardner отметила положительное влияние гиалуронана в сочетании с альбумином в среде для переноса на показатели развития и имплантации эмбрионов мыши [91]. В последующих работах оценивалось влияние культуральных сред с гиалуронаном на эмбрионы человека. В 2008 году в РКИ подверглись анализу более 1 200 циклов ЭКО, проведенных с применением культуральной среды, содержащей гиалуроновую кислоту с переносом 3 и 5 суточных эмбрионов. Так, авторами было выявлено увеличение частоты клинической имплантации у женщин старшего репродуктивного возраста (35+), повышение эффективности протоколов у женщин с неудачами ЭКО и при переносе эмбрионов низкого качества [153]. Некоторые авторы рекомендуют переносить эмбрионы на стадии дробления в среде с высоким содержанием гиалуроновой кислоты для увеличения скорости имплантации [101]. Либо применять данную среду для переноса у курящих женщин старшего репродуктивного возраста для повышения эффективности протоколов ВРТ [136].

В 2012 году группа исследователей из Китая отметила снижение вероятности наступления внематочной беременности и достоверное улучшение имплантации (30,4 % против 18,8 %) и частоты многоплодной беременности (34,9 % против 20,5 %) при использовании культуральной среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в программах ЭКО/ИКСИ [160].

В проспективном исследовании «случай-контроль» анализ 100 циклов ЭКО показал, что при использовании среды «EmbryoGlue» происходит увеличение частоты наступления беременности у пациенток с неудачными попытками имплантации в анамнезе [149].

Авторами Поповой О.О. и др. были подвергнуты анализу результаты более 800 криопереносов, где группы сравнения различались по среде переноса – среда с высоким содержанием гиалуроновой кислоты показала большую эффективность по частоте наступления беременности и имплантации, при сравнении со стандартной средой для переноса [39].

Авторы кокрейновского обзора в 2022 году, с участием более 4 тысяч женщин, отметили увеличение шансов наступления беременности при использовании среды с гиалуроновой кислотой для переноса эмбрионов в программах ЭКО с аутологичными ооцитами [107]. В 2024 году авторы ретроспективного когортного исследования изучили влияние среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты на результаты вспомогательных репродуктивных технологий в 1 298 циклах. Исследование было сосредоточено на показателях живорождения, клинической беременности и частоте выкидышей между группой стандартного лечения и группой среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в циклах переноса замороженных эмбрионов. Результаты исследования показали более высокие показатели живорождения (60,6 % против 47,5 %) и клинических беременностей (69,5 % против 57,6 %) в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты, что коррелирует с такими факторами, как возраст пациента и перенос бластоцисты. Эти результаты

подчеркивают потенциал данной культуральной среды в повышении показателей среди программ ВРТ [62].

Однако существует альтернативное мнение – ряд авторов не рекомендует рутинное использование «EmbryoGlue» при переносе эмбрионов в циклах ЭКО в сравнении с «традиционной» культуральной средой, отмечая отсутствие различий по эффективности программ [140]. В 2008 году Hazlett W.D. и соавторы не выявили достоверных различий между переносом 3- и 5-суточных эмбрионов на стандартной среде и среде «EmbryoGlue» [104].

В 2012 году исследователи Check J.H. и Summers-Chase D. оценили использование среды «EmbryoGlue» в программах ЭКО с использованием своих или донорских ооцитов у женщин, которые имели три и более неудачные попытки ЭКО в анамнезе. Было установлено, что среда «EmbryoGlue» не увеличила частоту наступления беременности или имплантации. Женщины, у которых перенос эмбрионов выполнялся с использованием стандартной среды для переноса, показали большую частоту родов живым плодом (39,3 %, против 14,3 %) [77].

В 2019 году было проведено ретроспективное сравнительное контролируемое исследование эффективности криопереноса эмбрионов у 427 пациентов с использованием «EmbryoGlue» либо с применением стандартной среды для переноса. Авторами исследования установлено, что культуральная среда «EmbryoGlue» не обладает выраженными преимуществами в плане увеличения частоты наступления беременности [31]. Также учеными были проведены исследования, оценивающие эффективность разных уровней концентрации гиалуронана в культуральных средах. При сравнении эффективности разных уровней концентрации гиалуронана (низкой и высокой) в среде для переноса в свежих и замороженных циклах не были выявлены значимые различия по частоте имплантаций, родов и абортов [132].

В одноцентровом рандомизированном исследовании, при анализе 731

цикла ЭКО, при использовании среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты не было выявлено статистических значимых различий в частоте живорождения при сравнении с группой контроля (традиционная среда) при переносе свежих и замороженных культур, не было выявлено статистических значимых различий и при переносе эмбрионов на стадии дробления или бластоцисты. Между исследуемыми группами не было различий в частоте имплантации, выкидышей, внематочной или многоплодной беременности [79]. Также не было получено достоверных различий по частоте наступления беременности и родов при использовании среды с гиалуроновой кислотой в разных возрастных подгруппах в криопротоколе [13].

Во всех вышеприведенных исследованиях ученые стремятся к повышению результативности программ ВРТ путем определения группы пациентов, которым показано проведение вспомогательного хетчинга или использование культуральной среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты, однако представленные данные требуют дальнейшего изучения данных эмбриологических методик. Еще одной из нерешенных проблем остается отсутствие стандартизированных протоколов гормональной подготовки эндометрия, что обуславливает цель нашего исследования.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика базы и объект исследования

Характеристика базы исследования

Исследование выполнено в период с января 2018 г. по декабрь 2022 г. в Центре охраны здоровья семьи и репродукции Областного перинатального центра ГБУЗ «Иркутская областная ордена «Знак почета» клиническая больница» г. Иркутск. Научный руководитель – заведующая Центром охраны здоровья семьи и репродукции, д.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, Е.Б. Дружинина. Заведующая кафедрой – д.м.н., профессор Н.В. Протопопова.

В работе с пациентками соблюдались этические принципы Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, изменения внесены на 64-й Генеральной Ассамблее ВМА, Форталеза, Бразилия, октябрь 2013), ФЗ РФ от 21 ноября 2011 г. №323 ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» и «Правила клинической практики в Российской Федерации» от 19.06.2003 г. Приказ МЗ РФ № 266. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №10 от 30 ноября 2017 года).

Объект исследования

Для достижения цели исследования и решения поставленных в настоящей работе задач проведено открытое нерандомизированное контролируемое испытание с участием 1 676 женщин, обратившихся в Центр охраны здоровья семьи и репродукции, у которых ранее была проведена программа ЭКО, в результате последней были криоконсервированы эмбрионы и планировался перенос эмбрионов (криопротокол). Отбор пациенток происходил путем анализа анамнестических данных на приеме

врача акушера-гинеколога (репродуктолога) с использованием данных компьютерной базы Центра охраны здоровья семьи и репродукции среди пациенток, которые хранили замороженные эмбрионы. В результате обследования были выявлены 404 женщины, которые имели изолированный трубно-перитонеальный фактор бесплодия. Из 404 женщин согласились принять участие в исследовании и вступить в протокол переноса размороженного эмбриона (криоперенос) 360 женщин, оставшиеся 44 женщины отказались от участия в исследовании и продолжили хранение эмбрионов (рисунок 1).

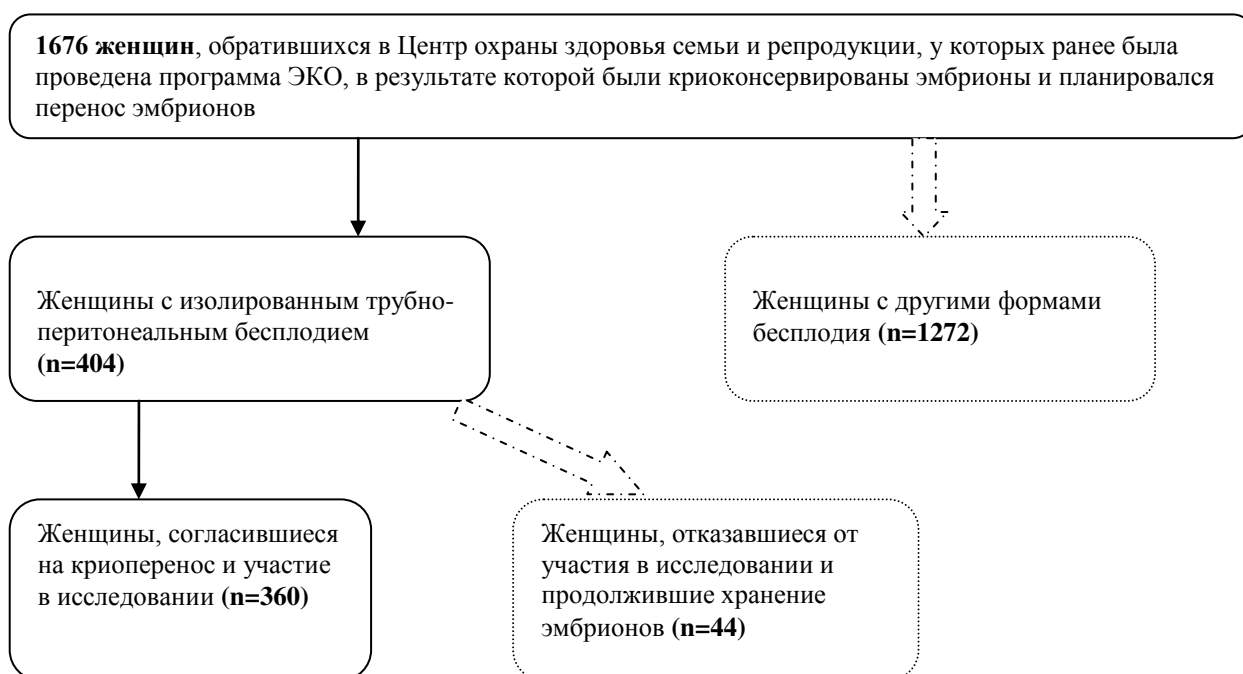


Рисунок 1 – Диаграмма включения пациенток

Из 360 женщин сформированы 4 клинические группы в зависимости от схемы подготовки эндометрия и эмбриологического этапа: в **1-ю группу** вошли 63 пациентки, у которых подготовка эндометрия в криопротоколе проводилась препаратами **эстрогенов и гестагенов**; во **2-ю группу** вошли 28 пациенток, у которых подготовка эндометрия в криопротоколе проводилась препаратами эстрогенов и гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона; в **3-ю группу** вошли 122 пациентки, у

которых в криопротоколе выполнялся перенос размороженного эмбриона с проведением вспомогательного хетчинга; в **4-ю группу** вошли 147 пациенток, у которых в криопротоколе перенос размороженного эмбриона выполнялся с использованием среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты.

При формировании групп в качестве **критериев включения** использован набор условий: наличие замороженных эмбрионов, полученных при овариальной стимуляции с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона у женщин с изолированным трубно-перитонеальным бесплодием; возраст от 18 до 35 лет включительно; отсутствие тяжелой соматической патологии.

В качестве критериев исключения были определены следующие условия: возраст младше 18 лет и старше 36 лет включительно; наличие других факторов бесплодия; хронический эндометрит; наружный генитальный эндометриоз, аденомиоз; миома матки, аномалии матки; новообразования органов репродуктивной системы; образования гипофиза; кисты яичников; мужское бесплодие; другие формы женского бесплодия, ожирение, отсутствие замороженных эмбрионов; использование любого донорского материала (донорские ооциты, сперматозоиды и эмбрионы); все состояния, при которых проведение программы ЭКО и вынашивание беременности были противопоказаны.

Критерии постановки диагноза «трубно-перитонеальное бесплодие»:

- результаты гистеросальпингографии (нарушение проходимости маточных труб);
- результаты лапароскопии: удаление одной или обеих маточных труб, операции по поводу восстановления проходимости маточных труб (при ненаступлении беременности в течение 1 года), спаечный процесс малого таза.

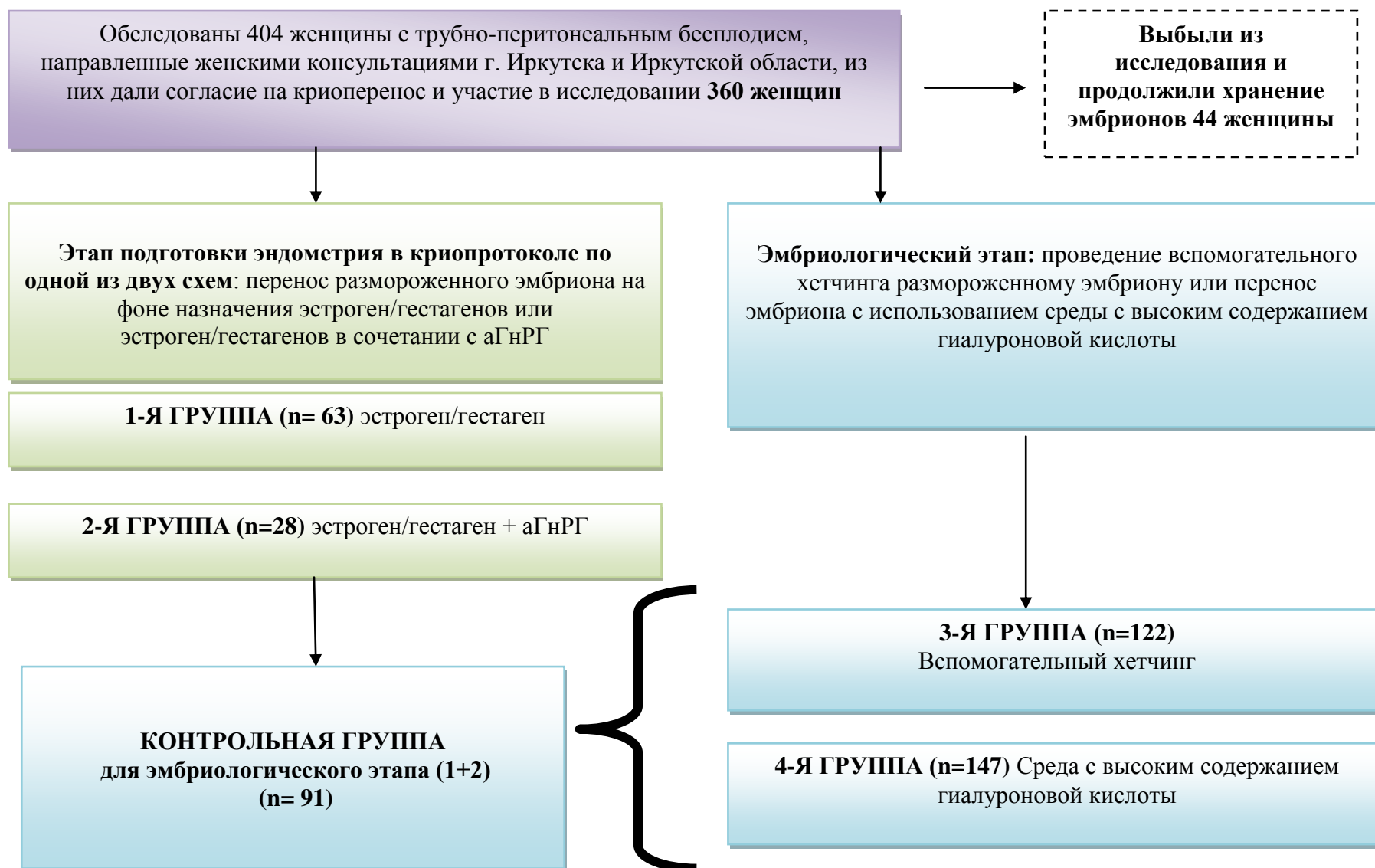
Все женщины перед вступлением в криопротокол были обследованы согласно приказу МЗ РФ 107н от 30.08.2012 «О порядке использования

вспомогательных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»; приказу МЗ РФ 803н от 31.07.2020 «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»; обследованы согласно клиническим рекомендациям «Женское бесплодие, современные подходы к диагностике и лечению» (Москва, 2024) и «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация» (Москва, 2019) [20, 21, 40, 41]. Программа переноса размороженного эмбриона (криоперенос) проводилась только при наличии письменного заявления пациентов.

Настоящее исследование включало в себя два основных этапа (таблица 1): **на этапе подготовки эндометрия (первый этап)** проводилась оценка эффективности криопротокола в зависимости от схемы подготовки эндометрия между 1-й группой (препараты эстроген/гестагенов) и 2-й группой (препараты эстроген/гестагенов + аГнРГ).

На эмбриологическом этапе (второй этап) проводилась оценка эффективности криопротокола в зависимости от эмбриологических технологий: вспомогательный хетчинг и перенос размороженного эмбриона с использованием среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты (3-я и 4-я группа – вспомогательный хетчинг и гиалуроновая кислота соответственно). По результатам первого этапа подготовки эндометрия из двух групп была сформирована одна **контрольная группа** для эмбриологического этапа (1+2 группа).

Таблица 1 – Дизайн исследования



2.2 Методы исследования

В группах исследования оценивались акушерский, гинекологический и андрологический анамнез, данные объективного соматического и гинекологического обследования, показатели лабораторных и инструментальных методов исследования. Кроме того, у всех женщин исследуемых групп ретроспективно проводился анализ программ ЭКО, в результате которых были получены и криоконсервированы эмбрионы (овариальная стимуляция, оплодотворение, эмбриологический этап, перенос эмбриона, криоконсервация) и проспективно оценивался криопротокол (подготовка эндометрия, разморозка, эмбриологический этап, перенос).

Лабораторные методы исследования

Лабораторная оценка гормонального статуса исследуемых пациенток осуществлялась *не позднее 6 месяцев до проведения программы ЭКО и криопереноса*. На 2-4-й день менструального цикла в сыворотке крови определялся уровень гормонов – ФСГ, ЛГ, пролактин, характеризующих работу гипоталамо-гипофизарной системы; ТТГ, Т₄, Анти-ТПО, характеризующих работу щитовидной железы; эстрадиол, антимюллеров гормон, тестостерон свободный, 17-ОН-прогестерон, ДГЭА-сульфат, характеризующие работу яичников и надпочечников. Прогестерон определялся в сыворотке крови на 20-22-й день цикла. После переноса эмбриона в полость матки в отделении проводилось первичная биохимическая диагностика беременности путем определения β-ХГЧ иммуноферментным анализом в сыворотке крови.

Исследования гормонального статуса проводились непосредственно в лаборатории Центра охраны здоровья семьи и репродукции Областного перинатального центра ГБУЗ «Иркутская областная ордена «Знак почета» клиническая больница» г. Иркутск. Концентрацию гормонов определяли с использованием иммунохемилюминесцентных тест-систем фирмы «Siemens Healthcare Diagnostics Inc.» (США) на автоматическом анализаторе «Immulite 2000» этой же фирмы. Уровень антимюллерова гормона определялся с

использованием иммуноферментного твердофазного анализа (Beckman Coulter MIS/AMH ELISA, USA) по принципу ферментно-усиленного «двухступенчатого» сэндвич-иммуноанализа. В таблице 2 указаны нормативные показатели концентрации гормонов.

Таблица 2 – Нормативные показатели концентрации гормонов

Гормон крови	Нормативный показатель
ЛГ, mIU/ml	Фолликулиновая фаза: 1,1–11,6 Середина цикла: 17–77 Лютеиновая фаза: 1,1–14,7
ФСГ, mIU/ml	Фолликулиновая фаза: 2,8–11,3 Середина цикла: 5,8–21 Лютеиновая фаза: 1,2–9,0
Пролактин, ng/ml	1,9–25
Эстрадиол, pg/ml	Фолликулиновая фаза: 9–160 Лютеиновая фаза: 27–246
Прогестерон, ng/ml	Фолликулиновая фаза: 0,1–1,13 Лютеиновая фаза: 0,95–21
Тестостерон, ng/dl	10–118
ДГЭА-С, mg/dl	35–430
Т4 свободный, ng/dl	0,8–2,5
ТТГ, mIU/ml	0,4–4,0
Антитела к ТПО, IU/ml	До 50 лет: < 35 После 50 лет: < 100
17-ОН прогестерон, ng/ml	0,1–0,8
Антимюллеров гормон, ng/ml	1–2,5

С целью исключения диагноза «хронический эндометрит» пациенткам выполнялось гистологическое и иммуногистохимическое исследование эндометрия, с определением CD-138, на базе ГБУЗ «Иркутская областная орден «Знак почета» клиническая больница» г. Иркутск.

Ультразвуковой метод исследования

Ультразвуковое исследование органов малого таза выполнялось на 2–3-й день спонтанной менструации или менструально-подобной реакции на аппарате «Voluson E8» (General Electric Company, США) с использованием трансвагинального датчика (IC9-RS – внутривлагалищный датчик, частота 2.9 – 9.7 МГц для акушерства, гинекологии и урологии). УЗИ-мониторинг включал в себя определение количества антральных фолликулов диаметром

2–10 мм; средний диаметр фолликула (половина суммы его двух перпендикулярных размеров); и толщину эндометрия (М-Эхо). Наблюдение за ростом фолликулов и эндометрия осуществлялось путем выполнения УЗИ органов малого таза через каждые 1-2 дня, до дня введения овуляторной дозы хорионического гонадотропина. Адекватным ростом фолликула считалось увеличение его диаметра на 2 мм в сутки, эндометрия – на 1 мм в сутки. В криопротоколе ультразвуковой мониторинг состояния эндометрия (М-эхо, трехлинейная структура) проводился со 2–3-го дня менструального цикла; при достижении толщины эндометрия 8 мм и более выполнялся перенос размороженного эмбриона.

Анализ цикла овариальной стимуляции, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы

При анализе цикла овариальной стимуляции, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы, учитывались протоколы стимуляции, начальные и курсовые дозы гонадотропинов, также проводилось ультразвуковое динамическое мониторирование роста фолликулов и эндометрия. Дозы гонадотропинов и длительность стимуляции подбирались с учетом анамнеза пациенток, данных динамического ультразвукового исследования. В протоколе ЭКО с целью предотвращения преждевременной овуляции проводилось введение антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона при достижении одним фолликулом диаметра 14–15 мм либо на 5–7-й день стимуляции. Препарат «Цетрореликс ацетат» в дозе 0,25 мг вводился подкожно. Для финального созревания ооцитов пациентке назначался триггер овуляции – хорионический гонадотропин («Хориогонадотропин альфа») в дозировке 6 500 МЕ, при условии достижения 3 и более фолликулов диаметром > 17 мм. При этом толщина эндометрия по УЗИ составляла минимум 8 мм.

После идентификации пациентки в условиях операционной через 35–36 часов в асептических условиях под кратковременным внутривенным наркозом под контролем УЗИ проводилась трансвагинальная пункция

фолликулов и аспирация ооцитов, с использованием одноразовых игл марки «СООК» (Австралия). Аспирированная фолликулярная жидкость поступала под отрицательным давлением в диапазоне 90–100 мм водного столба по вакуумной линии аспирационной иглы в подогретые стерильные пробирки, содержащие среду с гепарином (2500 ЕД/мл) для предотвращения образования кровяных сгустков, находящиеся в термоблоке, с последующей передачей эмбриологу через передаточное окно.

В условиях эмбриологической лаборатории проводились преинкубация *in vitro*, оплодотворение ооцитов, культивирование эмбрионов и криоконсервация на линейке сред фирмы «СООК» (Австралия) в настольном инкубаторе планшетного типа «PLANER» («ORIGIO», Дания), на трехкомпонентной газовой смеси.

После аспирации проводилась морфологическая оценка ооцитов – эмбриологом учитывались внешний вид полученных ооцит-кумулюсных комплексов, их прозрачность, размер и степень разрыхления клеток кумулюса и лучистого венца. Полученные ооциты делились на незрелые (MI), зрелые (MII) и герминальный везикул (GV) [23, 32].

Через 2-4 часа после трансвагинальной пункции в эмбриологической лаборатории выполнялось оплодотворение методом ЭКО (IVF). Затем эмбриолог проводил оценку качества культивируемых эмбрионов: на 1-й день культивирования оценивалось наличие признаков оплодотворения и качество зигот (рисунок 2). Оплодотворение определялось как нормальное при наличии двух пронуклеусов и 2 полярных тел через 14–16 часов после ЭКО [19].

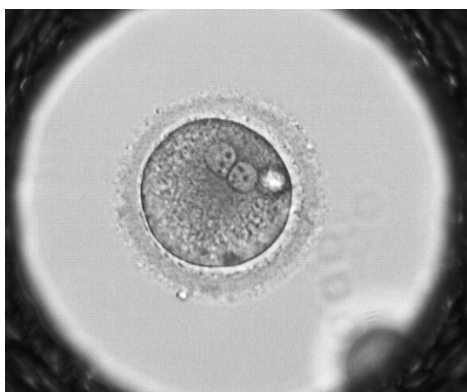


Рисунок 2 – Первый день культивации. Зигота. Стадия 2 рп

На 3-и сутки оценивалось качество эмбрионов: форма, количество, размер бластомеров, степень фрагментации (рисунок 3).

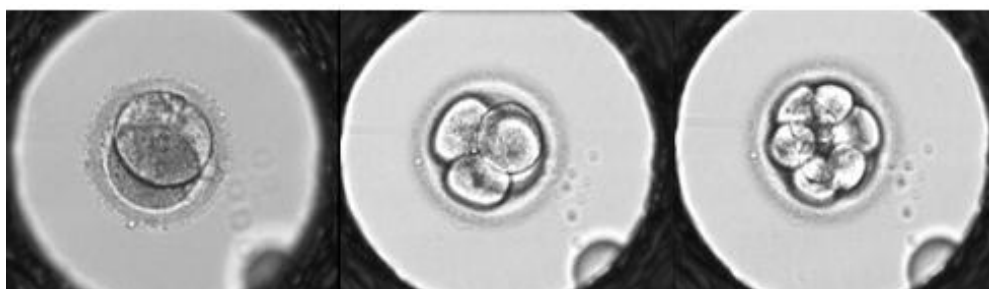


Рисунок 3 – Эмбрионы. Стадия развития 2, 4 и 8 бластомеров соответственно

Согласно классификации Стамбульского консенсуса от 2011 года на 3-и сутки культивирования проводилась оценка степени фрагментации эмбрионов по типам А, В, С, D и Deg [8].

- Где тип А – эмбрионы отличного качества, фрагментация менее 10 %.
- Тип В – эмбрионы хорошего качества, фрагментация 10-25 %.
- Тип С – эмбрионы низкого качества, фрагментация 25-50 %.
- Тип D – эмбрионы плохого качества, фрагментация более 50 % или тотальная вакуолизация.
- Тип Deg – эмбрион с признаками гибели большей части клеток (темная цитоплазма, разрушенные клеточные мембраны, аморфность).

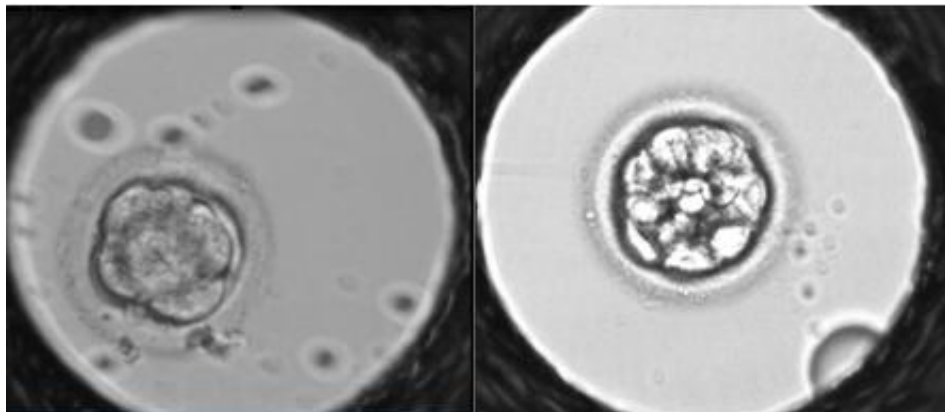


Рисунок 4 – 4-суточный эмбрион; морула. Кавитирующая морула

На 4-е сутки развития (рисунок 4) проводилась оценка компактизации эмбриона (Тао et al., 2002, с модификациями[8]:

- а (M4 по Тао) – все бластомеры участвуют в компактизации, фрагменты отсутствуют;
- б (M3 по Тао) – не менее 75 % бластомеров компактизованы, эмбрион сферической формы;
- с (M2 по Тао) – 50-75 % бластомеров компактизованы, эмбрион несферической формы, с перетяжкой, с фрагментацией;
- д (M1 по Тао) – менее 50 % бластомеров компактизованы, эмбрион несферической формы с фрагментацией.

На 5-е сутки культивирования бластоцисты (рисунок 5) оценивались степень зрелости, внутриклеточная масса, трофэктодермальный слой (Gardner D. et al., 1999) [8].

Классификация оценки степени зрелости бластоцисты:

- 1-я степень – ранняя бластоциста, полость бластоцисты меньше половины объема эмбриона;
- 2-я степень – полость бластоцисты больше половины объема эмбриона;
- 3-я степень – полная бластоциста, полость полностью занимает объем эмбриона;
- 4-я степень – расширенная бластоциста, полость бластоцисты становится больше, и начинает истончаться блестящая оболочка (ZP);
- 5-я степень – трофэктодерма начинает проникать через ZP;

- 6-я степень – вылупившаяся бластоциста.

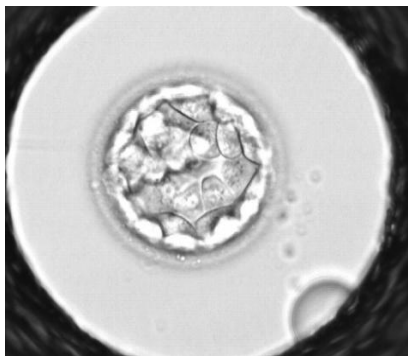


Рисунок 5 – Эмбрион. Стадия формирования полной бластоцисты (ОПЦ)

Внутриклеточная масса (ВКМ):

- А – плотно упакована с большим количеством клеток;
- В – более свободная группировка среднего количества клеток;
- С – незначительное количество клеток.

Трофэктодермальный слой (ТЭ):

- А – много клеток, формирующих трофэктодерму;
- В – немного клеток, формирующих трофэктодерму;
- С – незначительное количество больших клеток.

Диагностика беременности в программе ЭКО проводилась после переноса «свежего» эмбриона в полость матки путем определения β -ХГЧ иммуноферментным анализом в сыворотке крови. Клиническая диагностика проводилась на 21-й день после переноса эмбриона. Ультразвуковое исследование осуществлялось на 5-6-й неделе беременности.

Криоконсервация эмбрионов

Отбор эмбрионов для криоконсервации проводился на 3–5-е сутки культивирования по стандартным критериям «хорошего и удовлетворительного качества». Во всех случаях криоконсервация эмбрионов проводилась методом витрификации. Эмбриолог использовал набор сред «KITAZATO Vitrification Media» для сверхбыстрого охлаждения эмбрионов человека на стадии дробления и бластоцисты по стандартной методике. Для витрификации использовались 6-луночные планшетные

чашки «KITAZATO» с коническими лунками для экспозиции эмбрионов в витрификационных растворах. После выполнения витрификации термос с жидким азотом и носителями транспортировался в криохранилище.

Криохранилище Центра охраны здоровья семьи и репродукции Областного перинатального центра ГБУЗ «Иркутская областная ордена «Знак почета» клиническая больница» состоит из специальных сосудов типа Дьюара с жидким азотом, в которых при низкой температуре (-196 °С) хранятся живые биоматериалы, способные выполнять свои функции после размораживания. Принцип работы заключается в полной изоляции биоматериала от теплового воздействия, благодаря вакуумному слою, расположенному между внешним и внутренним корпусом сосуда. Сосуд Дьюара (СДС-35М В2034 Гелиймаш) вмещает 35 литров жидкого азота, транспортный Дьюар имеет емкость 25 литров. В сосудах поддерживался постоянный уровень жидкого азота, который доливается из транспортного Дьюара. При доливе уровень жидкого азота контролируется с помощью криолинейки. В криохранилище сосуды размещаются на подставках с колесиками для обеспечения простоты перемещения при проведении санитарной обработки помещения и в случае экстренной эвакуации. Площадь помещения обеспечивает свободное расположение криохранилища, с возможностью беспрепятственного обслуживания, оборудована системой приточно-вытяжной вентиляции, с четким соблюдением системы хранения и маркировки с регистрацией и учетом хранящегося биоматериала.

2.2.1 Подготовка эндометрия к переносу размороженного эмбриона (I этап исследования):

Всем пациенткам, вступившим в криопротокол, подготовка эндометрия выполнялась по одной из двух нижеописанных схем:

- **Группа 1 (n=63)** – группа гормональной терапии (ГТ) с назначением препаратов эстрогенов и гестагенов. Прием эстрогенов (Эстрадиола валерат)

6 мг/сут внутрь со 2-3-го дня цикла; за 5 дней до переноса blastocysts – микронизированный прогестерон 600 мг/сут вагинально.

- **Группа 2 (n=28)** – группа сочетания гормональной терапии и агонистов гонадотропин-рилизинг гормона (**аГнРГ+ГТ**). Назначение агонистов (Трипторелина ацетат, 3,75 мг) проходило с 21-го дня предыдущего менструального цикла, на фоне десенситизации функции гипофиза; со 2-3-го дня менструального цикла добавлялись эстрогены и препараты прогестерона за 5 дней до переноса blastocysts.

Размораживание эмбрионов проводилось с использованием набора реагентов для размораживания марки «KITAZATO». Эмбрионы помещались в чашку для культивирования и культивировались стандартным образом. Перенос размороженного эмбриона(-ов) осуществляется через 4-6 часов после разморозки по принципу «день в день».

2.2.2 Эмбриологический этап в криопротоколе (II этап исследования)

- **Группа 3 (n=122)** – группа вспомогательного хетчинга (**ВХ**), где перенос размороженного эмбриона(-ов) проводился с применением технологии вспомогательного хетчинга.

- **Группа 4 (n=147)** – группа переноса размороженного эмбриона(-ов) с использованием среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты (**ГК**).

Этапы проведения вспомогательного лазерного хетчинга:

- Калибровка и настройка лазера.
- Размещение эмбриона(-ов) в микроманипуляционной чашке аппарата ИКСИ.
 - Наведение метки лазера на оболочку эмбриона и рассечение блестящей оболочки.
 - Перенос эмбриона(-ов) в культуральные чашки инкубатора, где они находятся до момента переноса.

Алгоритм использования среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты («EmbryoGlue» (Vitrolife), Швеция) при переносе

размороженных эмбрионов: в 1-ю лунку и в межлуночное пространство планшета разливалось по 0,5 мл среды для переноса и во 2-ю лунку – 1 мл. Далее планшет убирался в CO₂-инкубатор для эквilibрирования не менее чем на 16 часов. В день переноса эмбрионов извлекался планшет из инкубатора, проводилась идентификация пациентки на планшете и эмбриопротоколе, оценивалось качество эмбрионов, производился выбор эмбрион/эмбрионов на перенос. После чего эмбрионы переносились в 1-ю лунку планшета, с предварительно эквilibрированной средой, тщательно отмывались от минерального масла, далее планшет убирался в CO₂-инкубатор. За 25 мин до переноса эмбрионы помещались во 2-ю лунку с «EmbryoGlue» (Vitrolife) для активации рецепторов. Далее планшет убирался в CO₂-инкубатор.

Этапы переноса размороженного эмбриона:

Перенос размороженного эмбриона(-ов) выполнялся в условиях манипуляционной в операционном блоке Центра охраны здоровья семьи и репродукции ОПЦ врачом акушером-гинекологом под ультразвуковым контролем (аппарат «Voluson E8», General Electric Company, США) после очередной идентификации пациентки.

Для прохождения через цервикальный канал в полость матки вводился проводник; после прохождения внутреннего зева, по команде акушера-гинеколога, эмбриолог заполнял внутренний катетер эмбрионом(-ами), при использовании среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты эмбрионы переносились в среду «EmbryoGlue», содержащую 0,5 мг/мл гиалуронана («Vitrolife», Швеция). Затем катетер с присоединенным шприцем через передаточное окно подавался врачу-акушеру-гинекологу с помощью медицинской сестры. Катетер с эмбрионом(-ами) вводился в полость матки (не доходя 1 см от дна матки), и содержимое катетера выпускалось плавным нажатием на шприц. Для проверки качества переноса медицинская сестра передавала шприц с катетером через передаточное окно эмбриологу, который просматривал под стереомикроскопом наличие

эмбриона(-ов) в катетере. Продолжительность манипуляции не превышает 2-3 мин. После манипуляции женщина находилась в положении лежа 15 минут.

Для переноса эмбриона(-ов) во всех случаях использовался катетер с проводником марки «СООК» (Австралия). Число переносимых эмбрионов в каждом случае выбиралось индивидуально, обсуждалось с женщиной и не превышало 2. Ультразвуковой мониторинг состояния эндометрия (М-эхо, трехлинейная структура) проводился со 2–3-го дня менструального цикла; при достижении толщины эндометрия 8 мм и более выполнялся перенос размороженного эмбриона. На 5-й день введения препаратов прогестерона выполнялся перенос бластоцисты, таким образом, сутки культивирования эмбрионов соответствовали суткам приема препаратов прогестерона.

Первичная биохимическая диагностика беременности проводилась через 14 дней после переноса размороженного эмбриона в полость матки, путем определения β -ХГЧ иммуноферментным анализом в сыворотке крови. Клиническая диагностика беременности проводилась на 21-й день после переноса размороженного эмбриона. Ультразвуковое исследование после выполнения криопереноса осуществлялось на 5-6-й неделе беременности. Отдаленные исходы отслеживались после окончания беременности.

2.2.3 Статистический анализ полученных результатов

Расчет выборки производился с помощью программы G*Power Version 3.1.9.6 Университет Франца Фауля, Киль, Германия. Статистический анализ был выполнен с использованием ППП STATISTICA (система программного обеспечения для анализа данных), версия 10 (StatSoft, Inc.). Клиническая характеристика исследуемых групп проведена с использованием описательной статистики. Результаты были представлены в виде Me (медианы) и 25-го; 75-го перцентилей для количественных переменных, и в виде абсолютных и относительных величин (процентов) для категориальных переменных. Близость к Гауссову распределению непрерывных величин

проверялась с использованием критериев согласия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса или критерия Шапиро–Уилка.

В случае отличного от нормального распределения применялся непарный U-критерий Манна–Уитни. Для анализа категориальных данных использовались таблицы сопряжения критерий χ^2 Пирсона. При сравнении более двух групп с распределением отличным от нормального использовался метод Краскера–Уоллиса, для $p\text{-value} \leq 0.05$ post-hoc – анализ с помощью критерия Мана–Уитни (критерия Данна) с поправкой Бонферрони на множественность сравнений; в противном случае применялся критерий Краскера–Уоллиса, post-hoc-анализ не проводился для $p\text{-value} > 0,05$. Для определения вклада изучаемых параметров применялся метод логистической регрессии с последующим построением математической модели. Уровень статистической значимости был принят равным 0,05.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 I этап исследования. Клинико-анамнестическая характеристика пациенток при назначении двух схем подготовки эндометрия

В соответствии с поставленной целью и задачами в исследование было включено 360 женщин в возрасте 18-35 лет с изолированным трубно-перитонеальным бесплодием, прошедших лечение в программах ЭКО и имеющих криоконсервированные эмбрионы. Для поиска новых подходов в лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий, для определения эффективной схемы подготовки эндометрия и эмбриологической методики нами был проведен анализ клинико-анамнестических данных, параметров протокола овариальной стимуляции, эмбриологического этапа и цикла переноса размороженного эмбриона у женщин при трубном бесплодии.

Все исследуемые пациентки имели криоконсервированные эмбрионы после проведенной программы овариальной стимуляции и готовились вступать в криопротокол. Основными причинами криоконсервации эмбрионов явились: профилактика развития синдрома гиперстимуляции яичников и «сохраненные» эмбрионы, полученные в программе овариальной стимуляции в избыточном количестве.

На первом этапе нашего исследования оценивалась эффективность двух схем подготовки эндометрия. Данные клинико-анамнестических показателей в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Клинико-анамнестические показатели в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия

Показатель	1-я группа ГТ n=63	2-я группа аГнРГ+ГТ n =28	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)		
Возраст	31,9 [23; 35,2]	31,7 [24,3; 35,1]	0,3 ²

Возраст менархе, лет	13 [10;15]	13 [12;16]	0,5 ²
Нормальный характер менструального цикла	60 (95,2%)	28 (100%)	0,9 ¹
Индекс массы тела, кг/м ²	23,2 [17,5; 28,3]	21,6 [17,7;26,2]	0,22 ²
Реконструктивно-пластические операции на маточных трубах	42 (66,7%)	22 (78,6%)	0,6 ²

Примечание: ¹ – критерий χ^2 ; ² – U- критерий Mann-Whitney * $p \leq 0,05$

По данным литературы, ведущими медико-биологическими факторами, влияющими на эффективность программ ВРТ, являются возраст женщины, состояние овариального резерва и эндометрия, причины и продолжительность бесплодия [21, 54].

В нашем исследовании пациентки групп сравнения двух схем подготовки эндометрия были сопоставимы по возрасту, началу менархе, характеру менструального цикла, индексу массы тела и наличию реконструктивно-пластических операций на маточных трубах в анамнезе.

Медиана возраста в группах с подготовкой эндометрия эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона составила 31,7–31,9 года ($p=0,3$), что обуславливало достаточный овариальный резерв и наличие эмбрионов для замораживания. Медиана менархе в группах сравнения составила 13 лет ($p=0,5$), что соответствует нормальным срокам наступления пубертата [11].

У большинства обследованных женщин имел место нормальный характер менструального цикла – 95–100 % случаев ($p=0,9$). Медиана ростового показателя (ИМТ) в группах с подготовкой эндометрия эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона составила 23,2–21,6 кг/м², что соответствовало нормальному весу (18,8–24,9 кг/м²; $p=0,22$).

Трубно-перитонеальное бесплодие в группах с подготовкой эндометрия эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с

агонистами гонадотропин-рилизинг гормона было обусловлено наличием воспалительных заболеваний органов малого таза в анамнезе и, как следствие, проведенными реконструктивно-пластическими операциями на маточных трубах в 66,7 % и 78,6 % соответственно ($p=0,6$). Необходимо отметить, что спонтанное наступление беременности после проведения реконструктивно-пластических операций на маточных трубах в нашем исследовании не наблюдалось, и данные пациентки были направлены женскими консультациями для проведения программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Таким образом, исследуемые женщины из групп сравнения двух схем подготовки эндометрия эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона были сопоставимы по клинико-анамнестическим показателям: молодой репродуктивный возраст, наличие в анамнезе воспалительных заболеваний органов малого таза, которые обуславливали трубно-перитонеальное бесплодие, а предшествующие реконструктивно-пластические операции на органах малого таза были малоперспективны для спонтанной реализации репродуктивной функции.

Далее нами был проведен анализ репродуктивного анамнеза в исследуемых группах сравнения двух схем подготовки эндометрия эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (таблица 4).

Таблица 4 – Репродуктивный анамнез в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия

Показатель	1-я группа ГТ n=63	2-я группа аГнРГ+ГТ n =28	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)		
Продолжительность бесплодия, годы	4 [1,2;5,9]	5[2,8;7,6]	0,2 ²
Первичное бесплодие	25 (39,7 %)	13 (46,4 %)	0,9 ¹
Вторичное бесплодие	38 (60,3 %)	15 (53,6 %)	0,8 ¹

Количество беременностей в анамнезе	1 [0;4]	0 [0;4]	0,09 ²
Роды в анамнезе	20 (31,7 %)	11 (39,3 %)	0,6 ¹
Аборты	21 (33,3 %)	6 (21,4 %)	0,4 ¹
Неудачи ЭКО в анамнезе	27 (42,8 %)	12 (42,9 %)	0,8 ¹

Примечание: ¹ – критерий χ^2 ; ² – U-критерий Mann–Whitney * $p \leq 0,05$

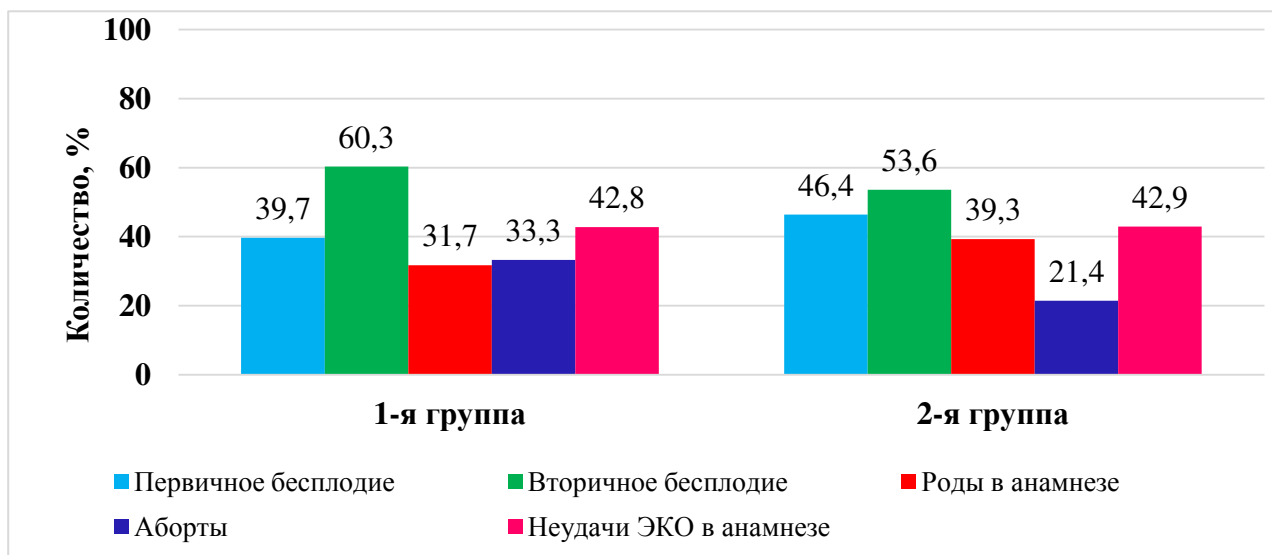


Рисунок 6 – Репродуктивный анамнез групп сравнения двух схем подготовки эндометрия

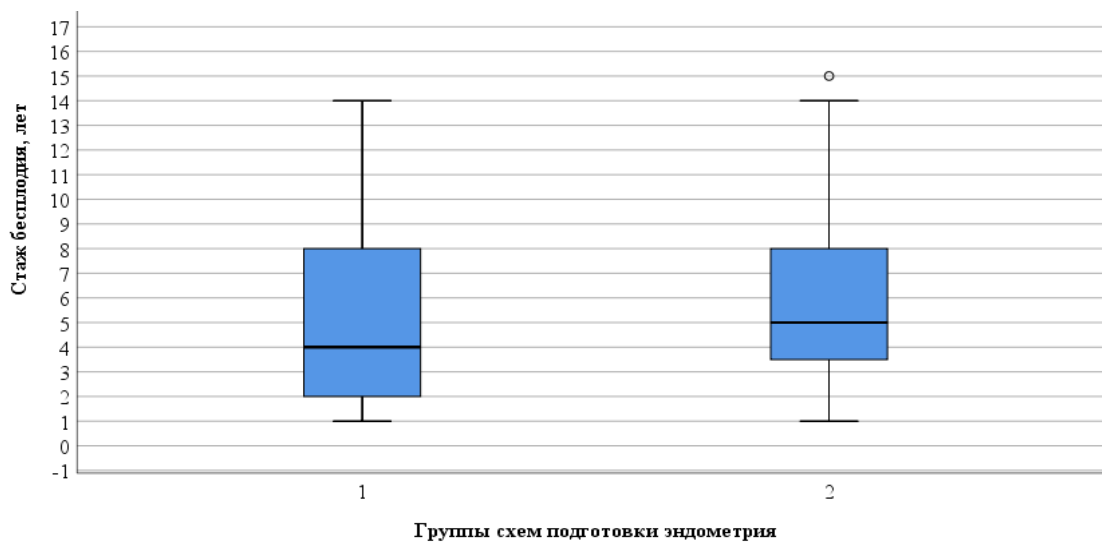


Рисунок 7 – Стаж бесплодия в группах сравнения схем подготовки эндометрия

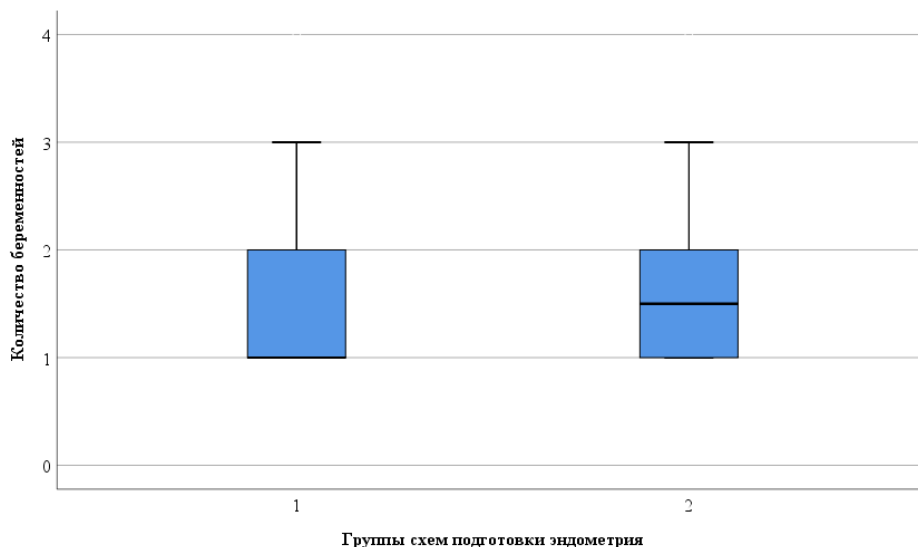


Рисунок 8 – Количество беременностей в анамнезе в группах сравнения схем подготовки эндометрия

Анализ репродуктивного анамнеза (см. таблицу 4 и рисунки 6, 7, 8) в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия показал, что медиана продолжительности бесплодия в группах с подготовкой эндометрия эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона составила 4–5 лет ($p=0,2$). Первичное и вторичное бесплодие встречалось в одинаковом проценте случаев и не имело достоверных различий – 39,7 % и 46,4 % соответственно в группе с подготовкой эндометрия эстроген/гестагенами; 60,3 % и 53,6 % соответственно в группе подготовки эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона ($p>0,05$). Треть исследуемых пациенток в группах сравнения имели в анамнезе роды (31,7 % и 39,3 % соответственно, $p=0,6$) и прерывания беременностей на малых сроках (33,3 % и 21,4 % соответственно, $p=0,4$), различия статистически не значимы. В анамнезе у женщин в группах с подготовкой эндометрия эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона были безрезультативные программы ЭКО,

которые не завершились наступлением беременности – 42,8 % и 42,9 % соответственно, различия не значимы ($p=0,8$).

На данном этапе при сравнении двух схем подготовки эндометрия нами не было выявлено достоверных различий ни по одному показателю репродуктивного анамнеза обследованных женщин.

Таким образом, можно заключить, что первая группа женщин с гормональной подготовкой эндометрия препаратами эстроген/гестагенами и вторая группа женщин с подготовкой эндометрия препаратами эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона были сопоставимы по характеру репродуктивного анамнеза (см. рисунки 6, 7, 8).

У пациенток в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона был проведен анализ исходного гормонального профиля и количества антральных фолликулов в обоих яичниках накануне вступления в протокол ВРТ, в результате которого были получены и криоконсервированы эмбрионы. Медиана базального уровня всех гормонов крови исследуемых женщин находилась в пределах референсных значений и не препятствовала проведению программы (таблица 5, рисунок 9).

Таблица 5 – Исходный гормональный профиль и количество антральных фолликулов в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия

Показатель	1-я группа ГТ n=63	2-я группа аГнРГ+ГТ n =28	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)		
Исходный ФСГ, (mIU/ml)	5,9 [2,8;8,8]	6,1 [2,8; 8,9]	0,4 ²
Исходный ЛГ, (mIU/ml)	5,9 [2,3; 21,5]	5,68 [2,1;21]	0,3 ²
Исходный E ₂ , (pg/ml)	135,0 [10,1; 380,0]	151,9 [20,2; 324,0]	0,4 ²
Исходный АМГ,	3,7 [1,8; 8,3]	4,1[2,4; 8,3]	0,4 ²

(ng/ml)			
Исходный P, (нмоль/л)	14,4 [8,5;77,2]	21,1 [4,7; 70,3]	0,7 ²
Количество фолликулов в ПЯ (КАФ)	6 [2;9]	7 [2;11]	0,8 ²
Количество фолликулов в ЛЯ (КАФ)	6 [2;12]	8 [4;10]	0,09 ²

Примечание: ¹ – критерий χ^2 ; ² – U- критерий Mann–Whitney * $p \leq 0,05$

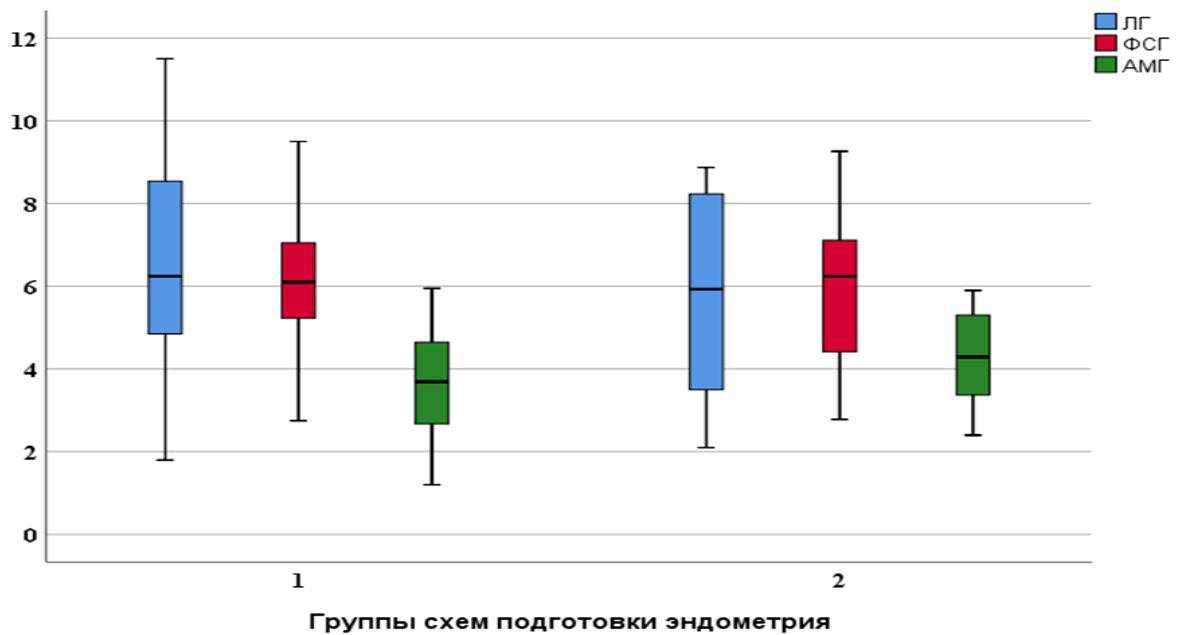


Рисунок 9 – Исходный гормональный профиль уровней ЛГ, ФСГ и АМГ в группах схем подготовки эндометрия

Анализ гормонального профиля показал, что все уровни гормонов в первой группе женщин с подготовкой эндометрия эстроген/гестагенами и второй группе с подготовкой эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона соответствовали референсным значениям (см. рисунок 9).

Медиана исходного уровня ФСГ в группе подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенами составила 5,9 mIU/ml, в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона – 6,1 mIU/ml, различия не значимы ($p=0,4$).

Медиана исходного уровня ЛГ в группе подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенами составила 5,9 mIU/ml и в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона – 5,68 mIU/ml, различия не значимы ($p=0,3$).

Медиана исходного уровня эстрадиола двух групп сравнения составила 135,0 pg/ml и 151,9 pg/ml соответственно, различия не значимы ($p=0,4$).

Исходный уровень антимюллера гормона в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами составил 3,7 ng/ml, в группе подготовки эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона – 4,1 ng/ml ($p=0,4$) и также соответствовал пределам референсных значений.

В научной литературе особое внимание уделяется сывороточной концентрации прогестерона – считается, что уровень данного гормона не связан с качественными характеристиками яйцеклетки и эмбриона в программе ЭКО, однако снижение прогестерона деструктивно влияет на результативность протокола путем десинхронизации имплантационной готовности эмбриона и самого эндометрия [75, 138, 155]. С учетом данной особенности в нашем исследовании были отслежены уровни исходного прогестерона у пациенток. В группах подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона концентрация прогестерона показала нормальный уровень – медиана составила 14,4 нмоль/л и 21,1 нмоль/л соответственно, различия статистически не значимы ($p=0,7$).

Практически значимым маркером овариального резерва является количество антральных фолликулов (КАФ). Подсчет КАФ производился по данным УЗИ – на 2-3-й день менструального цикла определялось количество антральных фолликулов до 10 мм в диаметре. В нашем исследовании общее количество антральных фолликулов в правом и левом яичниках в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия достоверно не различалось – определялось от 6 до 8 фолликулов в каждом яичнике ($p=0,8$ и $p=0,09$).

соответственно), что соответствовало нормальному овариальному резерву и прогнозировало хороший ответ на стимуляцию в протоколе ЭКО.

Таким образом, анализ гормонального профиля в группах подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона не показал достоверных различий по уровням ФСГ, ЛГ, эстрадиола, АМГ и прогестерона. Все исходные значения гормонов находились в пределах референсных значений и допустимых для проведения программы ЭКО.

На основании вышепредставленных данных можно заключить, что пациентки групп сравнения схем подготовки эндометрия с назначением препаратов эстроген/гестагенов (n=63) и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (n=28) были молодого репродуктивного возраста, с установленным изолированным трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе, с нормальными исходными уровнями гормонального профиля, который не препятствовал вступлению в протокол ЭКО, а количество антральных фолликулов и уровень АМГ прогнозировало хороший ответ на овариальную стимуляцию. Всем пациенткам овариальная стимуляция проведена по протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона.

Овариальная стимуляция является важной частью экстракорпорального оплодотворения, целью которого является формирование однородной когорты фолликулов с получением максимального количества зрелых ооцитов и эмбрионов после оплодотворения. Непосредственно от схемы овариальной стимуляции, дозы гонадотропинов, длительности стимуляции зависит число полученных ооцитов при проведении программы ЭКО [54].

3.2 Анализ программы овариальной стимуляции, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы

В нашем исследовании был проведен анализ протокола стимуляции овуляции, в результате которого были получены и криоконсервированы эмбрионы (таблица 6, рисунок 10).

По данным литературы, овариальная стимуляция по протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона в большей степени показана пациенткам с нормальным овариальным резервом, женщинам с риском развития синдрома гиперстимуляции яичников, с дефицитом массы тела и пациенткам, вступающим в первый протокол стимуляции овуляции [20].

Таблица 6 – Характеристика протокола овариальной стимуляции и эмбриологического этапа в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия

Показатель	1-я группа ГТ n=63	2-я группа аГнРГ+ГТ n =28	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)		
День начала стимуляции	3 [2;5]	3 [2;5]	0,6 ²
Курсовая доза гонадотропинов, ЕД	2175,0 [1012,5;3500,0]	2250,0 [1200,0;3500,0]	0,5 ²
День цикла на момент пункции	14 [11;15]	14 [12;15]	0,8 ²
E ₂ в день пункции, (pg/ml)	2194,0 [354,0;6363,0]	2854,5 [593,0; 6333,0]	0,2 ²
Количество пунктированных фолликулов	10 [3;20]	10 [4;20]	0,7 ²
Количество полученных ооцитов	9 [2;20]	7 [3;20]	0,6 ²
Количество полученных эмбрионов	7 [2;16]	6 [2;17]	0,4 ²
Эмбрионы соответствуют суткам культивирования	63 (100 %)	28 (100 %)	0,9 ¹
Толщина эндометрия (М-Эхо) на момент «свежего» переноса, в мм	8 [8;10]	8 [8;10]	0,08 ²
Причина	11 (17,4 %)	4 (14,3 %)	0,7 ¹

криоконсервации – профилактика СГЯ			
Причина криоконсервации-«сохраненные» эмбрионы	52 (82,6 %)	24 (85,7 %)	0,9 ¹

Примечание: ¹ – критерий χ^2 ; ² – U- критерий Mann–Whitney * $p \leq 0,05$

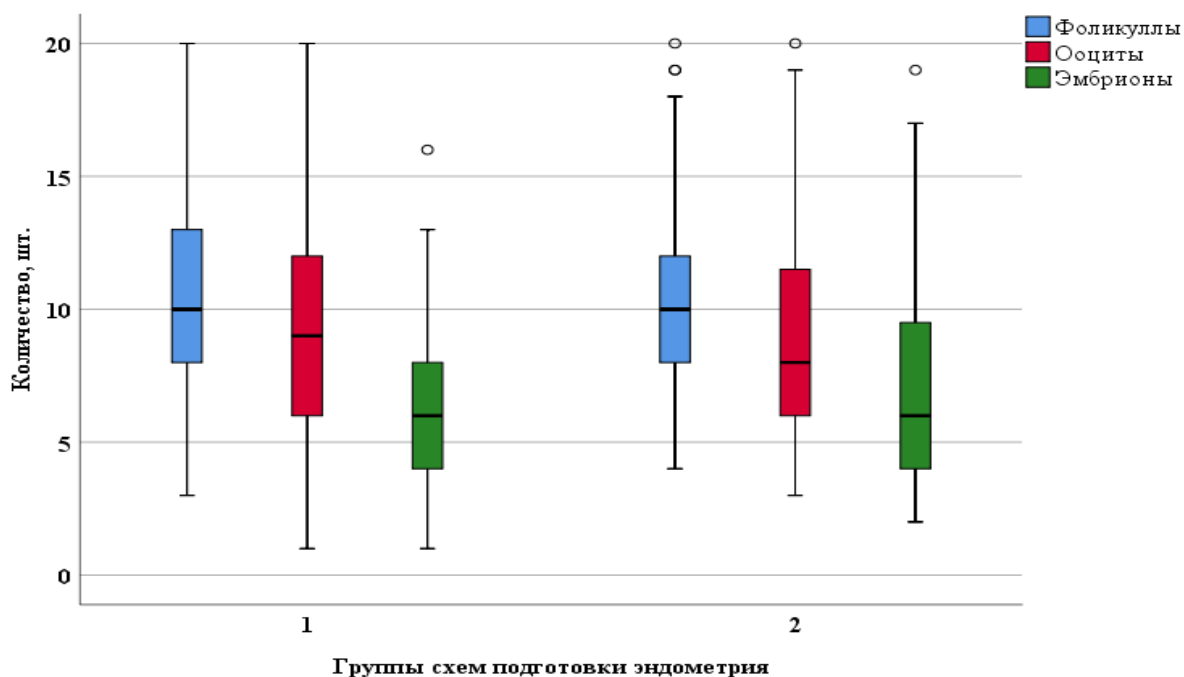


Рисунок 10 – Количество фолликулов, ооцитов и эмбрионов, полученных в результате овариальной стимуляции в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия

По данным литературы, овулирующие женщины имеют уровень антимюллера гормона (АМГ) – 2,5 ng/ml и более. В то же время уровень АМГ более 3,6 ng/ml напрямую коррелирует с рисками развития синдрома гиперстимуляции яичников в программе ЭКО, в связи с чем данным женщинам необходимо также рекомендовать в программе овариальной стимуляции протокол с использованием антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона, как более приемлемый для пациенток и нивелирующий риски гиперстимуляции [20].

В нашем исследовании овариальная стимуляция, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы, проводилась по протоколу

с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона. Исследуемые пациентки имели нормальную массу тела, некоторые из них вступали в первый протокол овариальной стимуляции либо имели риски развития синдрома гиперстимуляции яичников.

В протоколах овариальной стимуляции в группах подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона были затрачены средние курсовые дозы гонадотропинов (медиана 2175 МЕ и 2250 МЕ соответственно, $p=0,5$).

Трансвагинальная пункция в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия выполнялась на 14-й день менструального цикла, различия не значимы (медиана составила 14 и 14-й день соответственно, $p=0,8$).

Уровни эстрадиола в день проведения пункции в группах подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона не превышали референсных значений, медиана составила 2 194,0 pg/ml и 2 854,5 pg/ml соответственно, различия не значимы ($p=0,2$).

В группе подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов было пунктировано 10 фолликулов и получено 9 ооцитов, в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона было пунктировано 10 фолликулов и получено 7 ооцитов, различия не значимы ($p=0,7$ и $p=0,6$).

Оплодотворение *in vitro* проводилось путем инсеминации полученных ооцитов сперматозоидами партнера. После оплодотворения в группе подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенами было получено 7 эмбрионов, в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона было получено 6 эмбрионов ($p=0,4$).

Все эмбрионы соответствовали суткам культивирования согласно критериям «отличного и хорошего» качества (АА, АВ, АВ), различия не значимы ($p=0,9$).

Медиана толщины эндометрия на момент «свежего» переноса в группах подготовки эндометрия эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона составила 8 мм и 8 мм соответственно, различия не значимы ($p=0,08$). Данный уровень М-Эхо соответствовал адекватному росту эндометрия в протоколе овариальной стимуляции.

Криоконсервация эмбрионов по причине профилактики гиперстимуляции яичников в группе подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенами выполнена у 11 женщин (17,4 % случаев), в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона – у 4 женщин (14,3 % случаев), различия не значимы ($p=0,7$).

Криоконсервация по причине одномоментного получения избыточного количества эмбрионов отличного и хорошего качества в группе подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенами выполнена у 52 женщин (82,6 % случаев), в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона – у 24 женщин (85,7 % случаев), различия не значимы ($p=0,9$).

Таким образом, ни по одному анализируемому параметру цикла овариальной стимуляции, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы, нами не было выявлено достоверных различий (по протоколу овариальной стимуляции, по затраченным курсовым дозам гонадотропинов, по дню трансвагинальной пункции, по количеству пунктированных фолликулов, полученных ооцитов, по методу оплодотворения, количеству эмбрионов и по толщине эндометрия в «свежем» цикле).

3.3 Сравнительная характеристика параметров криопротокола при назначении двух схем подготовки эндометрия

В нашем исследовании были выявлены следующие основные причины криоконсервации эмбрионов – профилактика синдрома гиперстимуляции яичников и «сохраненные» эмбрионы. Криоконсервированные эмбрионы хранились в криохранилище Центра охраны здоровья семьи и репродукции, после чего был запланирован криопротокол (таблица 7).

Таблица 7 – Характеристика параметров криопротокола в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия

Показатель	1-я группа ГТ n=63	2-я группа аГнРГ+ГТ n =28	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)		
Паритет криопереноса	1 [1;3]	1 [1;2]	0,7 ²
Сутки заморозки	4 [1;5]	4 [3;5]	0,8 ²
Количество замороженных эмбрионов	3 [2;12]	3 [2;11]	0,6 ²
Длительность хранения эмбрионов на момент разморозки (мес.)	5 [2;35]	3 [2;28]	0,5 ²
Сутки переноса криоэмбрионов	5 [4;5]	5 [4;5]	1 ²
Количество эмбрионов на криоперенос	2 [1;2]	2 [1;2]	0,8 ²
Количество оставшихся эмбрионов	0 [1;9]	0 [1;8]	1 ²
День цикла на перенос размороженного эмбриона	20 [17;23]	20 [18;23]	0,9 ²
Толщина эндометрия (М-Эхо) на момент криопереноса в мм	10 [8;10]	10 [8;10]	0,9 ²

Примечание: ¹ – критерий χ^2 ; ² – U- критерий Mann–Whitney * $p \leq 0,05$

В группе подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов планировался первый криопротокол, в единичных случаях выполнялся

третий, различия не значимы ($p=0,7$). В группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона планировался первый криопротокол, в единичных случаях – второй, различия не значимы ($p=0,7$).

В группе подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенами заморозка эмбрионов выполнялась на 4-е сутки, в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона эмбрионы криоконсервировались также на 4-е сутки культивирования, различия не значимы ($p=0,8$). Количество замороженных эмбрионов в группах сравнения различий не имело, медиана составила 3 и 3 соответственно, $p=0,6$.

Медиана длительности хранения эмбрионов в двух группах подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона составила 5 и 3 месяцев соответственно ($p=0,5$), однако в исследовании были единичные пациентки, которые хранили эмбрионы длительно – более двух лет. Данная тенденция обусловлена тем, что длительность хранения эмбрионов не влияет на результативность программ вспомогательных репродуктивных технологий [167].

У всех исследуемых женщин перенос эмбрионов в криопротоколе в полость матки осуществлялся на 5-е сутки культивирования, различия не значимы ($p=1$). В двух группах подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона переносилось по 2 эмбриона, различия не значимы ($p=0,8$).

Медиана количества оставшихся эмбрионов после переноса в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами равна нулю, в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона также равна нулю, различия не значимы ($p=1$).

Перенос эмбрионов в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами проводился на 20-й день менструального цикла, что достоверно не имело различий с группой подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона, в которой перенос выполнялся также на 20-й день цикла, $p=0,9$.

Медиана толщины эндометрия на момент переноса криоконсервированного эмбриона в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами была равна 10 мм, что идентично группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона, различия не значимы ($p=0,9$). Данная толщина эндометрия является оптимальной для выполнения переноса. По данным литературы считается, что толщина эндометрия на момент переноса эмбриона должна составлять 8-12 мм. Толщина менее 8 мм является прогностически неблагоприятным фактором в отношении наступления беременности и ее исходов в цикле ВРТ [27]. В нашем исследовании при назначении обеих схем подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона достигнута оптимальная толщина эндометрия для переноса эмбриона в 10 мм.

Таким образом, при анализе параметров криопротокола в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия не выявлено различий по паритету криопереноса, по качеству и длительности хранения полученных эмбрионов, суткам заморозки и разморозки, по количеству переносимых и оставшихся эмбрионов, по дню менструального цикла на перенос и толщине эндометрия. На момент переноса размороженного эмбриона толщина эндометрия в обеих группах подготовки эндометрия достигла 10 мм и была оптимальной.

Условиями успешной имплантации и наступления беременности являются адекватное развитие эндометрия в фолликулярную и лютеиновую фазы овариально-менструального цикла, а также в правильной

синхронизации между рецепторами эндометрия, бластоцистой и желтым телом в окно имплантации [10]. С другой стороны, важное значение имеют качественные характеристики бластоцисты [54].

Принято считать, что критерием эффективности лечения бесплодия с использованием программ ВРТ является доля (% от числа пролеченных) женщин, у которых клиническая беременность подтверждена с помощью ультразвукового исследования. Данный параметр называется «частота наступления клинической беременности». В нашем исследовании был проведен анализ частоты наступления клинической беременности, подтвержденной по УЗИ и отдаленных исходов полученных беременностей – самопроизвольные выкидыши до 12 недель и роды, в зависимости от схемы подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (таблица 8).

Таблица 8 – Характеристика исходов при назначении двух схем подготовки эндометрия

Показатель	1-я группа ГТ n=63	2-я группа аГнРГ+ГТ n =28	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)		
Частота наступления беременности	18 (28,6 %)	6 (32,1 %)	0,7 ¹
Самопроизвольные выкидыши	3 (4,7 %)	1 (3,6 %)	0,7 ¹
Роды	15 (23,8 %)	5 (17,9 %)	0,8 ¹
Срок родов	38 [35; 39]	37 [34; 40]	0,06 ²

Примечание: ¹– критерий χ^2 ; ² – U- критерий Mann–Whitney * $p \leq 0,05$

В группе подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов частота наступления беременности по данным УЗИ была установлена у 18 женщин (28,6 %), в группе подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона – у 6 женщин (32,1 %) соответственно, различия статистически не

значимы ($p=0,7$). Самопроизвольное прерывание беременности до 12 недель в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами произошло у 3 женщин (4,7 %), в группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона – у 1 женщины (3,6 %), различия не значимы ($p=0,7$). У 15 женщин (23,8 %) из группы подготовки эндометрия эстроген/гестагенами беременность завершились срочными родами, что достоверно не различалось с показателями группы подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона – 5 женщин (17,9 %, $p=0,8$). Срок родов у исследуемых женщин был доношенным, медиана составила 38 недель и 37 недель соответственно, различия не значимы ($p=0,06$).

На основании всего вышесказанного мы можем сделать заключение, что проведенный сравнительный анализ эффективности двух схем подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона на первом этапе нашего исследования показал равнозначную клиническую эффективность. Нами не было получено достоверных различий по частоте наступления клинической беременности по данным УЗИ и отдаленным исходам – частоте самопроизвольных прерываний беременности до 12 недель и частоте родов.

3.4 II этап исследования. Клинико-anamнестическая характеристика пациенток при использовании эмбриологических методик

На втором этапе нашего исследования было проведено изучение эффективности эмбриологических методик – вспомогательного хетчинга и среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты.

▪ **Группа 3 (n=122)** – группа вспомогательного хетчинга (**BX**), где перенос размороженного эмбриона(-ов) проводился с применением технологии вспомогательного хетчинга.

- **Группа 4 (n=147)** – группа переноса размороженного эмбриона(-ов) с использованием среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты (**ГК**).
- **Контрольную группу (или нулевую группу)** для второго этапа составили женщины двух групп схем подготовки эндометрия из первого этапа исследования (1+2 группа), у которых эмбриологический этап в криопротоколе был проведен без каких-либо дополнительных методик (n=91).

Клинико-anamnestическая характеристика пациенток второго этапа исследования представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Клинико-anamnestическая характеристика групп сравнения эмбриологического этапа

Показатель	3-я группа ВХ n=122	4-я группа ГК n=147	Нулевая или контрольная группа n=91	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)			
Возраст	32,3 [23,2; 34,8]	32,8 [22,2;35,1]	31,5 [23;35,1]	0,5 ²
Возраст менархе, лет	13 [11;15]	13 [12;15]	13 [10;16]	0,6 ²
Нормальный характер менструального цикла	120 (98,4 %)	141 (95,9 %)	90 (98,9 %)	0,9 ¹
Индекс массы тела, кг/м ²	22,3 [19,5;28,7]	21,9 [18,7; 27,7]	22 [19,5; 28,3]	0,9 ²
Реконструктивно- пластические операции на маточных трубах	106 (86,9 %)	105 (71,4 %)	64 (70,3 %)	0,5 ¹

*Примечание: ¹– критерий χ^2 ; ² – критерий Краскера–Уоллиса * $p \leq 0,05$*

В нашем исследовании пациентки групп сравнения эмбриологического этапа были репродуктивного возраста: медиана в группе вспомогательного хетчинга составила 32,3 года, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 32,8 лет и в группе контроля – 31,5 лет, различия не значимы (p=0,5). В группах сравнения медиана возраста менархе составила 13 лет, что соответствовало нормальному, различия не значимы (p=0,6).

Более 90 % женщин выборки имели нормальный характер менструального цикла: группа вспомогательного хетчинга – 98,4 %; группа

среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 95,9 % и группа контроля – 98,9 %, различия статистически не значимы ($p=0,9$).

Женщины группы вспомогательного хетчинга, группы среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группы контроля имели росто-весовой показатель равный 22,3/21,9/22 кг/м² соответственно, что соответствовало нормальному индексу массы тела (ИМТ 18,5–25 кг/м²), различия не значимы ($p=0,9$).

Трубно-перитонеальное бесплодие нередко является следствием острого или хронического течения воспалительных заболеваний органов малого таза, при которых возможно выполнение как радикальных, так и органосохраняющих операций. В нашем исследовании более половины всех женщин в анамнезе имели реконструктивно-пластические операции на маточных трубах: группа вспомогательного хетчинга – 86,9 %; группа среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 71,4 %, группа контроля – 70,3 % соответственно, различия статистически не значимы ($p=0,5$).

Таким образом, анализ данных показал, что пациентки группы вспомогательного хетчинга, группы среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группы контроля были сопоставимы и не имели достоверных различий по возрасту, возрасту менархе, характеру менструального цикла, росто-весовому показателю и наличию реконструктивно-пластических операций на маточных трубах.

Далее нами был исследован репродуктивный анамнез трех групп сравнения второго этапа (таблица 10, рисунки 11 и 12).

Таблица 10 – Репродуктивный анамнез групп сравнения эмбриологического этапа

Показатель	3-я группа ВХ n=122	4-я группа ГК n=147	Нулевая или контрольная группа n=91	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)			
Продолжительность бесплодия, годы	5 [2;8]	5 [2;8]	5 [2;7,6]	0,8 ²
Первичное бесплодие	64 (52,5 %)	68 (46,3 %)	39 (42,9 %)	0,7 ¹

Вторичное бесплодие	58 (47,5 %)	79 (53,7 %)	52 (57,1 %)	0,7 ¹
Количество беременностей в анамнезе	1 [1;8]	1 [1;5]	1 [1;4]	0,9 ²
Аборты	42 (34,4 %)	31 (21,1 %)	27 (29,7 %)	0,7 ¹
Неудачи ЭКО в анамнезе	65 (53,3 %)	75 (51,0 %)	52 (57,1 %)	0,7 ¹

Примечание: ¹– критерий χ^2 ; ² – критерий Краскера–Уоллиса * $p \leq 0,05$

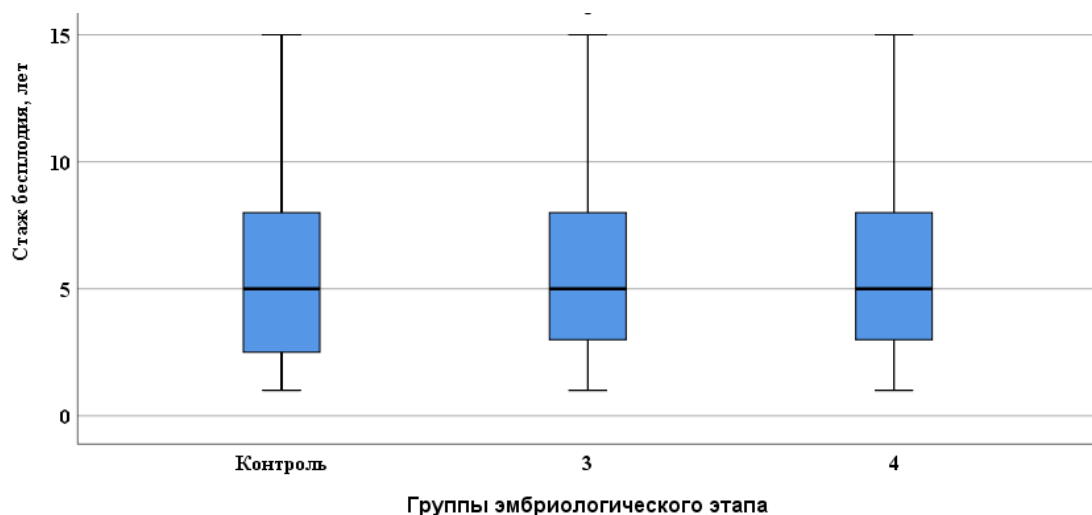


Рисунок 11 – Стаж бесплодия в группах сравнения эмбриологического этапа

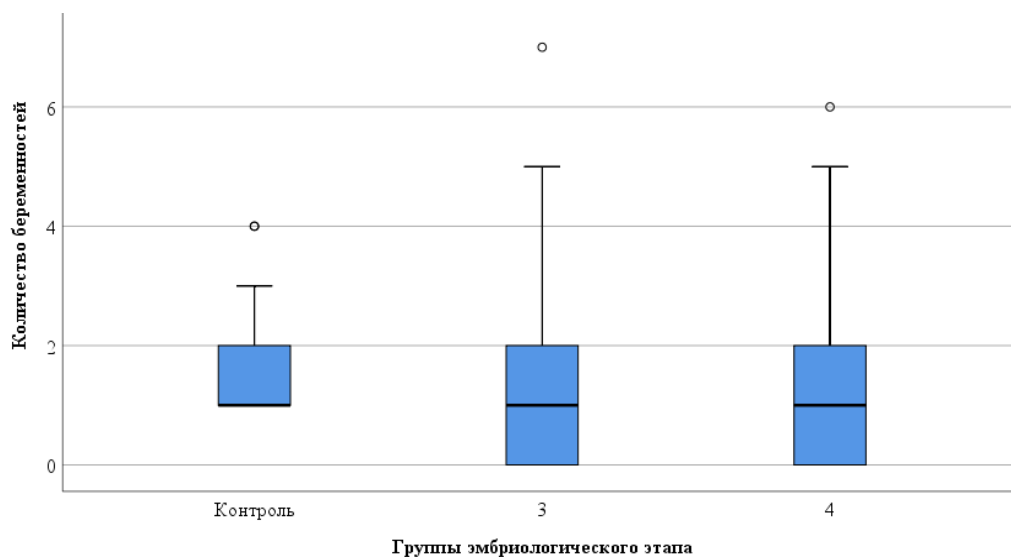


Рисунок 12 – Количество беременностей в анамнезе в группах сравнения эмбриологического этапа

В группах сравнения эмбриологического этапа и группы контроля медиана продолжительности бесплодия составила 5 лет, различия не значимы ($p=0,8$).

Количество женщин с первичным и вторичным бесплодием в группах сравнения достоверно не различалось. В группе вспомогательного хетчинга первичное бесплодие составило 52,5 %, вторичное – 47,5 % соответственно; в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 46,3 % и 53,7 % соответственно, в группе контроля – 42,9 % и 57,1 % соответственно ($p=0,7$ и $p=0,7$).

Пациентки исследуемых групп имели отягощенный акушерско-гинекологический анамнез – прерывания беременностей выполнялись в группе вспомогательного хетчинга в 34,4 % случаев; в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 21,1 % случаев, и в контрольной группе этот показатель составил 29,7 %, различия не значимы ($p=0,7$). Группы сравнения не имели различий по количеству беременностей в анамнезе, медиана составила 1, $p=0,9$.

В группе женщин с применением вспомогательного хетчинга безрезультативные протоколы ВРТ в анамнезе встречались в 53,3 % случаев, в группе с использованием среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – в 51,0 % случаев и в группе контроля – в 57,1 %, различия не значимы ($p=0,7$).

Таким образом, по продолжительности бесплодия, структуре бесплодия, количеству беременностей и прерываний в анамнезе, частоте встречаемости неудачных программ ВРТ группа вспомогательного хетчинга, группа среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группа контроля были сопоставимы.

У пациенток группы вспомогательного хетчинга, группы среды переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группы контроля был проведен анализ гормонального профиля и количества антральных фолликулов накануне вступления в протокол овариальной стимуляции, в результате которого были получены и криоконсервированы эмбрионы (таблица 11, рисунок 13).

Таблица 11 – Исходный гормональный профиль и количество антральных фолликулов в группах сравнения эмбриологического этапа

Показатель	3-я группа ВХ n=122	4-я группа ГК n=147	Нулевая или контрольная группа n=91	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)			
Исходный ФСГ, (mIU/ml)	6,4 [2,6; 8,6]	6,6 [2,8; 8,4]	6,4 [2,8;8,9]	0,1 ²
Исходный ЛГ, (mIU/ml)	5,6 [2,6; 21,4]	5,5 [2,3; 21,5]	5,8 [1,3; 21,5]	0,3 ²
Исходный E ₂ , (pg/ml)	131,7 [16,0; 314,3]	121,1 [112; 393,0]	136,0 [110,1; 380,0]	0,3 ²
Исходный P, (нмоль/л)	29,3 [18,1; 75,2]	27,1 [15,0; 70,0]	20,3 [15,5; 77,2]	0,6 ²
Исходный АМГ, (ng/ml)	3,7 [1,2; 7,2]	3,6 [1,2; 7,5]	3,8 [1,2; 8,3]	0,2 ²
Количество антральных фолликулов в ПЯ (КАФ)	7[5;12]	7[5;10]	7[3;11]	0,4 ²
Количество антральных фолликулов в ЛЯ (КАФ)	6[4;10]	7[5;10]	7[4;12]	0,2 ²

Примечание: ¹ – критерий χ^2 ; ² – критерий Краскера–Уоллиса * $p \leq 0,05$

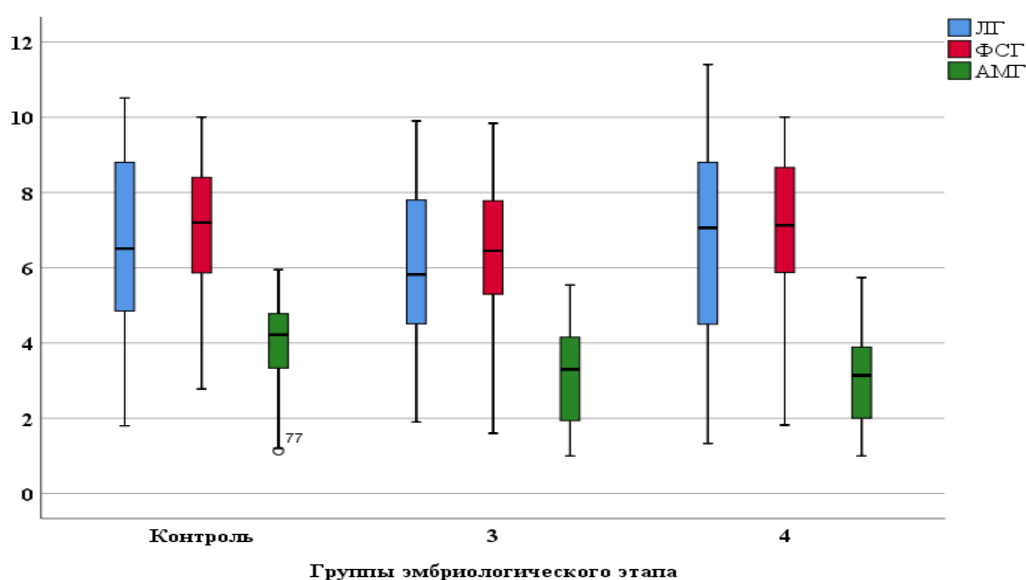


Рисунок 13 – Исходный гормональный профиль уровней ЛГ, ФСГ и АМГ в группах сравнения эмбриологического этапа

В протоколах ВРТ гормональный статус имеет важное значение, поскольку уровни гормонов являются предикторами ответа на стимуляцию овуляции и играют роль в прогнозировании исходов программы.

Медиана базального уровня ФСГ в группе вспомогательного хетчинга составила 6,4 mIU/ml, в группе применения среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 6,6 mIU/ml, что не имело достоверных различий с группой контроля (6,4 mIU/ml, $p=0,1$) и соответствовало референсным значениям (см. рисунок 13).

Медиана базального уровня ЛГ в группе вспомогательного хетчинга составила 5,6 mIU/ml, в группе применения среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 5,5 mIU/ml, что соответствовало референсным значениям и не имело достоверных различий с группой контроля (5,8 mIU/ml, $p=0,3$) (см. рисунок 13).

Медиана базального уровня эстрадиола в группе вспомогательного хетчинга составила 131,7 pg/ml, в группе применения среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 121,1 pg/ml, что также не имело достоверных различий с группой контроля (136,0 pg/ml, $p=0,3$) и соответствовало нормальным уровням.

Медиана исходного уровня прогестерона в трех группах сравнения эмбриологического этапа соответствовала референсным значениям и не имела достоверных различий (29,3 нмоль/л – 27,1 нмоль/л – 20,3 нмоль/л соответственно, $p=0,6$).

Медиана базального уровня АМГ соответствовала референсным значениям во всех трех группах сравнения эмбриологического этапа и не имела достоверных различий (3,7 ng/ml – 3,6 ng/ml – 3,8 ng/ml соответственно, $p=0,2$) (см. рисунок 13).

Подсчет количества антральных фолликулов производился на 2-3-й день менструального цикла для оценки овариального резерва у исследуемых женщин. Учитывались антральные фолликулы до 10 мм в диаметре в обоих яичниках. По данным ультразвукового исследования группы

вспомогательного хетчинга, среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и контроля не имели достоверных различий по количеству антральных фолликулов (6-7 штук) в каждом яичнике на этапе вступления в протокол ($p>0,05$).

Таким образом, анализ гормонального профиля и количества антральных фолликулов не показал достоверных различий по уровням ФСГ, ЛГ, эстрадиола, АМГ и прогестерона в группе вспомогательного хетчинга, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группе контроля. Уровни гормонов и количество антральных фолликулов обуславливали достаточный овариальный резерв и прогнозировали хороший ответ на овариальную стимуляцию.

Овариальная стимуляция определяется как фармакологическая терапия, направленная на стимулирование роста фолликулов яичников. Ее можно использовать в программах вспомогательных репродуктивных технологий, для получения нескольких ооцитов при трансвагинальной пункции фолликулов, с последующим их оплодотворением и культивированием эмбрионов [5].

3.5 Анализ предшествующего цикла овариальной стимуляции, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы

В нашем исследовании был проведен анализ протокола овариальной стимуляции, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы (таблица 12, рисунок 14).

Таблица 12– Характеристика протокола овариальной стимуляции групп сравнения эмбриологического этапа

Показатель	3-я группа ВХ n=122	4-я группа ГК n=147	Нулевая или контрольная группа n=91	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)			
День начала стимуляции	3 [2;5]	3 [2;5]	3 [2;5]	0,8 ²
Курсовая доза гонадотропинов, ЕД	2175,0[900,0; 3500,0]	2250,0[900,0; 3500,0]	2250,0 [1012,5; 3500,0]	0,5 ²

День цикла на момент пункции	14 [10; 16]	14 [11;15]	14 [11;15]	0,6 ²
Эстрадиол в день пункции, (pg/ml)	2047,0 [213,0; 6426,0]	2151,0 [392,0; 6363,0]	2404,0 [354,0; 6363,0]	0,3 ²
Количество пунктированных фолликулов	9 [2;21]	10 [2;22]	10 [3;20]	0,9 ²
Количество ооцитов	7 [2;21]	9 [2;22]	9 [2;20]	0,9 ²
Количество полученных эмбрионов	5 [1;19]	6 [2;17]	6 [1;17]	0,8 ²
Эмбрионы соответствуют суткам культивирования	120 (98,4 %)	140 (95,2 %)	91 (100 %)	0,5 ¹
Толщина эндометрия (М-Эхо) в программе ЭКО в мм	8 [8;10]	9 [8;10]	9 [8;10]	0,9 ²
Причина криоконсервации-профилактика СГЯ	18 (14,8 %)	19 (12,9 %)	15 (16,4 %)	0,8 ¹
Причина криоконсервации-«сохраненные» эмбрионы	104 (85,2 %)	128 (87,1 %)	76 (83,6 %)	0,9 ¹

Примечание: ¹ – критерий χ^2 ; ² – критерий Краскера–Уоллиса * $p \leq 0,05$

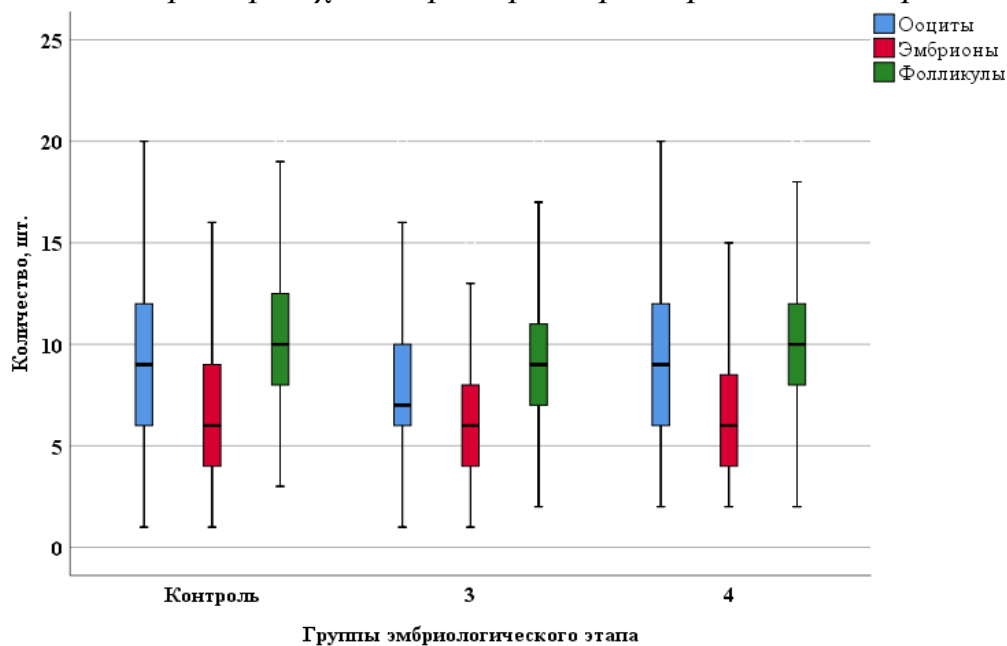


Рисунок 14 – Количество фолликулов, ооцитов и эмбрионов, полученных в результате овариальной стимуляции в группах сравнения эмбриологического этапа

В нашем исследовании овариальная стимуляция, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы, выполнялась всем женщинам по протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона. Женщины исследуемых групп имели нормальную массу тела, вступали в первый протокол или находились в группе риска по гиперстимуляции яичников. Медиана дня менструального цикла на начало овариальной стимуляции во всех группах сравнения составила 3, различия не значимы ($p=0,8$). В протоколах используемые курсовые дозы гонадотропинов не имели достоверных различий и составили: в группе вспомогательного хетчинга 2 175,0 ЕД, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 2 250,0 ЕД, в группе контроля – 2 250, $p=0,5$.

Трансвагинальная пункция в группах сравнения выполнялась на 14-й день менструального цикла, различия не значимы ($p=0,6$).

Уровни эстрадиола в день выполнения пункции в группах вспомогательного хетчинга, среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группе контроля не превышали референсных значений. Медиана уровня эстрадиола в группе вспомогательного хетчинга составила 2 047,0 pg/ml, в группе применения среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 2 151, 0 pg/ml, что также не имело достоверных различий с группой контроля (2 404,0 pg/ml, $p=0,3$).

В группе вспомогательного хетчинга было пунктировано 9 фолликулов и получено 7 ооцитов, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты было 10 фолликулов и 9 ооцитов, в группе контроля – 10 фолликулов и 9 ооцитов, различия не значимы ($p=0,9$ и $p=0,9$), (см. рисунок 14).

Оплодотворение *in vitro* проводилось путем инсеминации полученных ооцитов сперматозоидами партнера. После оплодотворения в группе вспомогательного хетчинга было получено 5 эмбрионов, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 6 эмбрионов и в группе контроля также 6 эмбрионов, различия не значимы ($p=0,8$), (см. рисунок 14).

Все эмбрионы соответствовали суткам культивирования согласно критериям «отличного и хорошего» качества (AA, AB, AB): в группе вспомогательного хетчинга в 98,4 % случаев, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – в 95,2 % случаев и в группе контроля – в 100 % случаев, различия не значимы ($p=0,5$).

Медиана толщины эндометрия на момент «свежего» переноса в группе вспомогательного хетчинга составила 8 мм, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 9 мм и в группе контроля – 9 мм, различия не значимы ($p=0,9$). Данный уровень М-Эхо соответствовал адекватному росту эндометрия в протоколе овариальной стимуляции.

Криоконсервация эмбрионов по причине профилактики гиперстимуляции яичников в группе вспомогательного хетчинга была выполнена у 18 женщин (14,8 % случаев), в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – у 19 женщин (12,9 % случаев), в группе контроля – у 15 женщин (16,4 %), различия не значимы ($p=0,8$).

Криоконсервация по причине одномоментного получения избыточного количества эмбрионов хорошего и удовлетворительного качества в группе вспомогательного хетчинга выполнена у 104 женщин (85,2 % случаев), в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – у 128 женщин (87,1 % случаев), в группе контроля – у 76 женщин (83,6 % случаев), различия не значимы ($p=0,9$).

Таким образом, в группах сравнения эмбриологического этапа ни по одному параметру цикла овариальной стимуляции, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы, достоверных различий не было выявлено (по протоколу овариальной стимуляции, по затраченным курсовым дозам гонадотропинов, по дню трансвагинальной пункции, по количеству пунктированных фолликулов, полученных ооцитов, по методу оплодотворения, количеству эмбрионов и по толщине эндометрия в «свежем» цикле).

Также в нашем исследовании были выявлены основные причины криоконсервации эмбрионов – профилактика синдрома гиперстимуляции яичников и «сохраненные» эмбрионы.

3.6 Сравнительная характеристика параметров криопротокола при использовании двух эмбриологических методик

Далее нами были изучены параметры криоконсервации эмбрионов в группах сравнения, поскольку оптимальные условия культивирования и перенос бластоцисты могут способствовать улучшению показателей имплантации и беременности. Оценка параметров качества и жизнедеятельности помогают в выборе эмбриона с самым высоким потенциалом имплантации (таблица 13).

Таблица 13 – Характеристика параметров криоконсервации эмбрионов групп сравнения эмбриологического этапа

Признак	3-я группа ВХ n=122	4-я группа ГК n=147	Нулевая или контрольная группа n=91	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)			
Паритет криопереноса	1 [1;2]	1 [1;5]	1 [1;3]	0,7 ²
Сутки заморозки	4 [1;6]	4 [3;5]	4 [1;5]	0,9 ²
Количество замороженных эмбрионов	3 [2;16]	4 [2;12]	3 [2;12]	0,8 ²
Длительность хранения эмбрионов на момент разморозки (мес.)	4 [1;32]	4 [1;32]	4 [1;35]	0,2 ²
Сутки переноса криоэмбрионов	5 [4;6]	5 [4;6]	5 [4;5]	0,9 ²
Количество эмбрионов на криоперенос	2 [1;2]	2 [1;2]	2 [1;2]	0,6 ²
Количество оставшихся эмбрионов	0 [0;12]	0 [0;9]	0 [0;9]	0,9 ²
День цикла на перенос размороженного эмбриона	20 [17;23]	20 [17;25]	20 [17;23]	0,6 ²
Толщина эндометрия (М-Эхо) на момент криопереноса в мм.	10 [8;10]	10 [8;10]	10 [8;10]	0,6 ²

Примечание: ¹ – критерий χ^2 ; ² – критерий Краскера–Уоллиса * $p \leq 0,05$

В группе вспомогательного хетчинга, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты, в группе контроля планировался первый криопротокол, в единичных случаях выполнялся 5-й перенос, различия не значимы ($p=0,7$).

В группе вспомогательного хетчинга, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группе контроля заморозка проводилась на 4-е сутки культивирования, различия не значимы ($p=0,9$). Медиана количества замороженных эмбрионов в группе вспомогательного хетчинга составила 3 эмбриона, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 4 эмбриона и в группе контроля – 3 эмбриона, различия не значимы ($p=0,8$).

В некоторых случаях длительность хранения эмбрионов после криоконсервации в группах сравнения варьировала от одного месяца до трех лет. Медиана длительности хранения эмбрионов во всех исследуемых группах составила 4 месяца, различия не значимы ($p=0,2$).

Следует отметить, что криопротокол состоит из таких этапов, как: подготовка эндометрия, размораживание эмбрионов и непосредственно перенос эмбриона(-ов). В нашем исследовании, учитывая результат первого этапа, – равнозначность двух схем подготовки эндометрия, на втором этапе подготовка эндометрия в группе вспомогательного хетчинга и в группе применения среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты проводилась с применением препаратов эстрогенов/гестагенов.

При разморозке эмбрионов, которые были криоконсервированы на 4-е сутки культивирования, использовалась технология доращивания до 5 суток, что способствовало селекции и выбору эмбрионов с высоким потенциалом имплантации. Медиана суток культивирования эмбриона на день переноса составила 5 суток во всех группах сравнения, различия статистически не значимы ($p=0,9$). По данным литературы, продление срока культивирования до 5-6 суток приводит к селекции эмбрионов: часть эмбрионов останавливается в развитии, другая часть достигает стадии бластоцисты.

Перенос на стадии бластоцисты позволяет выбрать наиболее жизнеспособных эмбрионов, снизить общее число переносимых и замораживаемых эмбрионов и повысить вероятность имплантации [20].

В клинической практике выполняется перенос не более двух эмбрионов. Учитываются следующие параметры: возраст женщины, состояние матки, количество и качество эмбрионов, исходы предыдущих программ ВРТ [20]. В группе вспомогательного хетчинга, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группе контроля выполнялся перенос двух эмбрионов отличного и хорошего качества под ультразвуковым контролем, различия не значимы ($p=0,6$).

После проведенного переноса в большинстве случаев эмбрионов не оставалось, в единичных случаях продолжалось хранение от одного до 12 эмбрионов. Медиана количества оставшихся эмбрионов в группе вспомогательного хетчинга, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группе контроля не имела достоверных различий и составила 0 ($p=0,9$).

Перенос размороженного эмбриона(-ов) проводился в группе вспомогательного хетчинга, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группе контроля на 20-й день менструального цикла (медиана = 20), различия не значимы ($p=0,6$).

Толщина эндометрия на момент переноса криоконсервированного эмбриона в группе вспомогательного хетчинга была в пределах 10 мм, что идентично группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группе контроля, различия не значимы ($p=0,6$). Данная толщина эндометрия является оптимальной для выполнения переноса [27].

Резюмируя вышеизложенное можно сделать вывод о том, что в нашем исследовании группа вспомогательного хетчинга, группа среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группа контроля достоверно не различались по характеристикам криопротокола: по паритету криопереноса, суткам заморозки и разморозки, длительности хранения,

суткам переноса на стадии бластоцисты и количеству переносимых эмбрионов, по количеству оставшихся эмбрионов, дню менструального цикла на перенос и толщине эндометрия. В нашем случае перенос бластоцисты был предложен в качестве еще одной стратегии улучшения показателей имплантации у пациенток с трубным бесплодием.

Совершенствование методов ВРТ всегда направлено на повышение частоты наступления беременности и живорождений, в этом случае особое внимание заслуживают исходы криопротоколов в группах сравнения при использовании вспомогательного хетчинга или среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты на эмбриологическом этапе и группе контроля у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием (таблица 14).

Таблица 14 – Характеристика исходов криопротоколов групп сравнения эмбриологического этапа

Признак	3-я группа ВХ n=122	4-я группа ГК n=147	Нулевая или контрольная группа n=91	P- value
	Me [IQR]/Абс.(%)			
Частота наступления беременности	57 (46,7 %)	72 (48,9 %)	24 (26,4 %)	$p_{03}=0,03^{1*}$ $p_{04}=0,02^{1*}$
Самопроизвольные выкидыши	18 (14,8 %)	16 (10,9 %)	5 (5,4 %)	$p_{03}=0,09^1$
Роды	39 (31,9 %)	56 (38,1 %)	19 (20,8 %)	$p_{04}=0,03^{1*}$
Срок родов	38 (37; 40)	38 (37; 40)	38 (37; 40)	$0,6^2$

Примечание: ¹ – критерий χ^2 ; ² – критерий Краскера–Уоллиса * $p \leq 0,05$

В исследовании нами были отслежены не только частота наступления беременности, которая регистрировалась по результатам ультразвукового исследования, но и отдаленные исходы беременности – самопроизвольные выкидыши до 12 недель и роды.

Максимальная частота наступления беременности по результатам УЗИ отмечена в обеих исследуемых группах, в которых использовались дополнительные эмбриологические методики – вспомогательный хетчинг

или применение среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты. В группе использования среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты частота наступления беременности составила 48,9 % против 26,4 %, что достоверно выше группы контроля на 22,5 %, в которой не использовались дополнительные эмбриологические технологии ($p_{04}=0,02$). В группе применения вспомогательного хетчинга частота наступления беременности также была достоверно высокой и составила 46,7 % против 26,4 %, что на 20,3 % выше по сравнению с группой контроля ($p_{03}=0,03$).

В группе вспомогательного хетчинга у 18 женщин беременность завершилась самопроизвольным прерыванием беременности до 12 недель, что составило 14,8 %. В группе применения среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты самопроизвольное прерывание беременности до 12 недель было зарегистрировано у 16 женщин (10,9 %). В группе контроля самопроизвольное прерывание беременности до 12 недель было зарегистрировано у 5 женщин (5,4 %). Во всех трех группах достоверной разницы по частоте самопроизвольного прерывания беременности до 12 недель не выявлено ($p=0,09$).

При анализе исходов беременностей в группе вспомогательного хетчинга роды были у 39 женщин (31,9 %). В группе применения среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты роды были у 56 женщин (38,1 %), что не различалось с показателями родов группы вспомогательного хетчинга, но было достоверно выше с частотой родов в контрольной группе 19 женщин (20,8 %; $p=0,03$). Медиана сроков родов во всех трех группах составила 38 недель, что соответствовало срочным родам, различия не значимы ($p=0,6$).

Таким образом, обе эмбриологические методики – вспомогательный хетчинг и применение среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – показали равнозначную клиническую эффективность по сравнению друг с другом и достоверно высокую частоту наступления беременности при сравнении с группой контроля, в которой данные методики не

использовались. Применение среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты достоверно повышает показатели эффективности криопротоколов по частоте срочных родов.

Все вышесказанное дает нам возможность сделать следующие выводы: использование эмбриологических методик – вспомогательного хетчинга или среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – достоверно повышает частоту наступления беременности по данным УЗИ. Кроме того, применение среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты достоверно улучшает исходы беременностей по частоте живорождений.

После проведенного анализа факторов, влияющих на исходы криопротокола пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием, нами были построены математические модели прогнозирования отрицательного исхода эмбриологического этапа у женщин молодого репродуктивного возраста с изолированным трубным фактором бесплодия.

3.7 Модели прогнозирования отрицательного исхода эмбриологического этапа у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием

Нередко в исследованиях возникает вопрос оценки частот отрицательного исхода в зависимости от факторов, представленных как дискретными, так и непрерывными переменными. Для такой оценки применяется логистическая регрессия. В качестве меры влияния фактора на частоту события используется отношение шансов [4]. Логистическая регрессия – статистическая модель прогнозирования вероятности события по значениям предикторов, в которой зависимая переменная принимает лишь одно из двух значений: 0 – событие не произошло и 1 – событие произошло, в нашем случае – не/наступление беременности. Таким образом, модель логистической регрессии может применяться в качестве объясняющей для оценки степени влияния предикторов на зависимую переменную

(беременность), а также в качестве прогностической для классификации новых наблюдений [4].

С одной стороны, главной целью лечения бесплодия, безусловно, является наступление беременности и последующее рождение ребенка. С другой стороны, имеет смысл анализ отрицательных исходов с целью определения факторов, которые вносят наиболее значимый вклад в неэффективность эмбриологической методики и ненаступление беременности в криопротоколе.

Для решения четвертой задачи исследования нами были получены факторы, которые вносят наиболее значимые вклад в отрицательный исход криопротокола и их отношения шансов, методом бинарной логистической регрессии, путем пошагового исключения переменных (таблицы 16 и 17). На основании чего разработаны две формулы ($Z_{ВХ}$ и $Z_{ГК}$) для каждой эмбриологической методики отдельно (для вспомогательного хетчинга и среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты) с последующим расчетом вероятности отрицательного исхода в криопротоколе.

Для модели вспомогательного хетчинга выполнено 48 шагов, для среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 45 шагов. Для оценки точности предсказаний формул построены ROC-кривые (рисунки 15 и 16).

В формулы вносятся показатели клинико-anamnestических данных, гормонального профиля, протокола овариальной стимуляции для расчета вероятности ненаступления беременности в криопротоколе (формулы 1 и 2). После постановки нужных значений производится расчет, по результатам которых полученные значения сравниваются между собой, и выбирается та методика, значение которой меньше. При получении результата $P_{ВХ} > P_{ГК}$ пациентке будет рекомендовано применение среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты для переноса размороженного эмбриона, при получении обратного значения – $P_{ВХ} < P_{ГК}$ – пациентке будет рекомендовано применение вспомогательного хетчинга на эмбриологическом этапе.

Таблица 16 – Коэффициенты и отношение шансов признаков, влияющих на отрицательный исход в криопротоколе у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием при применении вспомогательного хетчинга

№	Признак	Коэффициент	Среднеквадратичная ошибка	Вальд	р	Отношение шансов (ОШ) Adjusted	95% ДИ для ОШ	
							Нижняя	Верхняя
1	ИМТ	0,911	0,326	7,781	0,005	2,486	1,311	4,714
2	Стаж бесплодия	0,681	0,261	6,791	0,009	1,976	1,184	3,299
3	Регулярный характер менструального цикла	-9,370	3,639	6,629	0,010	0,000	0,000	0,107
4	Количество антральных фолликулов	0,900	0,334	7,272	0,007	2,461	1,279	4,734
5	ФСГ	1,207	0,548	4,855	0,028	3,343	1,143	9,781
6	Эстрадиол	0,015	0,006	6,816	0,009	1,015	1,004	1,026
7	Прогестерон	0,088	0,037	5,644	0,018	1,092	1,016	1,175
8	АМГ	-1,009	0,410	6,057	0,014	0,365	0,163	0,814
9	Количество неудачных программ ВРТ в анамнезе	-12,678	4,464	8,066	0,005	0,000	0,000	0,020
10	Суммарная доза гонадотропинов в цикле стимуляции	-0,003	0,001	6,789	0,009	0,997	0,994	0,999
11	М-Эхо в день переноса	-2,736	0,921	8,828	0,003	0,065	0,011	0,394
12	Количество полученных эмбрионов	0,901	0,324	7,744	0,005	2,461	1,305	4,641
13	Соответствие эмбрионов суткам культивирования	26,234	5,395	0,000	0,999	2,705	0,000	0,158
	Константа	-3,387	1,397	0,000	1,000	0,034		

Наблюдаемая зависимость описывается уравнением (1):

$$P_{BX} = 1 / (1 + e^{-Z}) * 100 \%, \text{ где } Z_{BX} = -3,387 + 0,911 * X_1 + 0,681 * X_2 - 9,370 * X_3 + 0,900 * X_4 + 1,207 * X_5 + 0,015 * X_6 + 0,088 * X_7 - 1,009 * X_8 - 12,678 * X_9 - 0,003 * X_{10} - 2,736 * X_{11} + 0,901 * X_{12} + 26,234 * X_{13} \quad (1)$$

P_{BX} – вероятность ненаступления беременности у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в криопротоколе при использовании вспомогательного хетчинга (%), X1 – ИМТ, X2 – стаж бесплодия, X3 – регулярный менструальный цикл (да/нет), X4 – количество антральных фолликулов, X5 – уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), X6 – уровень эстрадиола (Э), X7 – уровень прогестерона, X8 – уровень антимюллерового гормона (АМГ), X9 – количество неудачных программ ВРТ в анамнезе, X10 – суммарная доза гонадотропинов, затраченная в протоколе овариальной стимуляции (МЕ), X11 – М-Эхо в день переноса, X12 – количество полученных эмбрионов, X13 – соответствие эмбрионов суткам культивирования (да/нет).

Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель вспомогательного хетчинга (1) учитывает 87,1 % факторов, определяющих дисперсию вероятности прогнозирования отрицательного исхода у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в криопротоколе при использовании вспомогательного хетчинга. Чувствительность метода составила 69 %, специфичность – 74 %. Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 85,7 % (см. рисунок 15). $AUC = 0,857 (0,019)$ 95 % ДИ (0,92-0,994). Полученная модель была статистически значима ($p < 0,001$).

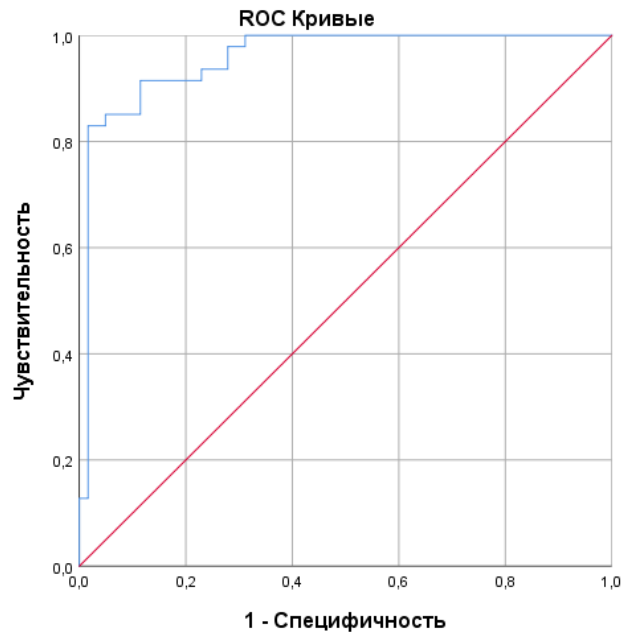


Рисунок 15 – ROC-кривая зависимости отрицательного исхода при использовании вспомогательного хетчинга в криопротоколе

Таблица 17 – Коэффициенты и отношение шансов признаков, влияющих на отрицательный исход в криопротоколе у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием при применении среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты

№	Признак	Коэффициент	Среднеквадратичная ошибка	Вальд	p	Отношение шансов (ОШ) Adjusted	95 % ДИ для ОШ	
							Нижняя	Верхняя
1	ИМТ	-16,151	6,982	5,351	0,021	0,000	0,000	0,085
2	Возраст менархе	5,940	2,402	6,113	0,013	3,79	3,426	4,2134
3	Беременности в анамнезе	16,013	6,879	5,420	0,020	9,006	6,457	12,574
4	Количество антральных фолликулов	1,710	0,687	6,202	0,013	5,531	1,439	21,256
5	АМГ	-3,863	1,594	5,870	0,015	0,021	0,001	0,478
6	Количество неудачных программ ВРТ	6,877	3,031	5,149	0,023	9,69	2,552	16,84568
7	День м.ц. на начало овариальной	5,329	2,365	5,078	0,024	2,06	2,001	2,1240

	стимуляции							
8	М-Эхо в день переноса в программе ЭКО	-4,256	1,751	5,911	0,015	0,014	0,000	0,438
9	Количество пунктированных фолликулов	-3,450	1,414	5,954	0,015	0,032	0,002	0,507
10	Количество полученных ооцитов	5,633	2,286	6,073	0,014	2,79	3,167	4,689
11	Перенос в протоколе ЭКО	19,851	8,746	5,151	0,023	4,1782	15,002	16,37222
12	Количество полученных эмбрионов	-5,423	2,240	5,860	0,015	0,004	0,000	0,356
13	М-Эхо в криопротоколе	3,000	1,235	5,900	0,015	2,092	1,785	6,179
14	Длительность хранения эмбрионов (мес.)	-0,464	0,189	6,021	0,014	0,629	0,434	0,911
15	Количество оставшихся эмбрионов	3,565	1,501	5,642	0,018	3,5326	1,865	6,149
16	СГЯ как причина криоконсервации	24,562	11,525	4,542	0,033	4,648	7,197	30,0
	Константа	602,654	259,136	5,409	0,020	5,3619		

Вторая модель для прогнозирования отрицательного исхода при использовании среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в криопротоколе, выполненная также методом бинарной логистической регрессии, путем пошагового исключения переменных, включала 45 шагов.

Наблюдаемая зависимость описывается уравнением (2):

$$P_{ГК} = 1 / (1 + e^{-Z}) * 100\%$$

$$Z_{ГК} = 602,654 - 16,151 * X_1 + 5,940 * X_2 + 16,013 * X_3 + 1,710 * X_4 - 3,863 * X_5 + 6,877 * X_6 + 5,329 * X_7 - 4,256 * X_8 - 3,450 * X_9 + 5,633 * X_{10} + 19,851 * X_{11} - 5,423 * X_{12} + 3,000 * X_{13} - 0,464 * X_{14} + 3,565 * X_{15} + 24,562 * X_{16} \quad (2)$$

где $P_{ГК}$ – вероятность ненаступления беременности у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в криопротоколе при использовании среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты (%), X_1 – ИМТ, X_2 – возраст менархе, X_3 – наличие беременностей в анамнезе (да/нет), X_4 – количество антральных фолликулов, X_5 – уровень антимюллерового гормона (АМГ), X_6 – количество неудачных программ ВРТ в анамнезе, X_7 – день менструального цикла на начало овариальной стимуляции, X_8 – М-Эхо в

протоколе ЭКО, X9 – количество пунктированных фолликулов, X10 – количество полученных ооцитов, X11 – «свежий» перенос в протоколе ЭКО (да/нет), X12 – количество полученных эмбрионов в протоколе ЭКО, X13 – М-Эхо в криопротоколе (мм), X14 – длительность хранения эмбрионов (месяцы), X15 – количество оставшихся эмбрионов после переноса, X16 – профилактика гиперстимуляции яичников как причина криоконсервации эмбрионов (да/нет).

Полученная регрессионная модель является статистически значимой ($p < 0,001$). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель применения среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты (2) учитывает 88,3 % факторов, определяющих дисперсию вероятности прогнозирования отрицательного исхода у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в криопротоколе. Чувствительность метода составила 63 %, специфичность – 80 %. Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 88,4 % (см. рисунок 16). $AUC = 0,884(0,021)$ 95 % ДИ (0,82-0,874).

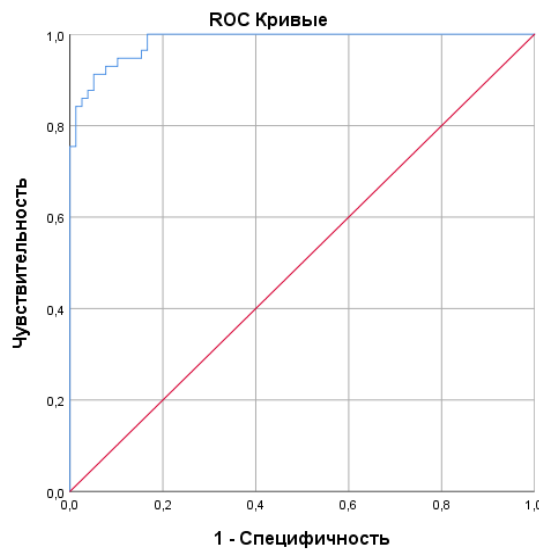


Рисунок 16 – ROC-кривая зависимости ненаступления беременности при использовании среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в криопротоколе

Обе модели прогнозирования отрицательного исхода в криопротоколе у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием при выборе

эмбриологического этапа (применение вспомогательного хетчинга и среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты) демонстрируют высокую чувствительность и специфичность (ВХ – 69 % и 74 %; ГК – 63 % и 80 % соответственно). Обе модели учитывают 87,1 % и 88,3 % факторов, определяющих дисперсию вероятности прогнозирования ненаступления беременности у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в криопротоколе, что позволяет говорить о высокой эффективности полученных в исследовании моделей. Визуальное сравнение двух ROC-кривых указывает на их высокую эффективность, обе кривые свидетельствуют о большой предсказательной способности моделей (см. рисунки 15 и 16). Оценка площади под кривыми (вспомогательный хетчинг – $AUC=0,857$ (0,019) и среда с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – $AUC=0,884$ (0,021) свидетельствуют об очень хорошем качестве представленных моделей.

Экзамен выведенной математической формулы для вспомогательного хетчинга был проведен на 33 женщинах, имеющих изолированный трубно-перитонеальный фактор бесплодия, которые вступили в криопротоколы в 2021–2022 годах. Данным пациенткам эмбриологический этап выполнялся с проведением вспомогательного хетчинга либо без применения данной эмбриологической методики. Полученные результаты показали совпадение ожидаемого прогноза у 27 пациенток. В целом, точность прогноза составила 80 %.

Экзамен выведенной математической формулы для среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты был проведен на 38 женщинах, имеющих изолированный трубно-перитонеальный фактор бесплодия, криопротоколы проводились в 2021–2022 годах. Данным пациенткам эмбриологический этап выполнялся с переносом размороженного эмбриона на стандартной среде для переноса, либо с использованием среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты. Полученные результаты показали

совпадение ожидаемого прогноза у 29 пациенток. В целом, точность прогноза составила 76 %.

Пример практического применения математических моделей в условиях клинической практики №1: пациентка М., 27 лет, ИМТ 28 кг/м², менархе с 14 лет, имеет регулярный характер менструального цикла. Стаж бесплодия 5 лет, в анамнезе 2 неудачные программы ВРТ. Всего было 5 беременностей. По результатам ультразвукового исследования количество антральных фолликулов составило 10 штук. По результатам лабораторного исследования: уровни ФСГ – 8 mIU/ml; эстрадиол – 200 pg/ml, прогестерон 10 нмоль/л, АМГ – 5 ng/ml. День цикла на начало стимуляции – 1-й. Суммарная доза гонадотропинов, затраченная в протоколе ЭКО, равна 1500 МЕ. Количество пунктированных фолликулов – 10 штук, полученных ооцитов – 8 штук и эмбрионов – 6 штук, все эмбрионы соответствуют суткам культивирования. У пациентки выполнен «свежий» перенос в программе ЭКО, оставшиеся эмбрионы (5 штук) криоконсервированы, длительность хранения составила 3 месяца. Толщина эндометрия в день переноса эмбриона составила 12 мм. Подставляя имеющиеся значения в формулу 1, мы получили риск отрицательного исхода в 5,4 % у данной пациентки в криопротоколе, при использовании вспомогательного хетчинга. При вычислении по формуле 2 нами был получен риск отрицательного исхода в 1 % у данной пациентки, при применении среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в криопротоколе. Таким образом, при подсчете значений по формулам 1 и 2 данной женщине рекомендовано использование среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты для повышения результативности при переносе размороженного эмбриона ($P_{ВХ} > P_{ГК}$). После выполненного переноса размороженного эмбриона с применением среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты у данной пациентки была диагностирована клиническая беременность по результатам УЗИ.

Пример №2: пациентка Д., 27 лет, ИМТ 24 кг/м², менархе с 13 лет, имеет регулярный характер менструального цикла. Стаж бесплодия 4 лет, в анамнезе 1 неудачная программа ВРТ. Всего было 2 беременности. По результатам ультразвукового исследования количество антральных фолликулов составило 7 штук. По результатам лабораторного исследования: уровни ФСГ – 5 mIU/ml; эстрадиол – 210 pg/ml, прогестерон 12 нмоль/л, АМГ – 6 ng/ml. День цикла на начало стимуляции – 2-й. Суммарная доза гонадотропинов, затраченная в протоколе ЭКО, равна 1500 МЕ. Количество пунктированных фолликулов – 6 штук, полученных ооцитов – 5 штук и эмбрионов – 5 штук, все эмбрионы соответствуют суткам культивирования. У пациентки выполнен «свежий» перенос в программе ЭКО, оставшиеся эмбрионы (4 штук) криоконсервированы, длительность хранения составила 2 месяца. Толщина эндометрия в день переноса эмбриона составила 10 мм. Подставляя имеющиеся значения в формулу 1, мы получили риск отрицательного исхода в 0,6 %, при использовании вспомогательного хетчинга у данной пациентки в криопротоколе. При вычислении по формуле 2 нами был получен риск отрицательного исхода в 1,4 % у данной пациентки, при применении среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в криопротоколе. Таким образом, при подсчете значений по формулам 1 и 2 женщине рекомендовано применение вспомогательного хетчинга для повышения результативности при переносе размороженного эмбриона ($P_{ВХ} < P_{ГК}$). После выполненного переноса размороженного эмбриона с применением вспомогательного хетчинга у данной пациентки была диагностирована клиническая беременность по результатам УЗИ.

Затем нами в исследовании были получены скорректированные отношения шансов (ОШ) для факторов риска отрицательного исхода после разработки формул. Значимыми факторами риска неудачи эмбриологических методик у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием до 35 лет явились: неудачи криопротокола при проведении вспомогательного хетчинга ассоциированы с высоким уровнем фолликулостимулирующего гормона

(ОШ=3,34; ДИ 1,14-9,78), тогда как отсутствие беременности при использовании среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты определяется преимущественно количеством неудачных программ вспомогательных репродуктивных технологий в анамнезе (ОШ=9,69; ДИ 2,55–16,8).

Таким образом, при вступлении пациентки в криопротокол применение двух формул для прогноза эффективности эмбриологической методики (вспомогательного хетчинга или среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты) повысит шансы на положительный исход программы.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема бесплодного брака имеет широкое распространение по всему миру, по данным экспертов ВОЗ, в 2010 году в мире насчитывалось около 48,5 миллионов бесплодных пар [72]. Несмотря на принимаемые мировым сообществом меры, в настоящее время показатели бесплодия остаются на прежнем высоком уровне [45]. В связи с этим большую актуальность приобретает повышение эффективности программ ВРТ, в частности, криопереносов путем внедрения и разработок новых подходов к эмбриологическому этапу и схемам подготовки эндометрия. За последние десятилетия были предложены различные модификации и новые подходы, призванные повысить эффективность лечения методами ВРТ: различные схемы подготовки эндометрия, проведение вспомогательного хетчинга, использование среды для переноса эмбриона с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и др.

Подготовке эндометрия в криопротоколе всегда отводится важная роль, поскольку эмбрионы необходимо переносить в матку в период, соответствующий ожидаемому «окну имплантации». Более физиологичным считается перенос в естественном менструальном цикле, однако он имеет свои недостатки, такие как длительное ожидание спонтанной овуляции [99]. Более практичными для переноса размороженного эмбриона являются циклы с назначением препаратов эстрогенов и гестагенов. В цикле гормональной терапии экзогенные добавки эстрогенов используются для стимуляции роста эндометрия и ингибирования роста фолликулов. Цикл с гормональной терапией более гибок и удобен, что упрощает планирование переноса эмбриона и приводит к более низкому уровню отмены по сравнению с другими циклами [177]. Кроме того, для гарантированной супрессии гипофиза и предотвращения спонтанной овуляции можно использовать агонисты гонадропин-рилизинг гормона [36].

Важный завершающий этап во время предимплантационного развития

– выход бластоцисты из блестящей оболочки – естественный хетчинг [87]. Неспособность эмбриона к выходу из блестящей оболочки или неудачный хетчинг может быть одним из факторов, приводящих к нарушению имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Вспомогательный хетчинг является методикой, разработанной для преодоления этой проблемы в протоколах ВРТ [87].

Не менее значимым этапом в эмбриологии является выбор среды для культивирования и переноса эмбрионов. На сегодняшний день имеется разнообразный выбор культуральных сред, как универсальных, так и специализированных, для культивирования и переноса эмбрионов [76]. В состав среды для переноса «EmbryoGlue» входит гиалуроновая кислота (гиалуронан) в высокой концентрации, за счет чего повышается ее вязкость; также в составе среды имеются сахараиды с аминокислотами, которые необходимы для поддержания эмбриона во время переноса и имплантации [178]. Накопленные научные данные о применении среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты весьма неоднозначны – одни авторы говорят, что использование такой среды уменьшает частоту наступления внематочной беременности и облегчает имплантацию, с другой стороны, имеется мнение, что рутинное использование среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты не приводит к значительному увеличению частоты наступления беременности [101, 149]. На данный момент проведено множество сравнительных исследований по изучению эффективности применения того или иного метода, однако мнения специалистов противоречивы.

Для достижения цели исследования и решения поставленных задач было обследовано 1 676 женщин, обратившихся в Центр охраны здоровья семьи и репродукции ОПЦ, получавших лечение по поводу бесплодия, у которых хранились эмбрионы. Соответствовали критериям включения 404 женщины, из которых согласились принять участие в исследовании 360 женщин. Отказались от участия в исследовании и продолжили хранение

эмбрионов 44 женщины. При формировании групп в качестве **критериев включения** использован набор условий: наличие замороженных эмбрионов, полученных при овариальной стимуляции с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона у женщин с изолированным трубно-перитонеальным бесплодием; возраст от 18 до 35 лет включительно; отсутствие тяжелой соматической патологии.

В качестве критериев исключения были определены следующие условия: возраст младше 18 лет и старше 36 лет включительно; наличие других факторов бесплодия; хронический эндометрит; наружный генитальный эндометриоз, аденомиоз; миома матки, аномалии матки; новообразования органов репродуктивной системы; образования гипофиза; кисты яичников; мужское бесплодие; другие формы женского бесплодия, ожирение, отсутствие замороженных эмбрионов; использование любого донорского материала (донорские ооциты, сперматозоиды и эмбрионы); все состояния, при которых проведение программы ЭКО и вынашивание беременности были противопоказаны.

В рамках нашего исследования на первом этапе был проведен сравнительный анализ эффективности схем подготовки эндометрия в криопротоколе с назначением препаратов эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона. Сформированы две группы: **1-я группа** – подготовка эндометрия препаратами эстрогенов и гестагенов (**n=63**), **2-я группа** – подготовка эндометрия препаратами эстрогенов и гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (**n=28**).

На втором этапе исследования проведена оценка эффективности эмбриологических методик – перенос размороженного эмбриона с проведением вспомогательного хетчинга либо использование среды для переноса эмбриона с высоким содержанием гиалуроновой кислоты. Сформированы группы: **3-я группа** – вспомогательный хетчинг (**n=122**), **4-я группа** – перенос с использованием среды с высоким содержанием

гиалуроновой кислоты (**n=147**). По результатам первого этапа исследования из двух групп подготовки эндометрия была сформирована одна **контрольная группа** для эмбриологического этапа (1+2 группа, **n=91**).

Нами был проведен комплексный сравнительный анализ клинико-анамнестических, лабораторных, ультразвуковых параметров, изучен цикл предшествующей овариальной стимуляции, в результате которой были получены и криоконсервированы эмбрионы и выполнен криопротокол (подготовка эндометрия, разморозка, перенос эмбрионов). Особое внимание уделено результативности криопротоколов и исходам наступивших беременностей (частота наступления клинической беременности по данным УЗИ, частота самопроизвольных прерываний до 12 недель, частота и сроки родов).

В нашем исследовании все обследованные пациентки групп сравнения двух схем подготовки эндометрия были сопоставимы по возрасту, началу менархе, индексу массы тела, характеру менструального цикла и другим параметрам. Возраст исследуемых женщин не превышал 35 лет, что обуславливало достаточный овариальный резерв, с одной стороны, и наличие эмбрионов для криоконсервации, с другой. Продолжительность бесплодия составила от 5 до 7 лет, что явилось поводом направить данных женщин на лечение методами ВРТ.

В нашем исследовании все пациентки групп сравнения двух схем подготовки эндометрия имели изолированный трубно-перитонеальный фактор бесплодия. По данным литературы, основными причинами трубно-перитонеального бесплодия являются: ранее перенесенные воспалительные заболевания органов малого таза, внутриматочные манипуляции, оперативные вмешательства на органах малого таза и брюшной полости [46, 49]. По результатам исследования автора Новиковой В.А. и соавт., установлено, что хронический сальпингит ассоциирован со снижением овариального резерва у женщин репродуктивного возраста. Негативное

влияние на параметры овариального резерва оказывает возраст женщины, что усугубляется при длительном течении заболевания [33].

В нашем исследовании более чем в половине случаев в структуре сопутствующих гинекологических заболеваний встречались воспалительные заболевания органов малого таза и, как следствие, – попытки восстановительного лечения в виде реконструктивно-пластических операций на маточных трубах. Вместе с тем, следует подчеркнуть, что спонтанного наступления беременности после проведения реконструктивно-пластических операций на маточных трубах в нашем исследовании не наблюдалось, и данные женщины были направлены в протоколы ВРТ.

Одной из немаловажных составляющих эффективного лечения бесплодия является получение качественной яйцеклетки. Функциональный резерв яичника, или «овариальный резерв», определяет способность к развитию здорового фолликула с полноценной яйцеклеткой [6]. Показателями овариального резерва являются количество антральных фолликулов, измеренное на 2–3-й день менструального цикла, и уровень АМГ [21]. Определение уровня базального АМГ у исследуемых пациенток показало, что его уровень соответствовал параметрам фертильных женщин.

В нашем исследовании был проведен ретроспективный анализ протокола овариальной стимуляции, в результате которого были получены и криоконсервированы эмбрионы в группах сравнения двух схем подготовки эндометрия. Во всех случаях использовался протокол с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона, который имеет следующие преимущества: уменьшается продолжительность стимуляции и суммарная доза гонадотропинов, снижаются риски развития гиперстимуляции, уменьшается период гормонального и ультразвукового мониторинга, что сокращает эмоциональный стресс для пациентки [20]. Курсовая доза используемых гонадотропинов, день начала стимуляции, день трансвагинальной пункции, уровень эстрадиола в день пункции в группах сравнения не различались. Трансвагинальная пункция под ультразвуковым контролем в двух группах

подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона выполнялась на 14-й день цикла, было пунктировано 10 фолликулов и получено 9 ооцитов. Всем женщинам оплодотворение *in vitro* проводилось методом ЭКО. Количество полученных эмбрионов в группах сравнения составило 7 штук, они соответствовали суткам культивирования согласно критериям «отличного и хорошего» качества [8].

Проведя анализ протокола овариальной стимуляции, в результате которых были получены и криоконсервированы эмбрионы для последующего криопереноса, мы не выявили достоверных различий в группах сравнения подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона.

Криоконсервация рационально решает проблему хранения и дальнейшего использования эмбрионов. Основными причинами криоконсервации эмбрионов в нашем исследовании были: профилактика синдрома гиперстимуляции яичников и «сохраненные» эмбрионы. Данные литературы подтверждают, что при риске развития синдрома гиперстимуляции яичников рекомендуется отмена переноса в данном лечебном цикле и криоконсервация эмбрионов [20].

Заморозка эмбрионов проводилась на 4-е сутки культивирования по стандартной методике. Длительность хранения эмбрионов в двух группах подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона составила 5 и 3 месяца соответственно, однако были единичные пациентки, которые хранили эмбрионы длительно – более трех лет. В настоящее время вопрос длительности хранения активно обсуждается: анализ 58 тысяч криоконсервированных бластоцист за 11 лет показал, что длительность хранения не влияет на результаты вспомогательных репродуктивных технологий. Выживаемость эмбрионов не имела

статистических различий между категориями времени хранения, что доказывает безопасность заморозки эмбрионов даже после длительных периодов хранения [81]. У большинства исследуемых женщин в группах подготовки эндометрия планируемый криопротокол был первым по счету.

Программы криоконсервации эмбрионов являются неотъемлемой частью вспомогательных репродуктивных технологий. Криопротокол состоит из подготовки эндометрия, разморозки и переноса эмбрионов. По данным литературы, подготовка эндометрия к переносу криоконсервированного эмбриона может проводиться с использованием гормональной терапии препаратами эстроген/гестагенов. Что, с одной стороны, делает криопротокол как для пациентов, так и для центров лечения бесплодия более удобным, за счет контроля сроков переноса эмбрионов, с другой – не исключает спонтанного роста фолликулов, что десинхронизирует рост эндометрия и развитие эмбриона [141]. Для гарантированной супрессии гипофиза и предотвращения спонтанного роста фолликулов возможно использование агонистов гонадотропин-рилизинг гормона [156]. В нашем исследовании в группах сравнения подготовка эндометрия выполнялась с назначением препаратов эстрогенов и гестагенов (1-я группа) и эстрогенов и гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (2-я группа).

Эндометрий представляет собой гормонозависимую слизистую оболочку, которая выстилает полость матки и подвергается циклической пролиферации и дифференцировке для поддержки имплантации эмбриона [90]. В клинической практике рутинно используются ультразвуковое исследование для определения толщины эндометрия и его эхографические особенности. По данным литературы, минимальная толщина эндометрия, которую следует учитывать перед тем, как приступить к размораживанию и переносу эмбрионов, остается предметом дискуссий. Необходимой для оптимальной восприимчивости эндометрия и имплантации часто считается толщина не менее 7 мм для переноса [99]. В нашем исследовании при

назначении обеих схем подготовки эндометрия достигнута оптимальная толщина для переноса эмбриона – 10 мм, что ассоциируется с благоприятным прогнозом для имплантации. Вместе с тем, следует подчеркнуть, что независимо от схемы подготовки эндометрия у всех женщин была достигнута оптимальная толщина эндометрия в криопротоколе, что еще раз свидетельствует о сопоставимой клинической эффективности данных схем.

В рамках проведения программы ВРТ перенос эмбрионов может быть осуществлен на 3-и сутки (стадия дробления) или 5-6-е сутки развития (стадия бластоцисты). До недавнего времени в большинстве циклов ВРТ эмбрионы переносились на стадии дробления. По мере расширения знаний о метаболических потребностях эмбриона в последнее время появилась тенденция к переносу на стадии бластоцисты [97]. В нашем исследовании перенос размороженных эмбрионов в полость матки в двух группах подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона осуществлялся с использованием техники доращивания до 5 суток культивирования. Перенос был выполнен на 20-й день менструального цикла, переносилось по 1-2 эмбриона под ультразвуковым контролем. Все переносимые эмбрионы в двух группах подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенов и эстроген/гестагенов в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона соответствовали суткам культивирования.

Диагностика беременности в криопротоколе проводилась после переноса эмбриона в полость матки путем определения β -ХГЧ иммуноферментным анализом в сыворотке крови. Клиническая диагностика беременности проводилась на 21-й день после переноса эмбриона. Ультразвуковое исследование осуществлялось на 5-6-й неделе беременности.

Традиционно критерием эффективности лечения бесплодия методами ВРТ является доля (% от числа пролеченных) женщин, у которых клиническая беременность подтверждена с помощью ультразвукового исследования. Данный параметр называется «частота наступления

клинической беременности». В нашем исследовании анализ эффективности схем подготовки эндометрия показал, что в группе подготовки препаратами эстроген/гестагенами частота наступления беременности составила 28,6 %, в группе подготовки эндометрия с эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона – 32,1 % соответственно, что не имело достоверных различий ($p=0,7$). Частота самопроизвольных прерываний беременности до 12 недель составила 4,7 % и 3,6 % соответственно, что не имело достоверных различий ($p=0,7$).

В группе подготовки эндометрия эстроген/гестагенами срочные роды произошли у 23,8 % случаев, в группе подготовки эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона – у 17,9 % случаев, различия статистически не значимы ($p=0,8$). Срок родов был доношенным и составил 37–38 недель, различия не значимы ($p=0,06$). Выявленная тенденция в исходах после проведенных криопереносов соответствует общемировым данным и отчетам Регистра РАРЧ [25, 26].

В литературных источниках не существует единого мнения о протоколах подготовки эндометрия [96, 100]. Так, по данным когортного исследования автора Xia Leizhen и соавт., в котором был проведен анализ эффективности гормональной подготовки эндометрия у женщин с неудачами имплантации эмбрионов в анамнезе, причины бесплодия были разнообразными – аденомиоз и наружный генитальный эндометриоз, пороки развития матки, синдром поликистозных яичников, внутриматочные спайки, старший репродуктивный возраст. Для пациенток, у которых не было ни одного случая неудачной имплантации эмбриона в анамнезе, частота живорождения в протоколах с эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона была одинакова. У женщин с множественными неудачами применение агонистов гонадотропин-рилизинг гормона в протоколе подготовки эндометрия улучшало частоту живорождений [163].

Недавний метаанализ Кокрейна от 2021 г. автора Glujovsky Demián и

соавт. также продемонстрировал сопоставимую клиническую частоту наступления беременности и выкидышей после подготовки эндометрия препаратами эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона и без него в криопротоколах у женщин с использованием донорских ооцитов [98]. В другом исследовании от 2023 года, по данным автора Jingdi Yang и соавт., при сравнении 4 протоколов подготовки эндометрия (эстроген/гестагены, эстроген/гестагены в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона, естественный цикл и модифицированный) также не было выявлено достоверных различий в исходах у женщин с эндометриозом, осложненным аденомиозом, в возрасте до 40 лет включительно [103]. Также в работе автора Yu Yi и соавт. при сравнении исходов беременности при различных протоколах подготовки эндометрия у пациенток с аденомиозом и тонким эндометрием во время переноса замороженных эмбрионов было выявлено отсутствие существенных различий [171]. Стоит заметить, что использование агонистов гонадотропин-рилизинг гормона может увеличить стоимость и продолжительность подготовки эндометрия в циклах ВРТ [177].

В нашем исследовании все пациентки имели изолированный трубно-перитонеальный фактор, возраст не превышал 35 лет, и репродуктивный анамнез не был отягощен множественными неудачными протоколами ВРТ. Кроме того, в нашем исследовании наличие эндометриоза и использование донорского материала были критерием исключения. Изучение эффективности криопротоколов у женщин с изолированным трубно-перитонеальным фактором бесплодия в зависимости от схем подготовки эндометрия показало одинаковую эффективность по частоте наступления беременности по данным УЗИ, частоте самопроизвольных выкидышей и частоте родов. Вышепредставленные данные позволили нам сделать следующий вывод: обе схемы подготовки эндометрия показали себя клинически одинаково эффективными у женщин с изолированным трубно-перитонеальным бесплодием при переносе размороженных эмбрионов.

На втором этапе нашего исследования было проведено изучение эффективности применения дополнительных эмбриологических методик в криопротоколе: вспомогательный хетчинг (3-я группа) и среда для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в криопротоколе (4-я группа). Группа вспомогательного хетчинга составила 122 женщины, группа среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 147 женщин. Исходя из вышепредставленных результатов первого этапа исследования, из двух групп подготовки эндометрия была сформирована одна контрольная (n=91) для эмбриологического этапа, поскольку данным женщинам не выполнялись эмбриологические манипуляции, а обе схемы подготовки эндометрия сработали одинаково эффективно.

В нашем исследовании группа вспомогательного хетчинга, группа среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и группа контроля достоверно не различались по возрасту, началу менархе, индексу массы тела, характеру менструального цикла и другим параметрам. Группы сравнения эмбриологических методик и группа контроля также не имели достоверных различий по характеристикам овариальной стимуляции и криоконсервации: эмбрионы криоконсервировались на 4-е сутки культивирования по 3-4 эмбриона. Длительность хранения составила 4 месяца. В единичных случаях хранение осуществлялось длительно. У большинства женщин планировался первый криопротокол с подготовкой эндометрия препаратами эстроген/гестагенами для достижения оптимальной готовности эндометрия и принятия эмбриона. Эмбрионы перед переносом размораживались и подвергались доращиванию до 5 суток культивирования – до стадии эмбриона класса «бластоциста». Количество переносимых эмбрионов было 1-2. В данном случае перенос бластоцисты был предложен в качестве еще одной стратегии улучшения показателей имплантации. Поскольку эффективность программ ВРТ зависит от качества переносимого эмбриона и готовности эндометрия.

В нашем исследовании во всех группах сравнения эмбриологического этапа и группы контроля перенос размороженного эмбриона проводился на 20-й день менструального цикла, толщина эндометрия в группе вспомогательного хетчинга, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты и в группе контроля не имела достоверных различий и составила 10 мм в день переноса.

По данным литературы считается, что адекватное развитие эндометрия играет решающую роль в имплантации эмбриона, развитии плаценты и последующих акушерских исходах, включая преэклампсию, отслойку плаценты, предлежание плаценты, малый размер новорожденного для гестационного возраста и преждевременные роды [176].

В нашем исследовании анализ исходов криопротоколов показал, что частота наступления клинической беременности по данным УЗИ составила: в группе контроля – 26,4 %, в группе вспомогательного хетчинга – 46,7 %, в группе среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 48,9 % ($p \leq 0,05$). Применение вспомогательного хетчинга достоверно увеличило частоту наступления беременности на 20,3 %, а применение среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – на 22,5 % по сравнению с группой контроля, где не использовались дополнительные эмбриологические технологии. Достоверно высокий процент родов в сроке 38 недель беременности наблюдался в группе использования среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – 38,1 %, что на 17,3 % выше по сравнению с показателями родов в группе контроля без дополнительных эмбриологических технологий -20,8 %, $p=0,03$.

По данным мета-анализов положительное влияние вспомогательного хетчинга отмечено в протоколах ЭКО и ИКСИ [115]. Положительное влияние механического, химического и лазерного хетчинга на исходы в программах ВРТ исследователями MeiFang Zeng и соавт. подчеркивается в их публикации. Однако в данной работе не проведена стратификация

факторов бесплодия, учитывались «свежие» и криоконсервированные переносы [174]. В нашем исследовании было проведено изучение влияния данной методики именно при переносе размороженных эмбрионов у женщин с изолированным трубно-перитонеальным бесплодием.

В Кокрейновских обзорах Bontekoe S. и соавт. было изучено влияние соединений, способствующих адгезии в средах для переноса эмбрионов при проведении программ ВРТ у 3 898 человек. Полученные данные свидетельствовали об улучшении показателей клинической беременности и живорождения при использовании гиалуроновой кислоты [64]. Однако в данном исследовании не учитывались факторы бесплодия, не было конкретизации протоколов ВРТ, учитывался только общий коэффициент наступления беременности и живорождения. Наше исследование отличается детализированным подходом: был проведен анализ влияния среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты в циклах с переносом размороженных эмбрионов у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием. В другом исследовании под руководством Neumann Devorah и соавт. добавление гиалуроновой кислоты в среду для переноса приводило к увеличению как частоты клинической беременности, так и частоты многоплодной беременности в программах ЭКО/ИКСИ [106]. В нашем исследовании учитывались только циклы с переносом размороженных эмбрионов, и многоплодных беременностей зафиксировано не было.

В нашем исследовании полученные результаты при изучении эффективности криопротоколов у женщин с изолированным трубно-перитонеальным фактором бесплодия свидетельствуют о значимом влиянии эмбриологических методик – вспомогательный лазерный хетчинг и применение среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты. Учитывая вышепредставленные данные, мы сделали следующий вывод: применение эмбриологических методик при переносе криоконсервированного эмбриона у

женщин с изолированным трубно-перитонеальным бесплодием улучшает исходы криопротоколов по частоте наступления беременности и родов.

Применение прогностических моделей для прогнозирования исхода при применении той или иной эмбриологической методики вызывает особый интерес. Изменчивость характеристик пациента и исходы вспомогательных репродуктивных технологий диктуют необходимость введения персонализированных стратегий лечения. На сегодняшний день созданы отечественные модели в области прогнозирования наступления беременности для пациенток при селективном переносе одного эмбриона в протоколах ЭКО/ИКСИ. Представленная модель может быть использована для консультирования пар по поводу решения вопроса о выборе переноса одного или двух эмбрионов только в протоколах овариальной стимуляции с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона, назначенных с 5-го дня стимуляции. Однако прогностическая ценность данной модели в стандартных протоколах ограничена [35]. В нашем исследовании для решения четвертой задачи были построены прогностические модели именно для прогноза результатов применения эмбриологических методик (применение вспомогательного хетчинга или среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты) в криопротоколах у женщин с изолированным трубно-перитонеальным бесплодием до 35 лет.

Нами были проанализированы исходы в двух исследуемых группах: 1-я группа вспомогательного хетчинга ($Z_{ВХ}$) и 2-я группа среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты ($Z_{ГК}$). Далее нами были разработаны две прогностические модели для прогнозирования отрицательных исходов эмбриологических методик (вспомогательного хетчинга и среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты) в криопротоколе методом бинарной логистической регрессии, путем пошагового исключения переменных.

Полученная регрессионная модель для вспомогательного хетчинга была статистически значимой ($p < 0,0001$). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель вспомогательного хетчинга (1) учитывала 87,1 % факторов, определяющих дисперсию вероятности прогнозирования отрицательного исхода у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в криопротоколе при использовании вспомогательного хетчинга. Чувствительность метода составила 69 %, специфичность – 74 %. Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 85,7 % (см. рисунок 15). $AUC=0,857(0,019)$ 95 % ДИ (0,92-0,994).

Полученная регрессионная модель для среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты является статистически значимой ($p < 0,001$). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель (2) учитывает 88,3 % факторов, определяющих дисперсию вероятности прогнозирования отрицательного исхода у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в криопротоколе. Чувствительность метода составила 63 %, специфичность – 80 %. Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 88,4 % (см. рисунок 16). $AUC=0,884(0,021)$ 95 % ДИ (0,82-0,874).

Обе модели прогнозирования отрицательного исхода эмбриологической методики (применение вспомогательного хетчинга и среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты) в криопротоколе у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием демонстрируют высокую чувствительность и специфичность (ВХ – 69 % и 74 %; ГК – 63 % и 80 % соответственно). Обе модели учитывают 87,1 % и 88,3 % факторов, определяющих дисперсию вероятности отрицательного исхода у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в криопротоколе, что позволяет говорить о высокой эффективности полученных в исследовании моделей.

Визуальное сравнение двух ROC-кривых указывает на их высокую эффективность, обе кривые свидетельствуют о большой предсказательной способности моделей (см. рисунки 15 и 16). Оценка площади под кривыми

(вспомогательный хетчинг – $AUC=0,857(0,019)$ и среда с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – $AUC=0,884(0,021)$) свидетельствуют об очень хорошем качестве представленных моделей.

Затем в исследовании нами были получены скорректированные отношения шансов для факторов риска отрицательного исхода после разработки формул. Значимыми факторами риска отрицательного исхода эмбриологических методик у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием до 35 лет явились: при проведении вспомогательного хетчинга неудачи криопротокола ассоциированы с высоким уровнем фолликулостимулирующего гормона ($ОШ=3,34$; ДИ 1,14-9,78), тогда как отсутствие беременности при использовании среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты определяется преимущественно количеством неудачных программ вспомогательных репродуктивных технологий в анамнезе ($ОШ=9,69$; ДИ 2,55-16,8).

Таким образом, проведенный нами анализ, посвященный изучению эффективности двух схем подготовки эндометрия и эмбриологическому этапу, включающему применение вспомогательного хетчинга и перенос размороженного эмбриона с использованием среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты, позволяет сделать следующие выводы:

ВЫВОДЫ

1. У пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия в криопротоколах схемы подготовки эндометрия эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона одинаково эффективны по частоте наступления беременности (28,6 % и 32,1 %, $p=0,7$) и частоте родов (23,8 % и 17,9 %, $p=0,8$).
2. Применение вспомогательного хетчинга на эмбриологическом этапе увеличивает результативность исходов криопротоколов по частоте наступления беременности на 20,3 % при сравнении с контрольной группой, 46,7 % и 26,4 % соответственно ($p=0,03$).

3. Применение среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты на эмбриологическом этапе увеличивает результативность исходов криопротоколов по частоте наступления беременности на 22,5 % при сравнении с контрольной группой (48,9 % и 26,4 % соответственно ($p=0,02$) и по частоте родов на 17,3 % (38,1 % и 20,8 % соответственно, $p=0,03$).
4. Неудачи применения вспомогательного хетчинга при переносе размороженного эмбриона у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием ассоциированы, прежде всего, с высоким уровнем фолликулостимулирующего гормона (ОШ=3,34; ДИ 1,14-9,78), тогда как отсутствие беременности при использовании среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты определяется преимущественно количеством неудачных программ вспомогательных репродуктивных технологий в анамнезе (ОШ=9,69; ДИ 2,55–16,8).
5. Применение разработанных прогностических моделей позволяет прогнозировать неэффективность применения вспомогательного хетчинга с точностью правильной классификации 80 %, а неудачи использования среды для переноса с высоким содержанием гиалуроновой кислоты – с точностью 76 %.

Практические рекомендации

1. Гормональные схемы подготовки эндометрия эстроген/гестагенами и эстроген/гестагенами в сочетании с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона демонстрируют достижение оптимальной толщины эндометрия в криопротоколе и равнозначную клиническую эффективность по частоте наступления беременности.
2. Для повышения эффективности переноса размороженного эмбриона целесообразно проведение вспомогательного хетчинга и/или применение среды с высоким содержанием гиалуроновой кислоты у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием.

3. Математические модели позволяют прогнозировать результаты применения эмбриологических методик (вспомогательный хетчинг или среда с высоким содержанием гиалуроновой кислоты) на основании данных анамнеза, уровня гормонов и параметров овариальной стимуляции для повышения результативности криопротоколов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

аГнРГ	– агонист гонадотропин-рилизинг гормона
АМГ	– антимюллеров гормон
антГнРГ	– антагонист гонадотропин-рилизинг гормона
ВРТ	– вспомогательные репродуктивные технологии
ВХ	– вспомогательный хетчинг
ГК	– гиалуроновая кислота
ГТ	– гормональная терапия
Е2	– эстрадиол
ИКСИ	– интраплазматическая инъекция сперматозоида
ИМТ	– индекс массы тела
ИППП	– инфекции, передающиеся половым путем
КАФ	– количество антральных фолликулов
ЛГ	– лютеинизирующий гормон
МЦ	– менструальный цикл
ПЭ	– перенос эмбриона
<i>P</i>	– прогестерон
РАРЧ	– Российская ассоциация репродукции человека
СВ	– самопроизвольный выкидыш
СГЯ	– синдром гиперстимуляции яичников
Т	– тестостерон
ТВП	– трансвагинальная пункция яичников
ТТГ	– тиреотропный гормон
УЗИ	– ультразвуковое исследование
ФСГ	– фолликулостимулирующий гормон
ХГЧ	– хорионический гонадотропин человека
ЧНБ	– частота наступления беременности
ЭКО	– экстракорпоральное оплодотворение

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аганезов С.С. и др. Рецептивность эндометрия у женщин с нарушениями репродуктивной функции // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66. – №. 3. – С. 135–142.
2. Аполихин О.И. Современная демографическая ситуация и проблемы улучшения репродуктивного здоровья населения России / О.И. Аполихин, Н.Г. Москалева, В.А. Комарова // Экспериментальная и клиническая урология. – 2015. – № 4. – С. 4–14.
3. Башмакова Н.В. Реальная клиническая практика лечения бесплодия в России: мнение 425 врачей-репродуктологов / Н.В. Башмакова, Е.Н. Новоселова, Т.А. Назаренко и др. // Акушерство, Гинекология и Репродукция. – 2023. – Т. 17. – №6. – С. 680–706.
4. Беляев А.М. ROC-анализ и логистическая регрессия в MedCalc. Учебное пособие. / А.М. Беляев, А.Е. Михнин, М.В. Рогачев – Санкт-Петербург: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2023. – 36 с.
5. Бош Э. Клинические рекомендации ESHRE: овариальная стимуляция в программах ЭКО и икси (перевод на русский под ред. проф. В.С. Корсака) / Э. Бош, С. Броер, Г. Гризингер // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. – 2021. – Т. 9. – № 2. – С. 34–47.
6. Боярский К.Ю. Роль антимюллера гормона (АМГ) в норме и при различных гинекологических заболеваниях / К.Ю. Боярский, С.Н. Гайдуков, Е.А. Машкова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2009. – Т. 18. – № 3. – С. 75–85.
7. Боярский К.Ю. Современный взгляд на проблему рецептивности и тонкого эндометрия в программах ВРТ (обзор литературы) / К.Ю. Боярский // Проблемы репродукции. – 2013. – Т. 19. – № 4. – С. 51–60.
8. Брусиловский И.А. Морфологическая оценка эмбрионов человека. «Коллеги, давайте договоримся!» / И.А. Брусиловский, И.В. Лившиц– 2018. – Т. 24. – № 2. – С. 63–68.
9. Витязева И.И. Исторические вехи развития методов вспомогательных репродуктивных технологий, основанных на оплодотворении in vitro / И.И. Витязева, И.И. Бармина, Г.А. Мельниченко // Вестник репродуктивного здоровья. – 2011. – С. 5–14.
10. Вороная В.В. Актуальность криопротоколов и оптимизации подготовки эндометрия у пациенток с многократными неудачными имплантациями / В.В. Вороная, А.Н. Рыбалка, А.Н. Сулима // Таврический медико-биологический вестник. – 2017. – Т. 20. – № 2. – С. 170–178.

11. Гафиатулин М.Р. Факторы, влияющие на менархе. Возможные последствия раннего и позднего начала менструации. Обзор литературы / М.Р. Гафиатулин, К.А. Коваленко // Современные проблемы подростковой медицины и репродуктивного здоровья подростков и молодежи. Кротинские чтения. – Санкт-Петербург, 2022. – С. 156–161.
12. Долгушина Н.В. Роль проназного хетчинга в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий / Н.В. Долгушина // Акушерство и гинекология. – 2018. – № 3. – С. 70–74.
13. Драпкина Ю.С. Оптимизация эмбриологического этапа в программах лечения бесплодия методами ВРТ с применением культуральных сред с гиалуроновой кислотой у супружеских пар с ПГТ-А / Ю.С. Драпкина, Е.В. Кулакова // Акушерство и гинекология. – 2021. – № 11. – С. 166–174.
14. Евстегнеев Г.А. Патогенез Синдрома Гиперстимуляции Яичников / Г.А. Евстегнеев // Наука и образование: история, современное состояние, перспективы сборник статей по итогам Международной научно-практической конференции. – Стерлитамак, 2023. – С. 13–15.
15. Захарченко Е.О. Влияние лазерной перфорации блестящей оболочки на жизнеспособность эмбрионов мыши *in vitro* / Е.О. Захарченко, А.Д. Залесский // БИОХИМИЯ. – 2015. – Т. 80. – № 6. – С. 911–919.
16. Ибрагимова Э.О. Роль вспомогательного хетчинга в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий: обзор литературы / Э.О. Ибрагимова, Н.В. Долгушина, А.Г. Сыркашева // Гинекология. – 2016. – Т. 18. – № 3. – С. 44–47.
17. Иванова О.В. и др. Оценка эффективности криоконсервации гамет и эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий // Морфологические ведомости. – 2019. – Т. 27. – №. 3. – С. 46–50.
18. Иванова О.В. и др. Показатели выживаемости и клинической эффективности витрифицированных бластоцист человека в практике эмбриологических лабораторий // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2020. – Т. 9. – №. 2. – С. 35–39.
19. Иванова О.В. Морфологическая оценка функциональной способности гамет и эмбрионов человека после криоконсервации // RU05CLSL05CBOOKS030205C26030030222. – 2020.
20. Клинические рекомендации: «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация». – 2018.

21. Клинические рекомендации: Женское бесплодие. – URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/641_1 (дата обращения: 04.03.2024). – Текст : электронный.
22. Клинические рекомендации. Синдром гиперстимуляции яичников. – URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/665_1 (дата обращения: 04.03.2024). – Текст : электронный.
23. Кодылева Т.А. и др. Морфологическая оценка ооцитов человека в клинической практике экстракорпорального оплодотворения (обзор литературы) //Проблемы репродукции. – 2017. – Т. 23. – №. 6. – С. 54–59.
24. Коломиец Е.В. Акушерско-гинекологический анамнез женщин с трубно-перитонеальным бесплодием //Неделя молодежной науки. – 2023. – С. 37–37.
25. Корсак В.С., Смирнова А.А., Шурыгина О.В. Регистр ВРТ Общероссийской общественной организации «Российская Ассоциация Репродукции Человека». Отчет за 2020 год //Проблемы репродукции. – 2022. – Т. 28. – №. 6. – С. 12–27.
26. Корсак В.С. Регистр ВРТ Общероссийской общественной организации «Российская Ассоциация Репродукции Человека». Отчет за 2020 год / В.С. Корсак, А.А. Смирнова, О.В. Шурыгина // Проблемы репродукции. – 2022. – Т. 28. – № 6. – С. 12–27.
27. Кравцова О.А. Соно-морфологические критерии готовности эндометрия к имплантации при проведении ЭКО / О.А. Кравцова – ФГБОУ ВО СГМУ МЗРФ, 2017. – 111 с.
28. Краснопольская К.В., Ершова И.Ю., Федоров А.А. Тонкий эндометрий //Лечение бесплодия у женщин с гипоплазией эндометрия. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2020. – Т. 112.
29. Краснощока О.Е. и др. Роль морфологической оценки ооцита и эмбриона при использовании ВРТ (обзор литературы) //Проблемы репродукции. – 2015. – Т. 21. – №. 1. – С. 54–58.
30. Лебедев Г.С. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000-2018 годы / Г.С. Лебедев, Н.А. Голубев, И.А. Шадеркин // Экспериментальная и клиническая урология. – 2019. – № 4. – С. 4–12.
31. Лёгоньякая А.Ю. Влияние среды, обогащённой гиалуроновой кислотой, на имплантацию эмбрионов при их криопереносе // Молодежь, наука, медицина. – 2020. – С. 109–110.

32. Михайлюкова А.С. Современные подходы к оценке качества ооцитов в программах экстракорпорального оплодотворения (обзор литературы) / А.С. Михайлюкова, Э.В. Вартанян, Ю.Э. Доброхотова // Проблемы репродукции. – 2021. – Т. 27. – № 4. – С. 127–134.
33. Новикова В.А. Специфика овариального резерва женщин с хроническим сальпингоофоритом / В.А. Новикова, Ф.Р. Аутлетова, А.А. Сороченко // Кубанский научный медицинский вестник. – 2018. – Т. 25. – № 6. – С. 119–126.
34. Оразов М. Р. и др. «Проблемный» эндометрий как фактор бесплодия: поиск путей преодоления продолжается //Трудный пациент. – 2020. – Т. 18. – №. 8-9. – С. 13–19.
35. Паскарь С.С. Возможности и перспективы применения прогностических моделей в лечении бесплодия (обзор литературы). / С.С. Паскарь, А.С. Калугина // Проблемы репродукции. – 2017. – Т. 23. – № 3. – С. 8–11.
36. Перминова С.Г. Современные подходы к использованию агонистов гонадотропин-рилизинг-гормона в программах ВРТ / С.Г. Перминова, Е.В. Митюрин, Т.С. Амян // Проблемы репродукции. – 2020. – Т. 24. – № 2. – С. 75–82.
37. Петренко В.М. Эмбриология человека // Международный журнал экспериментального образования. – 2009. – №. 4. – С. 35–37.
38. Петросян Я.А. Эффективность различных протоколов подготовки эндометрия к переносу размороженного эмбриона в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Я.А. Петросян // Гинекология. – 2020. – Т. 22. – № 2. – С. 17–21.
39. Попова О.О. и др. Эффективность применения среды с повышенным содержанием гиалуроновой кислоты для переноса эмбрионов человека//Материалы IV Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки фундаментальная основа медицины». – 2019. – С. 210–212.
40. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30 августа 2012 г. № 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» | Документы ленты ПРАЙМ: ГАРАНТ. – URL: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70218364/> (дата обращения: 02.05.2024). – Текст : электронный.

41. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 31.07.2020 N 803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» | ГАРАНТ. – URL: <https://base.garant.ru/74776088/> (дата обращения: 16.01.2025). – Текст : электронный.
42. Протопопова Н.В. Факторы риска и критерии прогнозирования синдрома гиперстимуляции яичников / Н.В. Протопопова, Е.Б. Дружинина, Ю.В. Мыльникова // Acta Biomedica Scientifica. – 2012. – № 3-1. – С. 65–70.
43. Радзинский В.Е. Акушерская агрессия, V. 2.0 / В.Е. Радзинский – Москва : «Медиабюро Статус презенс», 2017.
44. Радзинский В.Е. Рецептивность эндометрия пациенток с повторными неудачами имплантации / В.Е. Радзинский, Л.М. Михалёва , М.Р. Оразов // Гинекология. Доктор. Ру. – 2022. – Т. 21. – № №1. – С. 27–33.
45. Радзинский В.Е. Предикторы неудач ЭКО при имплантационной несостоятельности эндометрия / В.Е. Радзинский, М.Р. Оразов, Л.М. Михалева // Трудный пациент. – 2021. – Т. 19. – № 1. – С. 23–26.
46. Сакевич В.И. Репродуктивное здоровье населения и проблема абортов в России: новейшие тенденции / В.И. Сакевич, Б.П. Денисов // Социологические исследования. – 2019. – Репродуктивное здоровье населения и проблема абортов в России. – № 11. – С. 140–151.
47. Салов И.А. Особенности течения беременности при синдроме гиперстимуляции яичников / И.А. Салов, И.А. Аржаева, Д.А. Тяпкина // Лечащий Врач. – 2023. – № 12. – С. 31–38.
48. Серов В.Н., Сухих Г.Н., Савельева Г.М. Клинические рекомендации. Акушерство и гинекология/ В.Н. Серов, Г.Н. Сухих, Г.М. Савельева. – Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2019. – С. 1008.
49. Симонова О.В. Репродуктивное здоровье населения России //Мы продолжаем традиции российской статистики. – 2016. – С. 28–34.
50. Тлиашинова И.А., Мингазов Р.Н. Глобальные социальные вызовы в проблемах бесплодия//Менеджер здравоохранения. – 2022. – №. 3. – С. 49–59.
51. Шурыгина О.В. и др. Витрификация гамет и эмбрионов-эффективный инструмент повышения результативности программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) //Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №. 4. – С. 54–54.

52. Шурыгина О.В. и др. Новые методологические подходы в культивировании и молекулярной диагностике эмбрионов человека //Вестник новых медицинских технологий. – 2018. – Т. 25. – №. 4. – С. 222–226.
53. Шурыгина О.В. и др. Ретроспективный анализ 563 эмбриологических протоколов криоциклов: влияние компетенции ооцитов и генетического скрининга эмбрионов человека на результаты витрификации //Морфологические ведомости. – 2020. – Т. 28. – №. 1. – С. 51–56.
54. Яковлев П.П. Овариальная стимуляция и качество ооцитов / П.П. Яковлев, И.Ю. Коган // Проблемы репродукции. – 2022. – Т. 28. – № 3. – С. 86–95.
55. Al-Azawi T. et al. Cryopreservation of human oocytes, zygotes, embryos and blastocysts: a comparison study between slow freezing and ultra rapid (vitrification) methods //Middle East Fertility Society Journal. – 2013. – Т. 18. – №. 4. – P. 223–232.
56. Al-Nuaim L.A., Jenkins J.M. Assisted hatching in assisted reproduction //BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology. – 2002. – Т. 109. – №. 8. – P. 856–862.
57. Artar İ. et al. Evaluation of Effectiveness of Laser Assisted Hatching Pregnancy Rates on Fresh IVF/ICSI Cycles //Gazi Medical Journal. – 2020. – Т. 31. – №. 4. – P. 537–541.
58. Babayan A. et al. Hyaluronan in follicular fluid and embryo implantation following in vitro fertilization and embryo transfer //Journal of assisted reproduction and genetics. – 2008. – Т. 25. – P. 473–476.
59. Bergenheim S.J. et al. Immediate versus postponed frozen embryo transfer after IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis //Human reproduction update. – 2021. – Т. 27. – №. 4. – P. 623–642.
60. Berntsen S. et al. The health of children conceived by ART: ‘the chicken or the egg?’ //Human reproduction update. – 2019. – Т. 25. – №. 2. – P. 137–158.
61. Bhattacharya S., Kamath M.S. Reducing multiple births in assisted reproduction technology //Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. – 2014. – Т. 28. – №. 2. – P. 191–199.
62. Bhoi N.R. et al. Effect of hyaluronic acid-containing transfer media (EmbryoGlue®) on the live birth rate in frozen thawed embryo transfer cycles //Cureus. – 2024. – Т. 16. – №. 1. – P. 1–10.
63. Blockeel C. et al. A fresh look at the freeze-all protocol: a SWOT analysis //Human reproduction. – 2016. – Т. 31. – №. 3. – P. 491–497.

64. Bontekoe S. et al. Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies: Summary of a Cochrane review //Fertility and Sterility. – 2015. – T. 103. – №. 6. – P. 1416–1417.
65. Bosch E., De Vos M., Humaidan P. The future of cryopreservation in assisted reproductive technologies //Frontiers in endocrinology. – 2020. – T. 11. – P. 67–70.
66. Bosdou J.K. et al. Higher probability of live-birth in high, but not normal, responders after first frozen-embryo transfer in a freeze-only cycle strategy compared to fresh-embryo transfer: a meta-analysis //Human Reproduction. – 2019. – T. 34. – №. 3. – P. 491–505.
67. Bourdon M. et al. The freeze-all strategy after IVF: which indications? //Reproductive BioMedicine Online. – 2021. – T. 42. – №. 3. – P. 529–545.
68. Brogliato C. et al. Expansion and herniation: evaluation of the best pregnancy rate predictor after quarter laser assisted hatching in frozen blastocyst transfers //JBRA Assisted Reproduction. – 2020. – T. 24. – №. 2. – P. 170–180.
69. Brown J., Daya S., Matson P. Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2016. – №. 12. – P. 1–48.
70. Bruno C. et al. Survey of 243 ART patients having made a final disposition decision about their surplus cryopreserved embryos: the crucial role of symbolic embryo representation //Human Reproduction. – 2016. – T. 31. – №. 7. – P. 1508–1514.
71. Burks H., Paulson R. Cryopreserved embryo transfer: endometrial preparation and timing //Seminars in Reproductive Medicine. – Thieme Medical Publishers, 2015. – T. 33. – №. 02. – P. 145–152.
72. Carson S.A., Kallen A.N. Diagnosis and management of infertility: a review //Jama. – 2021. – T. 326. – №. 1. – P. 65–76.
73. Casciani V. et al. Oocyte and embryo cryopreservation in assisted reproductive technology: past achievements and current challenges //Fertility and sterility. – 2023. – T. 120. – №. 3. – P. 506–520.
74. Casper R.F., Yanushpolsky E.H. Optimal endometrial preparation for frozen embryo transfer cycles: window of implantation and progesterone support //Fertility and sterility. – 2016. – T. 105. – №. 4. – P. 867–872.
75. Cédric-Durnerin I. et al. Serum progesterone concentration and live birth rate in frozen–thawed embryo transfers with hormonally prepared endometrium //Reproductive biomedicine online. – 2019. – T. 38. – №. 3. – P. 472–480.

76. Chatzimeletiou K. Optimizing embryo culture for recurrent implantation failure // *Recurrent Implantation Failure*. – CRC Press. – 2019. – P. 107–112.
77. Check J.H. et al. « Embryo glue» does not seem to improve chances of subsequent pregnancy in refractory in vitro fertilization cases // *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*. – 2012. – T. 39. – №. 1. – P. 11–12.
78. Chen H. et al. Blastocyst-stage versus cleavage-stage embryo transfer in the first frozen cycles of OHSS-risk patients who deferred from fresh embryo transfer // *Gynecological Endocrinology*. – 2015. – T. 31. – №. 9. – P. 698–701.
79. Child T.J. et al. A randomised controlled blinded trial assessing the effectiveness of Embryogluе as an embryo transfer medium in ivf cycles // *Fertility and Sterility*. – 2021. – T. 116. – №. 3. – P. 238.e1–238.e11.
80. Clain E., Devine K. Endometrial receptivity, to test or not to test: the evidence on contemporary assays // *F&S Reviews*. – 2023. – T. 4. – №. 1. – P. 50–65.
81. Cobo A. et al. Embryo long-term storage does not affect ART outcome: analysis of 58001 vitrified blastocysts over an 11-year period // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2024. – P. S0002-9378 (24) 00469.
82. Das M., Holzer H.E. G. Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors // *Fertility and sterility*. – 2012. – T. 97. – №. 5. – P. 1021–1027.
83. Davar R., Dashti S., Omidi M. Endometrial preparation using gonadotropin-releasing hormone agonist prior to frozen-thawed embryo transfer in women with repeated implantation failure: An RCT // *International Journal of Reproductive BioMedicine*. – 2020. – T. 18. – №. 5. – P. 319–326.
84. Davidson L.M. et al. Laser technology in the ART laboratory: a narrative review // *Reproductive biomedicine online*. – 2019. – T. 38. – №. 5. – P. 725–739.
85. De Geyter C.H. et al. 20 years of the European IVF-monitoring Consortium registry: what have we learned? A comparison with registries from two other regions // *Human reproduction*. – 2020. – T. 35. – №. 12. – P. 2832–2849.
86. Edwards, R.G. Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? / R. G. Edwards // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2006. – T. 13. – Human implantation. – № 6. – P. 887–904.
87. Endo Y. et al. Laser-assisted hatching on clinical and neonatal outcomes in patients undergoing single vitrified Blastocyst transfer: A propensity score-matched study // *Reproductive Medicine and Biology*. – 2021. – T. 20. – №. 2. – P. 182–189.

88. Evans J. et al. Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence //Human reproduction update. – 2014. – T. 20. – №. 6. – P. 808–821.
89. Fan L. et al. Association between fresh embryo transfers and frozen–thawed embryo transfers regarding live birth rates among women undergoing long gonadotropin-releasing hormone antagonist protocols //Frontiers in cell and developmental biology. – 2022. – T. 10. – P. 1–10.
90. Fox C. et al. Local and systemic factors and implantation: what is the evidence? //Fertility and sterility. – 2016. – T. 105. – №. 4. – P. 873–884.
91. Gardner D.K., Rodriegez-Martinez H., Lane M. Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer //Human reproduction. – 1999. – T. 14. – №. 10. – P. 2575–2580.
92. Ge H.S. et al. Impact of assisted hatching on fresh and frozen–thawed embryo transfer cycles: a prospective, randomized study //Reproductive biomedicine online. – 2008. – T. 16. – №. 4. – P. 589–596.
93. Ge L. et al. Effect of different treatment protocols on in vitro fertilisation/intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) outcomes in adenomyosis women: a systematic review and meta-analysis //BMJ open. – 2024. – T. 14. – №. 7. – P. e077025.
94. Gelbaya T.A. et al. Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regulated hormonally controlled cycles: a retrospective study //Fertility and Sterility. – 2006. – T. 85. – №. 3. – C. 603–609.
95. Geng L. et al. Laser-assisted hatching zona thinning does not improve the pregnancy outcomes of poor-quality blastocysts in frozen-thawed embryo transfer cycle: a retrospective cohort study //Lasers in Medical Science. – 2022. – P. 1–10.
96. Ghobara T., Gelbaya T.A., Ayeleke R.O. Cycle regimens for frozen-thawed embryo transfer //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2017. – №. 7. – P. 1–81.
97. Glujovsky D. et al. Cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in assisted reproductive technology //Cochrane database of systematic reviews. – 2022. – №.5. – P. 1–126.
98. Glujovsky D. et al. Endometrial preparation for women undergoing embryo transfer with frozen embryos or embryos derived from donor oocytes //Cochrane database of systematic reviews. – 2020. – №. 10. – P. 1–111.

99. Groenewoud E.R., Cohlen B.J., Macklon N.S. Programming the endometrium for deferred transfer of cryopreserved embryos: hormone replacement versus modified natural cycles //Fertility and sterility. – 2018. – T. 109. – №. 5. – P. 768–774.
100. Groenewoud E.R. et al. What is the optimal means of preparing the endometrium in frozen–thawed embryo transfer cycles? A systematic review and meta-analysis //Human reproduction update. – 2013. – T. 19. – №. 5. – P. 458–470.
101. Hambiliki F. et al. Hyaluronan-enriched transfer medium in cleavage-stage frozen-thawed embryo transfers increases implantation rate without improvement of delivery rate //Fertility and sterility. – 2010. – T. 94. – №. 5. – P. 1669–1673.
102. Hammadeh M.E., Fischer-Hammadeh C., Ali K. R. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art //Journal of assisted reproduction and genetics. – 2011. – T. 28. – P. 119–128.
103. Haouzi D. et al. Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects //Biology of Reproduction. – 2010. – T. 82. – №. 4. – P. 679–686.
104. Hazlett W.D. et al. Impact of EmbryoGlue as the embryo transfer medium //Fertility and sterility. – 2008. – T. 90. – №. 1. – P. 214–216.
105. Hebisha S.A., Adel H.M. GnRh Agonist Treatment Improves Implantation and Pregnancy Rates of Frozen–Thawed Embryos Transfer //The Journal of Obstetrics and Gynecology of India. – 2017. – T. 67. – P. 133–136.
106. Heymann D. et al. Hyaluronic acid in embryo transfer media for assisted reproductive technologies //The Cochrane database of systematic reviews. – 2020. – T. 9. – №. 9. – P. CD007421.
107. Heymann D. et al. The effect of hyaluronic acid in embryo transfer media in donor oocyte cycles and autologous oocyte cycles: a systematic review and meta-analysis //Human Reproduction. – 2022. – T. 37. – №. 7. – P. 1451–1469.
108. Hilali C. et al. Assessing fertility preservation strategies: A scoping review //Asian Pacific Journal of Reproduction. – 2024. – T. 13. – №. 6. – P. 241–250.
109. Hill M.J., Miller K.A., Frattarelli J.L. A GnRH agonist and exogenous hormone stimulation protocol has a higher live-birth rate than a natural endogenous hormone protocol for frozen-thawed blastocyst-stage embryo transfer cycles: an analysis of 1391 cycles //Fertility and sterility. – 2010. – T. 93. – №. 2. – P. 416–422.
110. Holden E.C. et al. Improved outcomes after blastocyst-stage frozen-thawed embryo transfers compared with cleavage stage: a Society for Assisted

Reproductive Technologies Clinical Outcomes Reporting System study //Fertility and sterility. – 2018. – T. 110. – №. 1. – P. 89–94.

111. Hu K. L. et al. The association between embryo storage time and treatment success in women undergoing freeze-all embryo transfer //Fertility and Sterility. – 2022. – T. 118. – №. 3. – P. 513–521.

112. Jin Z. et al. Live birth rates after natural cycle versus hormone replacement therapy for single euploid blastocyst transfers: a retrospective cohort study //Reproductive BioMedicine Online. – 2021. – T. 43. – №. 6. – P. 1002–1010.

113. Kang J. et al. Comparison of the clinical outcome of frozen-thawed embryo transfer with and without pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist //Obstetrics & Gynecology Science. – 2018. – T. 61. – №. 4. – P. 489–496.

114. Kasius A. et al. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis //Human reproduction update. – 2014. – T. 20. – №. 4. – P. 530–541.

115. Lacey L. et al. Assisted hatching on assisted conception (in vitro fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)) //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2021. – №. 3. – P. 1–123.

116. Lee N. et al. Comparing endometrial preparation methods in frozen embryo transfers—Does a previous live birth make a difference? //European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2023. – T. 284. – P. 52–57.

117. Leeton J. The early history of IVF in Australia and its contribution to the world (1970–1990) //Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology. – 2004. – T. 44. – №. 6. – P. 495–501.

118. Li L. et al. GnRH agonist treatment regulates IL-6 and IL-11 expression in endometrial stromal cells for patients with HRT regiment in frozen embryo transfer cycles //Reproductive Biology. – 2022. – T. 22. – №. 2. – P. 100–108.

119. Liang M.Y. et al. Long-term embryo vitrification is associated with reduced success rates in women undergoing frozen embryo transfer following a failed fresh cycle //European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2024. – T. 296. – P. 244–249.

120. Liao S.J. et al. Analysis of endometrial thickness patterns and pregnancy outcomes considering 12,991 fresh IVF cycles //BMC Medical Informatics and Decision Making. – 2021. – T. 21. – №. 1. – P. 176–189.

121. Liao Z. et al. The effect of endometrial thickness on pregnancy, maternal, and perinatal outcomes of women in fresh cycles after IVF/ICSI: a systematic

review and meta-analysis //Frontiers in endocrinology. – 2022. – T. 12. – P. 814648.

122. Liu K.E. et al. The impact of a thin endometrial lining on fresh and frozen-thaw IVF outcomes: an analysis of over 40 000 embryo transfers //Human Reproduction. – 2018. – T. 33. – №. 10. – P. 1883–1888.

123. Mackens S. et al. Frozen embryo transfer: a review on the optimal endometrial preparation and timing //Human Reproduction. – 2017. – T. 32. – №. 11. – P. 2234–2242.

124. Maheshwari A. et al. Is frozen embryo transfer better for mothers and babies? Can cumulative meta-analysis provide a definitive answer? //Human reproduction update. – 2018. – T. 24. – №. 1. – P. 35–58.

125. Matorras Weinig J.R. et al. Meta-analysis of the embryo freezing transfer interval //Reproductive Medicine and Biology. – 2021. – Vol. 20. – №2. – P. 144–158.

126. Mizrachi Y. et al. Ovarian stimulation for freeze-all IVF cycles: a systematic review //Human Reproduction Update. – 2020. – T. 26. – №. 1. – P. 119–136.

127. Mounce G. et al. Randomized, controlled pilot trial of natural versus hormone replacement therapy cycles in frozen embryo replacement in vitro fertilization //Fertility and sterility. – 2015. – T. 104. – №. 4. – P. 915–920. e1.

128. Mourad S., Brown J., Farquhar C. Interventions for the prevention of OHSS in ART cycles: an overview of Cochrane reviews //The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2017. – T. 1. – P. 1–43.

129. Naimi Z.M.S. et al. Efficiency of assisted reproductive technology programs in stimulated-cycle embryo transfer versus cryopreserved-thawed embryo transfer //Obstetrics and Gynecology. – 2016. – T. 6. – P. 11–17.

130. Ng C. et al. Assisted hatching of vitrified-warmed blastocysts prior to embryo transfer does not improve pregnancy outcomes //Journal of Ovarian Research. – 2020. – T. 13. – P. 1–8.

131. Ng S. W. et al. Endometrial decidualization: the primary driver of pregnancy health //International journal of molecular sciences. – 2020. – T. 21. – №. 11. – P. 4092.

132. Nishihara T., Morimoto Y. Evaluation of transfer media containing different concentrations of hyaluronan for human in vitro fertilization //Reproductive medicine and biology. – 2017. – T. 16. – №. 4. – P. 349–353.

133. Ozgur K. et al. Perinatal outcomes after fresh versus vitrified-warmed blastocyst transfer: retrospective analysis //Fertility and sterility. – 2015. – T. 104. – №. 4. – P. 899–907. e3.
134. Pai H. D. et al. Oocyte cryopreservation-current scenario and future perspectives: a narrative review //Journal of Human Reproductive Sciences. – 2021. – T. 14. – №. 4. – P. 340–349.
135. Pan Y. et al. Hormone replacement versus natural cycle protocols of endometrial preparation for frozen embryo transfer //Frontiers in Endocrinology. – 2020. – T. 11. – P. 546532.
136. Pavlović V. D. et al. Influence of EmbryoGlue® transfer medium on implantation of human embryos //Scripta Medica. – 2021. – T. 52. – №. 2. – P. 119–123.
137. Pellicer N., Pellicer A. Pathogenesis and management in OHSS //Handbook of Current and Novel Protocols for the Treatment of Infertility. – Academic Press, 2024. – P. 197–209.
138. Racca A. et al. Impact of late-follicular phase elevated serum progesterone on cumulative live birth rates: is there a deleterious effect on embryo quality? //Human Reproduction. – 2018. – T. 33. – №. 5. – P. 860–868.
139. Roque M. et al. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes //Human reproduction update. – 2019. – T. 25. – №. 1. – P. 2–14.
140. Safari S. et al. Routine use of EmbryoGlue® as embryo transfer medium does not improve the ART outcomes //Archives of gynecology and obstetrics. – 2015. – T. 291. – P. 433–437.
141. Sahin G. et al. Live birth after frozen–thawed embryo transfer: which endometrial preparation protocol is better? //Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction. – 2020. – T. 49. – №. 8. – P. 101782.
142. Saket Z. et al. Cumulative live birth rate after IVF: trend over time and the impact of blastocyst culture and vitrification //Human Reproduction Open. – 2021. – T. 2021. – №. 3. – P. 1–9.
143. Salamonsen L. A., Shuster S., Stern R. Distribution of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle: implications for implantation and menstruation //Cell and tissue research. – 2001. – T. 306. – P. 335–340.
144. Sehring, J. Human implantation: The complex interplay between endometrial receptivity, inflammation, and the microbiome / J. Sehring, A. Beltsos, R. Jeelani // Placenta. – 2022. – T. 117. – Human implantation. – C. 179–186.

145. Seikkula J. et al. Mid-luteal phase gonadotropin-releasing hormone agonist support in frozen-thawed embryo transfers during artificial cycles: A prospective interventional pilot study //Journal of gynecology obstetrics and human reproduction. – 2018. – T. 47. – №. 8. – P. 391–395.
146. Sha T. et al. Pregnancy-related complications and perinatal outcomes resulting from transfer of cryopreserved versus fresh embryos in vitro fertilization: a meta-analysis //Fertility and sterility. – 2018. – T. 109. – №. 2. – P. 330–342. e9.
147. Shapiro B. S. et al. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen–thawed embryo transfer in normal responders //Fertility and sterility. – 2011. – T. 96. – №. 2. – P. 344–348.
148. Sharma S. et al. Freeze-all cycles for normal responders: Is this way forward? //MGM Journal of Medical Sciences. – 2024. – T. 11. – №. 4. – P. 708–713.
149. Singh N. et al. Role of Embryo Glue as a transfer medium in the outcome of fresh non-donor in-vitro fertilization cycles //Journal of Human Reproductive Sciences. – 2015. – T. 8. – №. 4. – P. 214–217.
150. Smeenk J. et al. ART in Europe, 2019: results generated from European registries by ESHRE //Human Reproduction. – 2023. – T. 38. – №. 12. – P. 2321–2338.
151. Song J., Xiang S., Sun Z. Frozen embryo transfer at the cleavage stage can be performed within the first menstrual cycle following the freeze-all strategy without adversely affecting the live birth rate: a STROBE-compliant retrospective study //Medicine. – 2019. – T. 98. – №. 38. – P. e17329.
152. Tavukcuoglu S. et al. Is vitrification standard method of cryopreservation //Middle East Fertility Society Journal. – 2012. – T. 17. – №. 3. – P. 152–156.
153. Urman B. et al. Effect of hyaluronan-enriched transfer medium on implantation and pregnancy rates after day 3 and day 5 embryo transfers: a prospective randomized study //Fertility and sterility. – 2008. – T. 90. – №. 3. – P. 604–612.
154. Valdes C. T., Schutt A., Simon C. Implantation failure of endometrial origin: it is not pathology, but our failure to synchronize the developing embryo with a receptive endometrium //Fertility and Sterility. – 2017. – T. 108. – №. 1. – P. 15–18.
155. Volovsky M. et al. Do serum progesterone levels on day of embryo transfer influence pregnancy outcomes in artificial frozen-thaw cycles? //Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2020. – T. 37. – C. 1129–1135.

156. Von Versen-Höynck F., Griesinger G. Should any use of artificial cycle regimen for frozen-thawed embryo transfer in women capable of ovulation be abandoned: yes, but what's next for FET cycle practice and research? //Human Reproduction. – 2022. – T. 37. – №. 8. – P. 1697–1703.
157. Wang Y. et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist combined with hormone replacement therapy protocol improves the live birth rate in frozen-thawed embryo transfer cycles for patients without endometriosis //Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology. – 2023. – T. 50. – №. 8. – P. 171–177.
158. Wei D. et al. Frozen versus fresh single blastocyst transfer in ovulatory women: a multicentre, randomised controlled trial //The lancet. – 2019. – T. 393. – №. 10178. – P. 1310–1318.
159. Wong K. M. et al. Transfer of fresh or frozen embryos: a randomised controlled trial //Human reproduction. – 2021. – T. 36. – №. 4. – P. 998–1006.
160. Wu F. et al. Influence of EmbryoGlue on the implantation of embryo and pregnancy outcome in vitro fertilization-embryo transfer //Zhonghua fu chan ke za zhi. – 2012. – T. 47. – №. 2. – P. 121–124.
161. Wyns C. et al. ART in Europe, 2017: results generated from European registries by ESHRE //Human reproduction open. – 2021. – T. 2021. – №. 3. – P. hoab026.
162. Wyns C. et al. ART in Europe, 2018: results generated from European registries by ESHRE //Human reproduction open. – 2022. – T. 2022. – №. 3. – P. hoac022.
163. Xia L. et al. Hormonal replacement treatment for frozen-thawed embryo transfer with or without GnRH agonist pretreatment: a retrospective cohort study stratified by times of embryo implantation failures //Frontiers in Endocrinology. – 2022. – T. 13. – P. 803471.
164. Xie D. et al. Artificial cycle with or without a depot gonadotropin-releasing hormone agonist for frozen-thawed embryo transfer: an assessment of infertility type that is most suitable //Current medical science. – 2018. – T. 38. – P. 626–631.
165. Xu B. et al. Pretreatment with a long-acting GnRH agonist for frozen-thawed embryo transfer cycles: how to improve live birth? //Journal of Ovarian Research. – 2023. – T. 16. – №. 1. – P. 197–207.
166. Yaegashi N. et al. Menstrual cycle dependent expression of CD44 in normal human endometrium //Human pathology. – 1995. – T. 26. – №. 8. – P. 862–865.

167. Yan Y. et al. Pregnancy and neonatal outcomes after long-term vitrification of blastocysts among 6,900 patients after their last live birth //Fertility and Sterility. – 2023. – T. 119. – №. 1. – P. 36–44.
168. Yang J. et al. Retrospective analysis of the endometrial preparation protocols for frozen-thawed embryo transfer cycles in women with endometriosis //Reproductive Biology and Endocrinology. – 2023. – T. 21. – №. 1. – P. 83–85.
169. Yang M. et al. Which is better for mothers and babies: fresh or frozen-thawed blastocyst transfer? //BMC Pregnancy and Childbirth. – 2020. – T. 20. – P. 1–20.
170. Yin R. et al. The effects of unexpected follicular growth and ovulation in artificial cycles: a retrospective cohort study of frozen, single-blastocyst transfer //Fertility and Sterility. – 2023. – T. 119. – №. 6. – P. 985–993.
171. Yu Y. et al. Pregnancy outcomes of 4 endometrial preparation protocols in adenomyosis patients with thin endometrium during frozen embryo transfer: a retrospective cohort study //Global Reproductive Health. – 2024. – T. 9. – №. 1. – P. e0079.
172. Yung S. S. F. et al. Hyaluronic acid–enriched transfer medium for frozen embryo transfer: a randomized, double-blind, controlled trial //Fertility and Sterility. – 2021. – T. 116. – №. 4. – P. 1001–1009.
173. Zaat T. et al. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction //The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2021. – T. 2. – P. CD011184.
174. Zeng M. F., Su S. Q., Li L. M. The effect of laser-assisted hatching on pregnancy outcomes of cryopreserved-thawed embryo transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials //Lasers in medical science. – 2018. – T. 33. – P. 655–666.
175. Zhang T. et al. Endometrial thickness as a predictor of the reproductive outcomes in fresh and frozen embryo transfer cycles: A retrospective cohort study of 1512 IVF cycles with morphologically good-quality blastocyst //Medicine. – 2018. – T. 97. – №. 4. – P. e9689.
176. Zhang W. Y. et al. The impact of estradiol supplementation on endometrial thickness and intrauterine insemination outcomes //Reproductive Biology. – 2024. – T. 24. – №. 2. – P. 100886.
177. Zhang Y. et al. Preparation of the endometrium for frozen embryo transfer: an update on clinical practices //Reproductive Biology and Endocrinology. – 2023. – T. 21. – №. 1. – P. 52–68.

178. Elevate Transfer Success with “EmbryoGlue”. – URL: <https://www.vitrolife.com/products/embryo-transfer/embryoglue/> (date accessed: 06.06.2024). – Text : electronic.