

Сравнительный анализ эффективности переноса эмбрионов в цикле индукции суперовуляции и криоцикле у пациенток разных возрастных групп

С.А. ЯКОВЕНКО², Т.Г. ХРЯПЕНКОВА¹, К.В. КИРИЕНКО¹, М.А. ХАРИТОНОВА^{1*}, М.Н. ТРОШИНА¹, А.Г. МИРОНОВА¹, Е.С. КАЛИНИНА¹, А.И. БОЛТ¹, И.Ю. ЕРМИЛОВА¹, А.А. БИРЮКОВ¹, А.А. НАУМОВА¹, А.А. КЛЕПУКОВ¹, Е.М. САВИНА¹, Е.В. УВАРОВА¹, Е.Ю. СИМОНЕНКО², В.А. ТВЕРДИСЛОВ²

¹Клиника репродукции человека Алтравита ООО «ЭКО центр», Москва, Россия; ² Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Цель исследования — сравнить эффективность программ ВРТ у пациенток разных возрастных групп при переносе эмбрионов в цикле ИСО и криоконсервированных эмбрионов в криоцикле.

Материал и методы. Проведен ретроспективный анализ 4832 программ ВРТ, в ходе которого оценивались частота наступления беременности, частота прерывания беременности до 12 нед и частота прогрессирующей беременности. Данные были исследованы у пациентов следующих возрастных групп: 20—34 года, 35—39 лет, 40—47 лет.

Результаты. Показано, что частота наступления клинической беременности была выше при переносе эмбриона в криоциклах, чем в циклах ИСО во всех возрастных группах и составила 42,2 и 34,6% — у женщин 20—34 года, 32,3 и 27,9% — у женщин 35—39 лет, 20,3 и 15,8% — у женщин 40—47 лет. Разница по этому показателю в криоцикле и цикле ИСО составила от 4,4 до 7,6% в зависимости от возрастной группы, в пользу криоцикла. Однако частота прерывания беременности до 12 нед в группе пациенток 20—34 года при переносе в криоцикле была значительно выше, чем при проведении ПЭ в цикле ИСО и составила 32,2 и 20,9% соответственно. При оценке частоты прогрессирующих беременностей было показано, что в группе пациенток 20—34 года данный показатель в цикле ИСО был значительно выше, чем в криоцикле, и составил 79,1% — в цикле ИСО и 67,7% — в криоцикле.

Выводы. Несмотря на более высокую частоту наступления клинической беременности, женщины до 35 лет имеют повышенный риск потери беременности до 12 нед после переноса эмбриона в криоцикле по сравнению с циклом ИСО, поэтому при отсутствии противопоказаний у пациенток данной возрастной группы более предпочтительно делать ПЭ в цикле ИСО. Отсутствие различий в частоте прогрессирующей беременности после переноса эмбриона в криоцикле и цикле ИСО в группе пациенток 35—39 лет позволяет лечащему врачу выбирать между ПЭ в цикле ИСО и криопереносом в зависимости от клинической ситуации.

Ключевые слова: ЭКО, криоконсервированный эмбрион, клиническая беременность, прогрессирующая клиническая беременность.

Comparative analysis of effectiveness of IVF cycles with fresh and frozen embryo transfer in patients of different age

S.A. YAKOVENKO, T.G. KHRYAPENKOVA, K.V. KIRIENKO, M.A. KHARITONOVA, M.N. TROSHINA, A.G. MIRONOVA, E.S. KALININA, A.I. BOLT, I.YU. ERMILOVA, A.A. BIRYUKOV, A.A. NAUMOVA, A.A. KLEPUKOV, E.M. SAVINA, E.V. UVAROVA, E.YU. SIMONENKO, V.A. TVERDISLOV

¹LLC «ECO center» (AltraVita IVF clinic); ²Faculty of Physics, M.V. Lomosoov Moscow State University, Moscow, Russia

Objective. To compare clinical pregnancy and early miscarriage rates following fresh embryo transfer and frozen embryo transfer among different age groups.

Material and methods. Total of 4832 non-donor ICSI cycles with single ET of day 5 blastocyst or day 5—6 of vitrified-warmed blastocyst was performed. The following clinical outcomes were compared: clinical pregnancy (presence of a gestational sac(s)) rate per ET and early miscarriage rate (a fetal loss before the 12th week) per clinical pregnancy. All cases were divided into 3 age groups: (20—34); (35—39); (40—47).

Results. Clinical pregnancy rates per ET in age group <35 years for cryo and fresh cycle were 42.2 and 34.6%, respectively ($p < 0.001$). Miscarriage rates were 32.3 and 20.9%, respectively ($p < 0.01$). Clinical pregnancy rates per ET in age group 35—39 years for cryo and fresh cycle were 32.3 and 27.9%, respectively ($p < 0.004$). Miscarriage rates were 41 and 40%, respectively ($p > 0.05$). Clinical pregnancy rates per ET in age group >39 years for cryo and fresh cycle were 20.3 and 15.8%, respectively ($p < 0.01$). Miscarriage rates were (57.4 and 63.2%, $p > 0.05$).

Conclusion. Despite higher clinical pregnancy rate, women <35 undergoing frozen embryo transfer are at increased risk of early pregnancy loss compared with those undergoing fresh embryo transfer so fresh embryo transfer results in better outcome for women of this age group. No difference in ongoing pregnancy rates following fresh ET and FET among women aged 35—39 was observed.

Keywords: IVF, cryopreserved embryo, clinical pregnancy, ongoing clinical pregnancy.

IMSI Hoffman modulation — внутрицитоплазматическая инъекция сперматозоида, морфологически отобранного с использованием системы Хоффмановского модуляционного контраста.

Использование агонистов и антагонистов (ант) гонадотропин-рилизинг-гормонов (ГнРГ), а также экзогенных гонадотропинов позволяет получать большее количество яйцеклеток, а вследствие этого и эмбрионов в циклах индукции суперовуляции (ИСО) по сравнению с естественным циклом. Использование подобных схем ИСО способствует уменьшению частоты отмененных циклов в связи с преждевременным пиком ЛГ, что позволило значительно увеличить частоту наступления беременности (ЧНБ). Однако существует комплекс недостатков стимулированных циклов:

- нарушение синхронизации «окна имплантации» и времени переноса эмбриона (ПЭ) вследствие преждевременного созревания эндометрия в стимулированных циклах ИСО; неравномерная glandularная и стромальная дифференциация в середине лютеиновой фазы [1];

- изменение экспрессии рецепторов половых гормонов в эндометрии и субоптимальное развитие эндометрия [2—5];

- изменение параметров кровотока в спиральных и конечных артериях [6], изменение гемодинамики в маточных и яичниковых артериях [7];

- изменение экспрессии интегринов в эндометрии [8];

- влияние контролируемой гиперстимуляции на развитие беременности в ранние сроки [9].

Условия для имплантации эмбриона в нестимулированных циклах, вероятно, более благоприятны по сравнению со стимулированными циклами ИСО. Возможность приблизить гормональный фон женщины и состояние эндометрия к состояниям, характерным для естественного цикла, дает технология переноса криоконсервированных эмбрионов. Преимуществом данной технологии также является возможность иметь более одной попытки ПЭ после цикла ИСО, тем самым снижая дозу используемых экзогенных гонадотропинов и повышая кумулятивную ЧНБ [10, 11].

Однако имеется ограниченное количество данных относительно сравнения эффективности ПЭ в цикле ИСО и криоцикле у пациенток разного возраста.

Цель настоящего исследования — оценка частоты наступления и прерывания беременности у пациенток разных возрастных групп при ПЭ в цикле ИСО и переносе размороженных эмбрионов в криоцикле.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование основано на материале клиники репродукции человека «Альтравита» с января 2007 г. по октябрь 2014 г. Проведен ретроспективный ана-

лиз 4832 программ ВРТ (с использованием ICSI/IMSI Hoffman modulation технологии, без использования ооцитов доноров), в которых осуществляли перенос одного эмбриона 5-го дня развития в цикле ИСО или размороженного эмбриона 5—6-го дня развития в криоцикле.

Оценивались следующие параметры: частота наступления клинической беременности, частота прерывания беременности до 12 нед и частота прогрессирующей клинической беременности.

Пациентки были разделены на группы в соответствии с возрастом (20—35 лет — 2799 пациенток, 35—40 лет — 1363, 40—47 лет — 670) и типом ПЭ: в цикле ИСО или в криоцикле.

Индукция суперовуляции

ИСО продили по «короткому» протоколу с антагонистом ГнРГ со 2—3-го дня менструального цикла с использованием рекомбинантных и/или мочевых гонадотропинов в суточной дозе 150—300 МЕ. Стартовую дозу определяли на основании данных анамнеза (возраст, состояние менструальной функции) и показателей овариального резерва (количество антральных фолликулов при ультразвуковом исследовании, уровень антимюллерова гормона). Овуляторную дозу хорионического гонадотропина человека (10 000 МЕ) вводили при наличии трех и более фолликулов диаметром ≥ 17 мм.

Оплодотворение, культивирование эмбрионов, криоконсервация эмбрионов

После проведения процедуры ICSI или IMSI Hoffman modulation (внутрицитоплазматическая инъекция сперматозоида, морфологически отобранного с использованием системы Хоффмановского модуляционного контраста) [12] ооциты помещали в лунку, содержащую 500 мкл среды под слоем минерального масла. Перед оценкой результатов оплодотворения (18 ч культивирования после ICSI/IMSI Hoffman modulation) зиготы переносили в 30 мкл капли в чашки Петри со средой под слоем минерального масла. Культивирование осуществляли при 37 °C в CO₂-инкубаторе с 7,3% CO₂. Замена среды производилась через 72 ч после оплодотворения. Качество бластоцист оценивали на 5—6-е сутки развития. Для ПЭ и криоконсервации использовали расширенные бластоцисты качества AA, AB, BA и BB [13].

Криоконсервирование и размораживание эмбрионов проводили с использованием набора для витрификации и размораживания Kitazato («Kitazato», Япония) или Vitriification Kit и Warming Kit («Cryotech», Япония) согласно протоколу производителя.

Перенос селективного эмбриона и оценка беременности

Перенос селективного эмбриона в цикле ИСО осуществляли на 5-й день развития. Размороженный эмбрион переносили как в циклах заместительной гормональной терапии, так и в естественном цикле.

Для ПЭ отбирали лучшую бластоцисту согласно критериям [13]. Среднее число эмбрионов на перенос составило 1,0. Клиническая беременность определялась по наличию плодного яйца в полости матки. Прогрессирующая беременность определялась как беременность с отсутствием прерывания до 12 нед.

При статистической обработке данных приведены средние значения для всех серий экспериментов; для оценки статистической значимости различий использовался критерий *t*-Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные, полученные в ходе исследования, представлены в **таблице**.

Показано, что частота наступления клинической беременности была выше при ПЭ в криоциклах, чем в циклах ИСО, во всех возрастных группах и составила соответственно 42,2 и 34,6% у женщин 20—34 года, 32,3 и 27,9% — у женщин 35—39 лет, 20,3 и 15,8% — у женщин 40—47 лет. Разница по этому показателю в криоцикле и цикле ИСО составила от 4,4 до 7,6% в зависимости от возрастной группы, в пользу криоцикла.

Однако при оценке частоты прерывания беременности до 12 нед относительно количества наступивших клинических беременностей в группе пациенток 20—34 года данный показатель в криоцикле был значительно выше, чем при проведении ПЭ в цикле ИСО (32,2 и 20,9% соответственно). В возрастных группах 35—39 и 40—47 лет разница по показателю прерывания беременности до 12 нед при проведении ПЭ в циклах ИСО и криоциклах была статистически недостоверна.

При оценке частоты наступления прогрессирующей беременности ни в одной из возрастных групп не было выявлено статистически достоверной разницы между циклом ИСО и криоциклом. Данный показатель составил 15,3 и 15,9% в группе 20—34 го-

да, 10,0 и 10,3% в группе 35—39 лет, 3,7 и 4,7% в группе 40—47 лет.

Однако при оценке частоты прогрессирующей беременности было показано, что в группе пациенток 20—34 года данный показатель в цикле ИСО был значительно выше, чем в криоцикле (79,1 и 67,7% соответственно). Эти данные указывают на то, что у пациенток до 35 лет клиническая беременность разовьется в прогрессирующую с большей вероятностью при проведении ПЭ в цикле ИСО, чем в криоцикле. В возрастных группах 35—39 и 40—47 лет разница по показателю частоты прогрессирующей беременности при проведении ПЭ в циклах ИСО и криоцикла была статистически недостоверна.

По всем приведенным показателям (частота наступления клинической и прогрессирующей беременностей, частота прерывания беременности) вне зависимости от применяемого цикла ПЭ наблюдается строгое снижение результативности ВРТ с увеличением возраста пациенток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результативный перенос размороженного эмбриона впервые был осуществлен в 1983 г. и к настоящему моменту стал неотъемлемой частью ВРТ [14]. Использование криоконсервированных эмбрионов повышает кумулятивный показатель беременности, снижает стоимость программы, требует меньшего количества времени, чем проведение повторного цикла ИСО [15—17].

В настоящей работе сравнивали частоту наступления клинической беременности и прогрессирующей беременности в зависимости от возраста пациентки и проведения ПЭ в цикле ИСО или криоцикле. Показано, что ЧНБ в криоцикле в любой возрастной группе выше, чем при переносе в «свежем» цикле. Чем может быть обусловлена более высокая ЧНБ при ПЭ в криоцикле?

ЧНБ (в %) после ПЭ в цикле ИСО и криоцикле у пациенток разных возрастных групп

Показатель	Возрастная группа								
	20—34 года (n=2799)			35—39 лет (n=1363)			40—47 лет (n=670)		
	«свежий» цикл (n=1005)	криоцикл (n=1794)	<i>p</i> value	«свежий» цикл (n=434)	криоцикл (n=929)	<i>p</i> value	«свежий» цикл (n=202)	криоцикл (n=468)	<i>p</i> value
Частота наступления клинической беременности / ПЭ	34,6	42,2	<0,01	27,9	32,3	<0,01	15,8	20,3	<0,01
Прерывание беременности/наступление клинической беременности	20,9	32,3	<0,01	40,0	41,0	>0,05	63,2	57,4	>0,05
Прогрессирующая беременность/ПЭ	15,3	15,9	>0,05	10,0	10,3	>0,05	3,7	4,7	>0,05
Прогрессирующая беременность /наступление клинической беременности	79,1	67,7	<0,01	60,0	59,0	>0,05	36,8	42,6	>0,05

Одним из наиболее важных факторов, влияющих на ЧНБ, является возможность синхронизировать состояние эндометрия со стадией развития размороженного эмбриона [18–21]. Секреторная трансформация эндометрия и его рецептивность могут быть нарушены вследствие проведения протокола контролируемой гиперстимуляции яичников (P. Devroey и соавт., 2004). Вероятной причиной возникновения описанных негативных эффектов могут явиться супрафизиологические уровни стероидных гормонов в периоде, предшествующем имплантации эмбриона [22–24]. Рост эндометрия в цикле переноса криоконсервированного эмбриона более управляем, чем в цикле ИСО [25]. Считается, что «окно имплантации» эндометрия закрывается тем раньше, чем выше уровень эстрогенов (эндогенных или экзогенных), и тем самым снижает время для успешной имплантации бластоцисты, а в цикле ИСО уровень эстрогенов значительно выше за счет множественного роста фолликулов [26]. Также в цикле ИСО возможны нарушения функции желтого тела в связи с супрафизиологическими уровнями стероидных гормонов в крови женщины, которые напрямую ингибируют выброс ЛГ по принципу отрицательной обратной связи в гипоталамо-гипофизарной дуге [27].

Но значит ли, исходя из вышеперечисленного, что при выборе стратегии проведения программы ВРТ мы должны всегда переносить эмбрион в криоцикле, ожидая максимальной эффективности? Цель программы ВРТ — рождение здорового ребенка, а значит, необходимо руководствоваться не только данными о ЧНБ, а также учитывать данные о наступлении замершей беременности. Анализ наших данных показал, что частота замершей беременности в возрастных группах 35–39 и 40–47 лет не различается в зависимости от того, в «свежем» цикле или в криоцикле проходил ПЭ. Однако в возрастной группе 20–34 года частота замершей беременности при ПЭ в криоцикле значительно превышает частоту замершей беременности после ПЭ в цикле ИСО. Таким образом, у пациенток данной возрастной группы мы наблюдаем высокую частоту наступления беременности и высокую частоту прерывания беременности при переносе размороженного эмбриона.

Можно предположить, что такая разница связана с большей способностью к имплантации эмбрионов у женщин молодого возраста, а также лучшим состоянием эндометрия при криопереносе. Известно, что большую роль в имплантации играет не толь-

ко генетический статус эмбриона, но также свойства цитоплазмы его клеток, в том числе митохондрий, отвечающих за энергетический обмен в клетках эмбриона. Показано, что уровень митохондриальной ДНК в клетках эмбрионов, полученных у женщин старшего репродуктивного возраста, значительно выше, чем у эмбрионов, полученных от ооцитов молодых женщин, и обратно коррелирует со способностью эмбриона к имплантации [28].

Известно, что одной из основных причин прерывания беременности в первой трети является анеуплоидия эмбриона. Можно предположить, что на начальных этапах имплантации, при инвазии эндометрия клетками трофэктодермы, большую роль играют цитоплазматические характеристики инвазирующих клеток, а при дальнейшем развитии эмбриона возможные генетические аномалии приводят к остановке эмбриона в развитии. Возможно, подобная последовательность событий приводит к высокой частоте наступления клинической беременности и высокой частоте прерывания беременности у пациенток молодого возраста.

Исходя из вышеперечисленного, можно, учитывая возраст пациентки, планировать программу ВРТ с целью выбора максимально эффективной тактики.

ВЫВОДЫ

1. Несмотря на более высокую частоту наступления клинической беременности, женщины до 35 лет имеют повышенный риск потери беременности в сроки до 12 нед после ПЭ в криоцикле по сравнению с циклом ИСО, поэтому, при отсутствии противопоказаний, у пациенток данной возрастной группы более предпочтительно делать ПЭ в цикле ИСО.

2. Отсутствие различий в частоте прогрессирующей беременности после ПЭ в криоцикле и цикле ИСО в группе пациенток 35–39 лет позволяет лечащему врачу выбирать между ПЭ в цикле ИСО и криопереносом в зависимости от клинической ситуации.

3. Низкая частота прогрессирующей беременности после ПЭ в группе женщин старше 40 лет позволяет рекомендовать таким пациенткам использовать донорские ооциты.

Конфликт интересов отсутствует.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-50-0029).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Human Reproduction Update*. 2003;9(6):515-522. doi:10.1093/humupd/dmg045.
2. Basir G, Lam T, O W, Chau M, Ng E, Ho P. Cycle-to-cycle variation in utero-ovarian hemodynamic indices in ovarian stimulation

and natural cycles of the same women and its effect on the outcome of assisted reproduction treatment. *Fertility and Sterility*. 2002;78(5):1055-1060.

doi:10.1016/s0015-0282(02)03376-9.

3. Horcajadas J. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Molecular Human Reproduction*. 2005;11(3):195-205. doi: 10.1093/molehr/gah150.
4. Papanikolaou E. Steroid receptor expression in late follicular phase endometrium in GnRH antagonist IVF cycles is already altered, indicating initiation of early luteal phase transformation in the absence of secretory changes. *Human Reproduction*. 2005;20(6):1541-1547. doi: 10.1093/humrep/deh793.
5. Simón C, García Velasco J, Valbuena D, et al. Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high responders with the use of a follicle-stimulating hormone step-down regimen. *Fertility and Sterility*. 1998;70(2):234-239. doi: 10.1016/s0015-0282(98)00140-x.
6. Ng E. Comparison of endometrial and subendometrial blood flow measured by three-dimensional power Doppler ultrasound between stimulated and natural cycles in the same patients. *Human Reproduction*. 2004;19(10):2385-2390. doi: 10.1093/humrep/deh384.
7. Basir G, O W, Yu Ng E, Ho P. Morphometric analysis of peri-implantation endometrium in patients having excessively high oestradiol concentrations after ovarian stimulation. *Human Reproduction*. 2001;16(3):435-440. doi: 10.1093/humrep/16.3.435.
8. Tavaniotou A, Bourgain C, Albano C, Platteau P, Smitz J, Devroey P. Endometrial integrin expression in the early luteal phase in natural and stimulated cycles for in vitro fertilization. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2003;108(1):67-71. doi: 10.1016/s0301-2115(02)00428-1.
9. Bersinger N, Wunder D, Vanderlick F et al. Maternal serum levels of placental proteins after in vitro fertilisation and their implications for prenatal screening. *Prenatal Diagnosis*. 2004;24(6):471-477. doi: 10.1002/pd.910.
10. Veeck L. Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw? *Reproductive BioMedicine Online*. 2003;6(3):367-374. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61859-7.
11. Anderson A, Wilkinson S, Price S, Crain J. Reduction of high order multiples in frozen embryo transfers. *Reproductive BioMedicine Online*. 2005;10(3):402-405. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61803-2.
12. Yakovenko S, Apyrshko V, Yutkin E, Troshina M, Simonenko E. Technique and effectiveness of intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection (IMSI) based on HMC (Hoffman modulation contrast). *Fertility and Sterility*. 2009;92(3):S162. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.07.1300.
13. Gardner D, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft W. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*. 2000;73(6):1155-1158. doi: 10.1016/s0015-0282(00)00518-5.
14. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983;305(5936):707-709. doi: 10.1038/305707a0.
15. Gelbaya T, Nardo L, Hunter H, et al. Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regulated hormonally controlled cycles: a retrospective study. *Fertility and Sterility*. 2006;85(3):603-609. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.09.015.
16. Lahav-Baratz S, Koifman M, Shiloh H, Ishai D, Wiener-Megnazi Z, Dirnfeld M. Analyzing Factors Affecting the Success Rate of Frozen-Thawed Embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2003;20(11):444-448. doi: 10.1023/b:jarg.0000006705.46147.a2.
17. Urman B, Balaban B, Yakin K. Impact of fresh-cycle variables on the implantation potential of cryopreserved-thawed human embryos. *Fertility and Sterility*. 2007;87(2):310-315. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.06.034.
18. Edwards R. Human Uterine Endocrinology and the Implantation Window. *Ann NY Acad Sci*. 1988;541(1 In Vitro Fert):445-454. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb22281.x.
19. Yoshinaga K. Uterine Receptivity for Blastocyst Implantation. *Ann NY Acad Sci*. 1988;541(1 In Vitro Fert):424-431. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb22279.x.
20. Harper M. The implantation window. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 1992;6(2):351-371. doi: 10.1016/s0950-3552(05)80092-6.
21. Duc-Goiran P, Mignot T, Bourgeois C, Ferré F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1999;83(1):85-100. doi: 10.1016/s0301-2115(98)00310-8.
22. Imudia A, Awonuga A, Kaimal A, Wright D, Styer A, Toth T. Elective cryopreservation of all embryos with subsequent cryothaw embryo transfer in patients at risk for ovarian hyperstimulation syndrome reduces the risk of adverse obstetric outcomes: a preliminary study. *Fertility and Sterility*. 2013;99(1):168-173. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.060.
23. Imudia A, Awonuga A, Doyle J, et al. Peak serum estradiol level during controlled ovarian hyperstimulation is associated with increased risk of small for gestational age and preeclampsia in singleton pregnancies after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2012;97(6):1374-1379.
24. Farhi J, Ben-Haroush A, Andrawus N, et al. Erratum to «High serum oestradiol concentrations in IVF cycles increase the risk of pregnancy complications related to abnormal placentation» [*Reprod BioMed Online*. 2010;21:331-337]. *Reproductive BioMedicine Online*. 2011;22(1):101. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.09.006.
25. Shapiro B, Daneshmand S, Garner F, Aguirre M, Ross R. Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertility and Sterility*. 2008;89(1):20-26. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.08.092.
26. Morozov V, Ruman J, Kenigsberg D, Moodie G, Brenner S. Natural cycle cryo-thaw transfer may improve pregnancy outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2007;24(4):119-123. doi: 10.1007/s10815-006-9100-y.
27. Fauser B, Devroey P. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2003;14(5):236-242. doi: 10.1016/s1043-2760(03)00075-4.
28. Fragouli E, Spath K, Alfarawati S et al. Altered Levels of Mitochondrial DNA Are Associated with Female Age, Aneuploidy, and Provide an Independent Measure of Embryonic Implantation Potential. *PLoS Genet*. 2015;11(6):e1005241. doi: 10.1371/journal.pgen.1005241.