

ДЕМЕНТЬЕВА
Виктория Олеговна

**КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ БЕСЛОДИЯ У ПАЦИЕНТОК СО
СНИЖЕННЫМ ОВАРИАЛЬНЫМ РЕЗЕРВОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ
ХИРУРГИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

академик РАН, д.м.н., профессор

Адамян Лейла Владимировна

д.м.н.

Асатулова Александра Вячеславовна

Официальные оппоненты:

Доброхотова Юлия Эдуардовна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета, заведующая кафедрой

Калугина Алла Станиславовна- доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства, гинекологии и неонатологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России.

Ведущая организация: ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии».

Защита диссертации состоится «08» ноября 2022 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России <https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Dementeva%20VO-disser.pdf?181979587>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2022г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) в лечении бесплодия широко внедрены во всех странах мира. По литературным данным около 2,5 % новорожденных детей в Европе рождается вследствие проведения программ ВРТ [Nygren, K. G. // Hum. Reprod – 2002]. Одним из факторов, значительно снижающим результативность программы ЭКО, является «бедный овариальный ответ» на стимуляцию функции яичников, который по данным различных авторов встречается в 9-24% случаев и приводит к снижению количества полученных ооцитов, отмене циклов ЭКО и значительному уменьшению частоты наступления беременности и родов [D.J. Hendriks [et al.] // J. Reprod. Biomed. Online. – 2008]

До настоящего времени одним из возможных способов достижения беременности у пациенток с резким снижением овариального резерва являлась программа ЭКО с донацией ооцитов. Однако ряд женщин не приемлют использование программы ЭКО, особенно с донацией ооцитов как метод лечения бесплодия по различным соображениям: этическим, религиозным и пр.

Начиная с 2010 года появляются публикации о достижении беременности при использовании активации *in vitro* остаточных фолликулов путем индукции изменений в системе сигнальных путей, предложенной, как альтернативный донорским программам метод лечения бесплодия у пациенток с ПНЯ [Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Li J, Kawamura K et al].

Разработка метода прошла путь от экспериментальных до клинических исследований, что позволило не только модифицировать технологию, но и расширить показания к ней. Изначально методика предполагала проведение оварэктомии с последующей криоконсервацией ткани, ее фрагментацией и двухдневной активацией *in vitro* (добавление в среду ингибитора PTEN и активатора PI3K- сигнальных путей). В дальнейшем производилась ипсилатеральная трансплантация размороженной фрагментированной ткани под серозную оболочку маточной трубы. Дальнейшие фундаментальные исследования показали, что сама по себе процедура фрагментации овариальной ткани приводит

к инактивации Hippo сигнального пути, [Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Kawamura K et al] с последующим фолликулярным ростом без какого-либо фармакологического воздействия, что позволило не только сократить объем операции до биопсии коры яичника, но и применять методику у пациенток с «бедным» овариальным ответом яичников на стимуляцию [Pellicer Antonio et al. 2016].

В связи с вышеизложенным, представляется актуальным проведение исследований по использованию новых хирургических технологий в комплексном лечении бесплодия у пациенток с крайне низким овариальным резервом, в том числе при отсутствии эффекта от продолжительного предшествующего лечения бесплодия, включая многократные неэффективные попытки ЭКО.

Цель исследования

Повышение эффективности комплексного лечения бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом с использованием новых хирургических технологий.

Задачи исследования

1. Разработать технику оперативного вмешательства, включающего биопсию, фрагментацию и реимплантацию овариальной ткани с использованием принципов минимально инвазивной репродуктивной хирургии.
2. Определить клиничко-лабораторные показания к использованию хирургического этапа комплексного лечения в исследуемой группе с целью разработки критериев отбора пациенток на основании анализа анамнестических данных, параметров генетического исследования, клинического и гормонального статуса обследуемых пациенток со сниженным овариальным резервом.
3. Изучить гистологическую и иммуногистохимическую характеристику овариальной ткани и эндометрия у пациенток со сниженным овариальным резервом с целью выявления характерологических особенностей их

структуры и определения уровня экспрессии ключевых протеинов, участвующих в передаче сигнала по пути Hippo.

4. Разработать тактику комплексного лечения, включая предоперационную подготовку, хирургический этап и послеоперационное ведение пациенток со сниженным овариальным резервом с учетом клинико-anamнестических данных, объективных показателей овариального резерва, интраоперационных данных и результатов гистологического и иммуногистохимического исследований.
5. Оценить результативность проведенного комплексного лечения по следующим параметрам: общее самочувствие, динамика изменений гормональных показателей пациенток (уровни E2, ФСГ и ЛГ), числа антральных фолликулов; репродуктивные исходы: частота наступления беременности как спонтанной, так и с применением методов вспомогательных репродуктивных технологий, частота ранних репродуктивных потерь беременности из числа наступивших, показатели живорождения и оценка состояния здоровья новорожденных.
6. Дать рекомендации в практическое здравоохранение по тактике комплексного лечения бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом при неэффективности предшествующего лечения с использованием хирургической активации овариальной ткани при использовании особой оперативной техники.

Научная новизна исследования

Разработана концепция ведения пациенток со сниженным овариальным резервом, включающая современные методы клинико-лабораторной и инструментальной диагностики, способ хирургической активации овариальной ткани для лечения бесплодия, обусловленного снижением или отсутствием овуляторной и стероидпродуцирующей функций яичников, подходы к стимуляции функции яичников в послеоперационном периоде в рамках комплексного восстановления репродуктивной функции.

Разработан, обеспечен патентом на изобретение и внедрен в практику новый одноэтапный хирургический метод активации функции яичников.

Впервые изучены морфометрические особенности овариальной ткани у пациенток со сниженным овариальным резервом. Определены характерологические особенности ткани яичников, выявляемые интраоперационно и по данным гистологического исследования у пациенток с числом CGG-повторов в гене FMR1 <26.

Впервые определена степень экспрессии белков Hippo-сигнального пути (YAP, MST-1, LATS-1) и ингибитора фосфоинозитол-3-киназного сигнального пути PTEN в строме, железистом компоненте эндометрия и в яичниковой ткани с определением корреляционных взаимосвязей с позиции степени экспрессии вышеуказанных маркеров в биоптатах яичников и в ткани эндометрия, свидетельствующая о нарушении функционирования внутриклеточных сигнальных путей (прежде всего YAP- и PTEN-зависимых) у пациенток со сниженным овариальным резервом.

Установлены критерии отбора пациенток для оперативного лечения, ключевыми из которых являются: бесплодие, отсутствие эффекта от проводимого ранее лечения, включая методы ВРТ, крайне низкий овариальный резерв по данным клинико-гормонального профиля, а также данным ультразвукового исследования.

Подтверждена эффективность применения разработанного нами одноэтапного хирургического метода активации функции яичников с целью лечения бесплодия, ассоциированного со снижением овариального резерва, значительно повышающего клиническую результативность комплексного лечения.

Отмечены особенности сочетаний преждевременной недостаточности яичников с наружным генитальным эндометриозом, аденомиозом и пороками развития внутренних половых органов, что позволяет предположить общие механизмы их развития и прогрессирования. Однако это не было предметом

исследования, явилось критерием исключения, и требует дальнейшего детального изучения.

Практическая значимость исследования

Разработанный алгоритм ведения больных позволил провести оптимальное комплексное лечение, включая хирургическое вмешательство и стимуляцию функции яичников в послеоперационном периоде, а в ряде случаев – отказаться от реализации программ ВРТ в связи с достижением беременности самопроизвольно на фоне спонтанного фолликулярного роста.

Сочетание различных форм преждевременной недостаточности яичников с другими гинекологическими заболеваниями являлось критерием исключения из исследования, однако раскрывает возможность одноэтапного выполнения сочетанных гинекологических операций, направленных на уточнение и устранение сопутствующих факторов бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом, тем самым значительно повышая эффективность лечения.

Комплексное лечение больных с бесплодием, ассоциированным со сниженным овариальным резервом по разработанной нами методике, в том числе включая хирургический метод активации функции яичников и гормональную коррекцию, позволяет повысить частоту получения собственных ооцитов, частоту оплодотворения, бластуляции и наступления беременности в программах ВРТ, а также повышает вероятность наступления спонтанной беременности.

Диссертационное исследование обосновало необходимость своевременного консультирования пациенток со сниженным овариальным резервом по вопросам реализации репродуктивной функции, подразумевающего проведение комплексного обследования- клинико-гормонального и инструментального с возможным проведением диагностических лапаро- и гистероскопии с выполнением (при наличии условий и показаний) предложенного одноэтапного хирургического метода активации функции яичников, что подтверждается снижением результативности комплексного восстановления репродуктивной

функции после продолжительного неэффективного лечения бесплодия, включая многократные попытки ЭКО.

Положения, выносимые на защиту

1. Наряду с общеизвестными факторами риска, такими как воздействие стрессовых факторов, курение, наличие семейного анамнеза по ранней менопаузе, хронические заболевания щитовидной железы, сниженный овариальный резерв ассоциирован с нарушением функционирования внутриклеточных сигнальных путей, прежде всего PTEN-зависимого Hippo-сигнального пути.
2. Результаты морфофункциональной оценки состояния фолликулярного аппарата яичников и эндометрия у пациенток со сниженным овариальным резервом свидетельствуют о наличии изменений в различных структурах яичников (в поверхностном эпителии, сосудистом компоненте, строме коркового слоя), а также о клинко-морфологических параллелях между гистологической структурой яичниковой ткани и эндометрия, иммуногистохимической экспрессией тканевых маркеров в них и результативностью стимуляции функции яичников, что подчеркивает нарушение функционирования Hippo-сигнального пути и отражает продолжительное неэффективное предшествующее лечение бесплодия.
3. Разработанный одноэтапный хирургический метод активации функции яичников, проводимый по собственной оригинальной методике в рамках созданных критериев: возраст до 42 лет, нарушение менструального цикла по типу олиго-аменореи длительностью не более 2-х лет, данные ультразвуковой фолликулометрии: объем яичников не менее 2,5 см³, наличие единичных антральных фолликулов, уровень ФСГ на фоне приема заместительной гормональной терапии не более 25 мМЕ/мл, соотношение ФСГ/ЛГ 2/1 и более, является безопасным, минимально инвазивным и малотравматичным методом преодоления бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом.

4. Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников является эффективным методом лечения бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом, способствуя улучшению общего самочувствия, снижению уровня гонадотропинов, увеличению среднего количества антральных фолликулов на яичник, числа ооцитов, повышению частоты оплодотворения и бластуляции с получением эмбрионов хорошего и отличного качества с частотой наступления беременности 26,6% из расчета на цикл стимуляции, низкой частотой ранних репродуктивных потерь-18,75% и высокими показателями живорождения (10 живорождений на 16 беременностей, 4 из которых в настоящее время развиваются).

Личный вклад автора

Автору принадлежит основная роль в определении цели и задач исследования, обосновании выводов и практических рекомендаций. Автор проводил набор и анализ диссертационного материала на всех этапах проведения научно-практического исследования: отбор и обследование пациенток, принимал непосредственное участие в хирургическом лечении и послеоперационном ведении пациенток по поводу бесплодия, ассоциированного со снижением овариального резерва. Автором самостоятельно проведены систематизация и статистическая обработка полученных результатов, написание статей по теме диссертации, диссертации и автореферата диссертации. Лично автором проведена разработка алгоритмов ведения больных с различными формами ПНЯ, усовершенствованы и уточнены методы оперативного лечения, которые отражены в патенте на изобретения.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4 – акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3, 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии

Апробация работы

Материалы исследования доложены и обсуждены на заседании межклинической конференции отделений оперативной гинекологии 21.06.2021 и апробационной комиссии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации 20.12.2021.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на: Международных конгрессах «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 2019, 2020, 2021 гг); Международных конгрессах по репродуктивной медицине (Москва, 2019, 2020, 2021, 2022 гг); Всероссийских научно-образовательных форумах «Мать и дитя» (Москва, 2019, 2020, 2021 гг); Всероссийских конгрессах с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья: от менархе до менопаузы» (Москва, 2019, 2020, 2021 гг); Всемирном конгрессе Американской ассоциации гинекологов-лапароскопистов – AAGL (Техас, США, on-line, 2021 г.); Российском научно-практическом конгрессе "Гинекологическая эндокринология в возрастном аспекте: проблемы и решения" (Москва, 2021 г.)

Внедрение результатов исследования в практику

Полученные научные и практические результаты исследования внедрены и используются в практической работе гинекологического отделения отдела оперативной гинекологии и общей хирургии и отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени Б.В. Леонова института репродуктивной медицины ФГБУ «НМИЦ АГиП им академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Результаты диссертационной работы используются в материалах семинаров, лекций, образовательных мероприятий Центра.

Публикации результатов работ

По материалам диссертационной работы опубликовано 11 печатных работ в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ, и 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 185 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 209 источников, из них 6 отечественных и 203 зарубежных автора. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 31 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертационная работа проведена на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН Г.Т. Сухих).

Исследование проводилось на базе гинекологического отделения (руководитель академик РАН, д.м.н., профессор Адамян Л.В.), 1-го патологоанатомического отделения (руководитель д.м.н. Асатурова А.В.) и отделения вспомогательных методов в лечении бесплодия им. Б.В. Леонова (руководитель д.м.н. профессор Калинина Е.А.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (далее - Центр). В период с ноября 2018 г. по декабрь 2021 г. были обследованы 102 женщины, обратившиеся для лечения бесплодия.

В соответствие с заданными критериями включения были отобраны 102 пациентки, подписавшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено Комиссией по этике Центра (протокол № от 14.11.2018 г.). Все пациентки были обследованы в соответствии с приказом Минздрава России №803н от 31.07.2020 г. "О порядке использования

вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению".

Критериями включения пациенток в исследование являлись:

- Репродуктивный возраст пациенток
- Бесплодие, отсутствие эффекта от проводимого ранее лечения, в том числе с применением методов ВРТ
- Сниженный овариальный резерв
- Фертильная или субфертильная сперма супруга;
- Подписание информированного письменного согласия пациентки на участие в исследовании.

Критериями исключения из исследования являлись:

- Генетически обусловленная ПНЯ (мутации в генах FMR1, AR), аномальные формы кариотипа (по данным цитогенетического исследования)
- Ятрогенная ПНЯ: операции на яичниках в анамнезе, химио-лучевая терапия по поводу онкологических заболеваний
- Клинические и УЗ-признаки сопутствующих бесплодию гинекологических заболеваний, в том числе миомы матки; патологии эндометрия; опухолевых образования яичника, наружного генитального эндометриоза
- Тяжелые формы патозооспермии, в том числе использование спермы, полученной оперативным путем
- Противопоказания к ВРТ согласно приказу 803н МЗ РФ

Всем пациенткам, включенным в настоящее исследование, до первичного обращения в Центр было рекомендовано проведение программы ЭКО с использованием донорских ооцитов как единственно возможный вариант достижения беременности.

На дооперационном этапе все пациентки проходили общеклиническое, эхографическое и клинико-лабораторное обследование.

Гормональное исследование проводилось в Клинико-диагностической лаборатории Центра. Для оценки эндокринного статуса в пределах ранней фолликулярной фазы менструального цикла при сохраненном ритме менструаций,

либо после индукции заместительной менструалоподобной реакции при нарушении менструального цикла по типу олиго-аменореи перед назначением заместительной гормональной терапии, либо при состоянии на фоне ЗГТ в рамках предоперационной подготовки к хирургическому этапу лечения исследовали уровни фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, пролактина, эстрадиола, общего тестостерона, андростендиона, тиреотропного гормона, свободного тироксина в периферической крови. Уровни гормонов определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA).

В рамках предварительного обследования всем пациенткам выполнялось исследование кариотипа с применением метода G-окраски, а также определение статуса генов андрогенового рецептора (AR)- число CAG-повторов и FMR1-количество CGG-повторов методом флуоресцентной ПЦР.

УЗИ органов малого таза выполняли в отделении ультразвуковой и функциональной диагностики Центра на аппарате GE Voluson E10 (США), используя трансвагинальный датчик с частотой 9,0 МГц.

Всем обследованным пациенткам после получения информированного добровольного согласия выполнено оперативное вмешательство в объеме: лапароскопия, ревизия органов малого таза, гистероскопия, биопсия эндометрия. 13 пациенток были исключены из исследования в связи с наличием сопутствующих гинекологических заболеваний впервые диагностированных интраоперационно.

89-ти женщинам в ходе хирургического вмешательства выполнен одноэтапный хирургический метод активации функции яичников.

В ходе оперативного вмешательства не применялись иные хирургические энергии, кроме механической (эндоскопические ножницы), в качестве шовного материала была использована монофиламентная нить Vicryl 2,0 в сочетании с атравматичными тонкими иглами. Этап фрагментации выполнялся путем стрипирования биопсированных участков коркового слоя яичников в стерильном гаметном буфере специальным инструментом. Этап реимплантации проводился с использованием аспирационной кюретки- Пайпеля.

Вышеописанные этапы работы дополнялись проведением гистологического и иммуногистохимического исследований образцов биоптатов коркового слоя яичников, а также ткани эндометрия.

Все образцы ткани подвергались обработке согласно стандартному гистологическому протоколу. Гистологическое исследование биоптатов яичников выполняли в 1-ом патологоанатомическом отделении Центра с помощью микроскопа Axio Scope A1 («Karl Zeiss», Германия).

После оперативного вмешательства ряду пациенток проведена стимуляция функции яичников. При проведении программы ЭКО в различные сроки послеоперационного периода (при наличии условий и показаний) использовалась гонадотропная стимуляция функции яичников по стандартным протоколам.

Статистический анализ полученных данных проводили при помощи стандартных методов математико-статистической обработки с использованием программы Statistica 10.0. Различия расценивались статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ результатов осуществлялся при помощи статистических программ SPSSSoftwareV22.0 (США), электронных таблиц «Microsoft Excel» и Statistica 10.0. с соблюдением рекомендаций для медицинских и биологических исследований.

Результаты исследований и их обсуждение

В исследование было включено 102 пациентки со сниженным овариальным резервом, страдающие бесплодием, резистентным к стандартным методам лечения, включая методы ВРТ.

Средний возраст пациенток, включенных в исследование, составил $33 \pm 6,1$ года. Средняя продолжительность бесплодия- $3,7 \pm 1,6$ лет (Рисунок 1). На основании изучения данных репродуктивного анамнеза установлено, что до начала развития заболевания в группе пациенток с вторичным бесплодием детородная функция была реализована у 14,6% женщин (Рисунок 2).

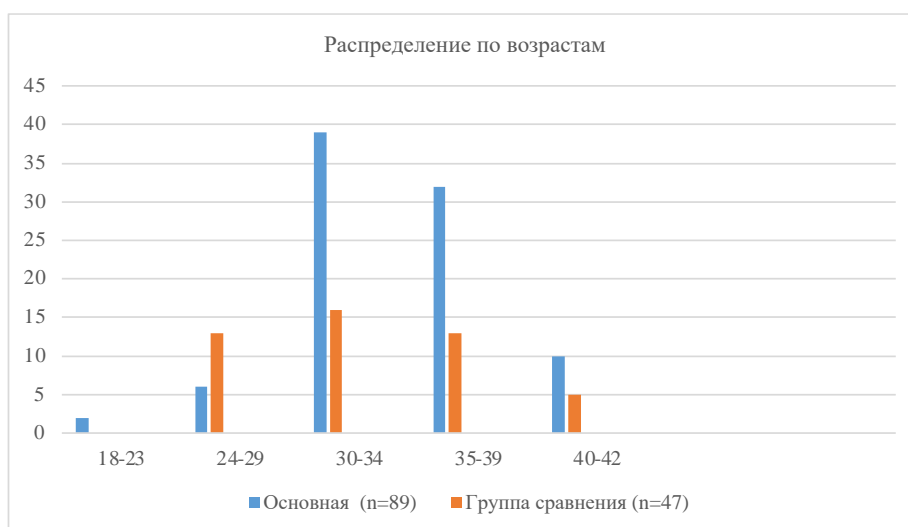


Рисунок 1 - Распределение пациенток, включенных в исследование по возрастам

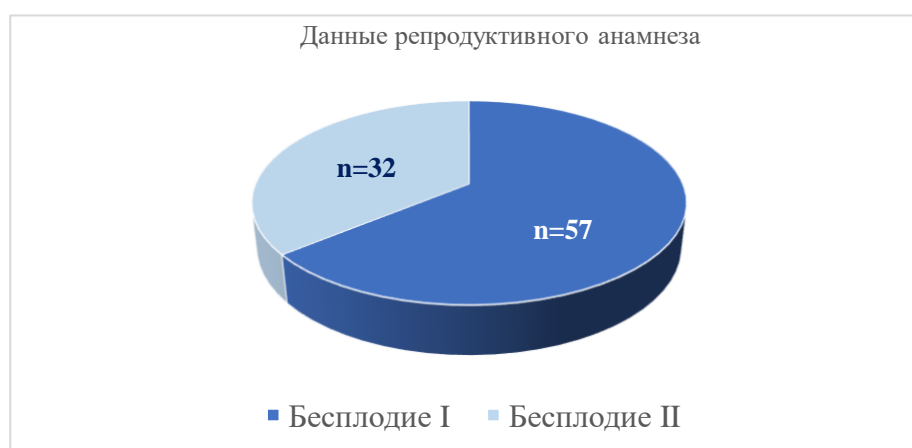


Рисунок 2 - Данные репродуктивного анамнеза пациенток, включенных в исследование

При оценке менструальной функции не было выявлено статистически значимых отличий в характеристиках менструального цикла (до начала нарушения ритма менструаций у пациенток со сниженным овариальным резервом) между основной группой и группой сравнения (Рисунок 3).

Оценка менструальной функции



Рисунок 3 - Оценка менструальной функции пациенток, включенных в исследование

У 53,9% пациенток ритм менструаций на момент включения в исследование был сохранен, 46,1% женщин предъявляли жалобы на вторичную аменорею длительностью от 3 месяцев до 10 лет (Рисунок 4-А,Б).

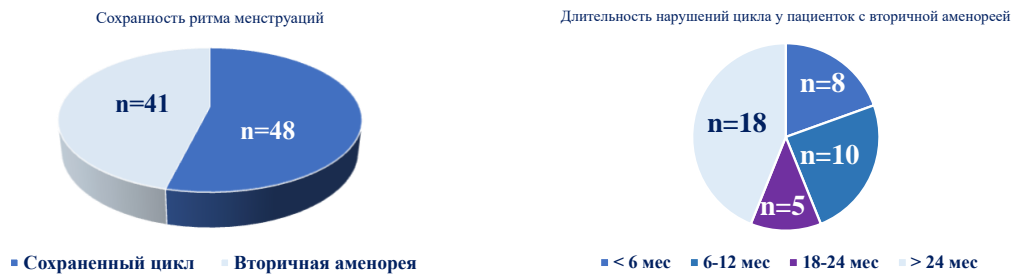


Рисунок 4 - А. Сохранность ритма менструаций у пациенток, включенных в исследование. Б. Длительность нарушений менструального цикла у пациенток с вторичной аменореей

В группе пациенток со сниженным овариальным резервом ранняя менопауза у матерей отмечена в 25 (28,08%) случаях, что достоверно отличает группу исследования от группы сравнения, в которой раннее выключение функции яичников у матери отмечали лишь 5 (10,6%) пациенток, $p=0.011$ (Рисунок 5).

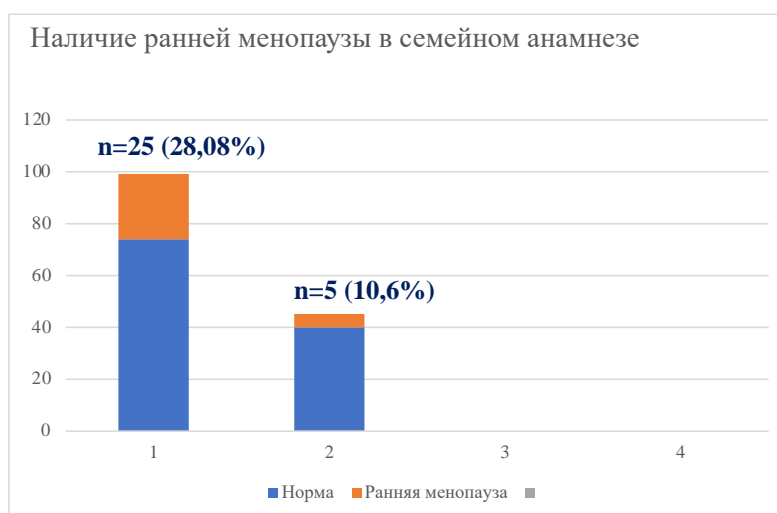


Рисунок 5 - Доля пациенток основной группы и группы сравнения с наличием ранней менопаузы в семейном анамнезе

Анализ жалоб пациенток, помимо отсутствия наступления беременности, показал, что вегетососудистые проявления отмечали 12 пациенток вне приема заместительной гормональной терапии, при этом у 4 из них отмечались периодические приливы жара, преимущественно в ночное время даже на фоне приема терапии. Психоэмоциональные нарушения в виде депрессивных состояний (усталость, раздражительность, тревожность), а также наличие когнитивных расстройств по типу снижения памяти и концентрации внимания были отмечены у 78,3% (70/89). 84,2% (75/89) пациенток предъявляли жалобы на снижение полового влечения. Нарушения сна по типу бессонницы и фрагментации выявлены у 7 женщин, 6 пациенток отмечали быструю прибавку массы тела – 6,74%. Генитоуринарные расстройства, сухость во влагалище отмечены у 18,1% (16/89) пациенток (Рисунок 6).

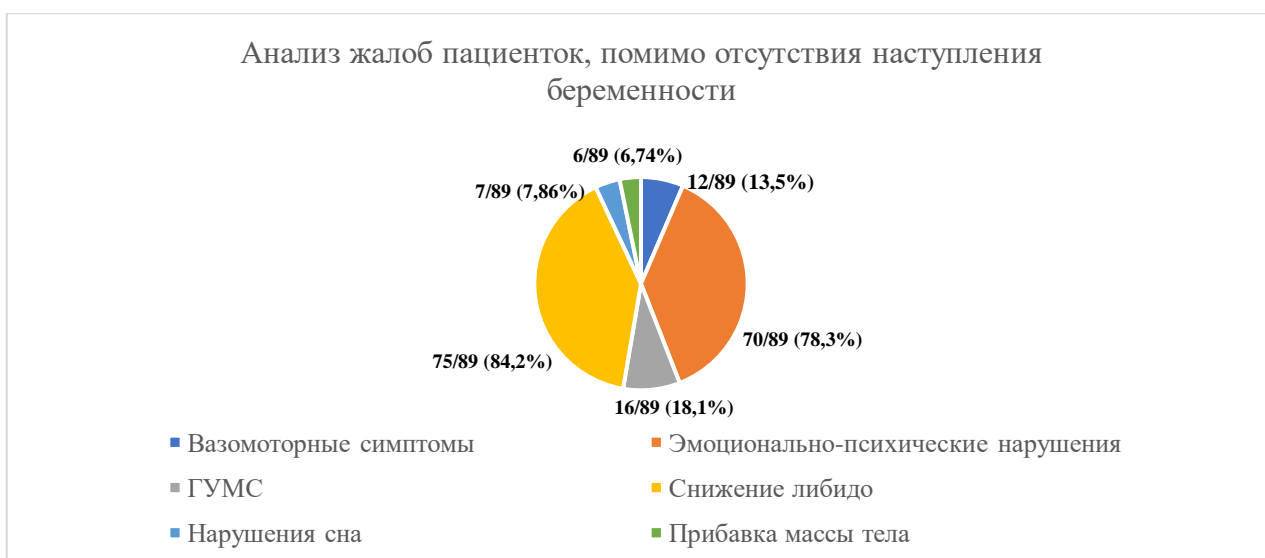


Рисунок 6- Структура жалоб пациенток, включенных в исследование, помимо отсутствия наступления беременности

В структуре экстрагенитальной патологии обращают на себя внимание заболевания щитовидной железы (ХАИТ), выявляемые статистически значимо чаще в исследуемой группе (51/7). При анализе анамнестических данных, с точки зрения наличия факторов, потенциально влияющих на снижение овариального резерва в исследуемой группе, достоверно чаще встречается курение (60/16) и воздействие стрессовых факторов (52/5) (Рисунок 7). Полученные нами результаты оценки анамнестических данных не противоречат данным д.м.н. Перминовой С.Г., изучившей вклад заболеваний щитовидной железы в развитие бесплодия [Перминова С.Г., 2010].

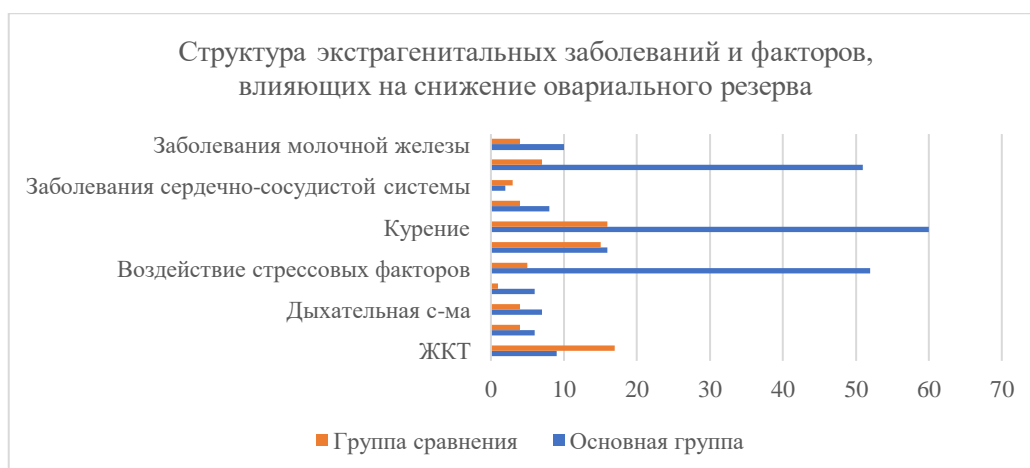


Рисунок 7- Структура экстрагенитальной патологии и факторов, потенциально влияющих на овариальный резерв, у пациенток групп исследования и сравнения

Изучение клинико-anamnestических данных вносит вклад в повышение эффективности преклинической диагностики снижения овариального резерва путем выделения групп риска по данному состоянию, что имеет принципиальное значение в контексте обсуждаемой темы в связи с возможностью реализации репродуктивной функции при использовании собственного генетического материала у пациенток на оккультной стадии ПНЯ.

Разработан собственный метод, подразумевающий хирургическую активацию ткани яичников. На основании модификации оперативной техники нами был получен патент на изобретение «Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников для лечения преждевременной недостаточности яичников и восстановления овариальной функции" № 2020133911

Отличительными особенностями собственной техники являются: одноэтапная операция лапароскопическим доступом, отсутствие использования хирургических энергий на всех этапах оперативного вмешательства, отсутствие использования дополнительных пластических материалов, реимплантация ипси-билатерально в толщу яичника, биопсия коркового слоя размером не более 1 см, модифицированная техника формирования пространства для реимплантации, этап гистероскопии, биопсия эндометрия.

Большинством авторов, частично или полностью акцептированных оригинальную методику японских исследователей ведется разработка модификаций метода с учетом особенностей страны проживания, в том числе клинико-экономической эффективности [Fabregues, 2018; Mahajan, 2019; Lunding S, 2018; Pellicer A, 2016, Chang X, 2019].

Все операции проведены без интра- и послеоперационных осложнений. Средняя продолжительность операции составила 1 час 10 мин со средней кровопотерей 10 мл. В послеоперационном периоде проводилась антибактериальная, инфузионная терапия и ранняя послеоперационная физиотерапия. Выписка производилась на 3-5-е сутки после операции.

В ходе настоящего исследования определены характерологические особенности ткани яичников, выявляемые интраоперационно и по данным гистологического исследования у пациенток с числом CGG-повторов в гене FMR1 <26. (Рисунок 8).

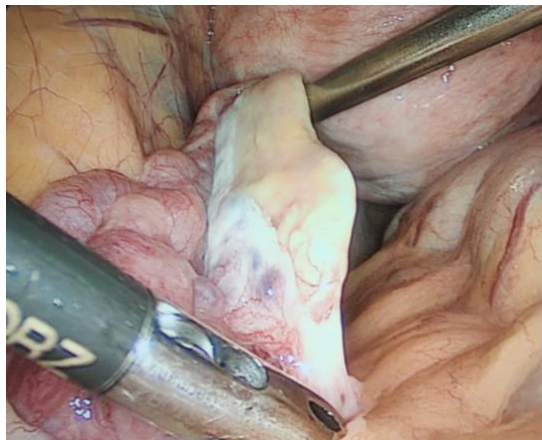


Рисунок 8– Морфометрическая структура ткани яичников у пациенток с числом CGG- повторов в гене FMR1 <26 (интраоперационная визуализация)

По нашему мнению, в рамках предварительного обследования пациенток с крайне низким овариальным резервом необходима детальная оценка статуса гена FMR1 с обращением особого внимания на область, представленную числом CGG повторов менее 26 с целью объективного прогнозирования эффективности комплексного лечения бесплодия с использованием хирургических технологий.

В послеоперационном периоде проводилась оценка показателей гормонального профиля пациенток, включенных в исследование. Контрольные лабораторные исследования по определению сывороточных уровней гонадотропинов и эстрадиола выполнялись ежемесячно на 2-3 день менструального цикла на фоне приема ЗГТ (Рисунок 9,10,11).

Статистически значимое снижение уровней гонадотропинов (ФСГ в 1,97 и ЛГ в 1,37 раз от исходного уровня) в сочетании со стабильной концентрацией эстрадиола у пациенток со сниженным овариальным резервом в послеоперационном периоде достигало своего предела в среднем через 3-5 менструальных циклов, выходя на условное плато к 6 месяцу послеоперационного наблюдения с последующим повышением соответствующих значений гонадотропинов, происходящим с индивидуальной скоростью (Таблица 1,2,3).

Указанная выше динамика соотносится с данными К. Kawamura и соавт [Kawamura К. 2015].

Уровень АМГ при сравнении показателей до и после проведения хирургического этапа лечения достоверно не отличался независимо от срока послеоперационного периода.

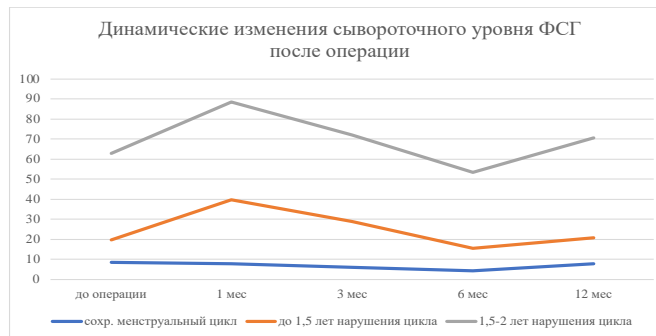


Рисунок 9 - Динамические изменения сывороточного уровня ФСГ после хирургического этапа комплексного лечения

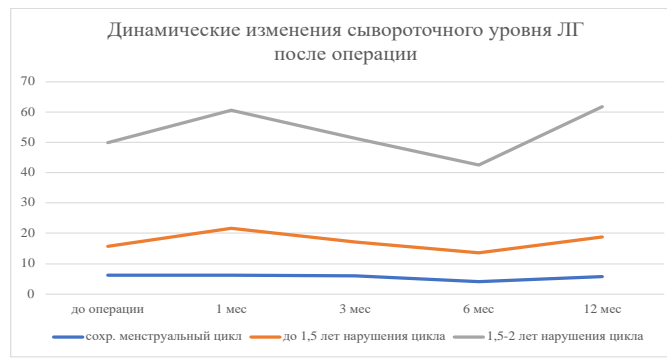


Рисунок 10- Динамические изменения сывороточного уровня ЛГ после хирургического этапа комплексного лечения

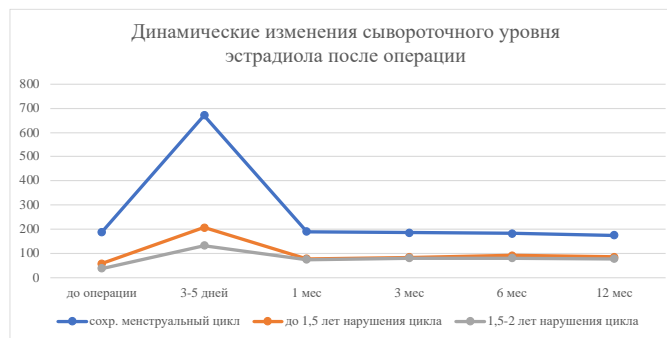


Рисунок 11- Динамические изменения сывороточного уровня эстрадиола после хирургического этапа комплексного лечения

Таблица 1- Оценка статистической значимости снижения уровня ФСГ в различные сроки послеоперационного периода в зависимости от длительности нарушений менструального цикла, предшествующих хирургическому этапу комплексного лечения

ФСГ	до операции/ через 1 мес	до операции/ через 3 мес	до операции/ через 6 мес	до операции/ через 12 мес
сохр. менструальный цикл	0,0374	0,0001	0,0001	0,0499
до 1,5 лет нарушения цикла	0,0001	0,0001	1,0000	0,1323
1,5-2 лет нарушения цикла	0,0486	0,8919	0,0707	0,0171

Таблица 2- Оценка статистической значимости снижения уровня ЛГ в различные сроки послеоперационного периода в зависимости от длительности нарушений менструального цикла, предшествующих хирургическому этапу комплексного лечения

ЛГ	до операции/ через 1 мес	до операции/ через 3 мес	до операции/ через 6 мес	до операции/ через 12 мес
сохр. менструальный цикл	0,8142	0,6117	0,0017	0,5214
до 1,5 лет нарушения цикла	0,0002	0,2389	0,8880	0,0294
1,5-2 лет нарушения цикла	0,1109	1,0000	0,0571	0,0030

Таблица 3- Оценка статистической значимости снижения уровня эстрадиола в различные сроки послеоперационного периода в зависимости от длительности нарушений менструального цикла, предшествующих хирургическому этапу комплексного лечения

E2	до операции/через 3-5 дней	до операции/ через 1 мес	до операции/ через 3 мес	до операции/ через 6 мес	до операции/ через 12 мес
сохр. менструальный цикл	0,0030	0,9361	0,7462	0,6240	0,2816
до 1,5 лет нарушения цикла	0,0001	0,0170	0,0032	0,0002	0,0021
1,5-2 лет нарушения цикла	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

В послеоперационном периоде была проведена оценка общего самочувствия пациенток. С целью объективизации и статистического анализа были сопоставлены результаты анкетирования пациенток до и после оперативного лечения с выявлением статистически значимых доменов. Учитывая состояние 100% пациенток на фоне ЗГТ (эстрадиола валерат 2 мг + дидрогестерон 10 мг) до и после операции был использован валидированный опросник удовлетворенности лечением симптомов менопаузы (MS-TSQ) (Таблица 4).

В таблице 4 представлены данные, полученные в ходе заполнения пациентками опросника MS-TSQ. В ответах на вопросы анкеты MS-TSQ отражены оценочные значения отдельно по каждому компоненту удовлетворенности лечением. Значения, которые были занесены в таблицу, представлены как общий процент пациенток группы исследования, ответивших на вопросы анкеты «очень удовлетворена» и «удовлетворена».

Таблица 4 - Результаты опроса пациенток MS-TSQ до и после операции, n=89

Симптомы	До операции (на фоне ЗГТ) n=89		После операции (на фоне ЗГТ) n=89		p
	Число	Процент	Число	Процент	
Приливы в течение дня	79	88,7%	80	89,8%	0,243
Приливы в течение ночи	77	86,5%	80	89,8%	0,543
Качество сна	76	85,3%	79	88,7%	0,203
Психоэмоциональная сфера	19	21,7%	36	40,3%	0,028
Интерес в интимной жизни	14	15,8%	27	30,8%	0,023
Способность к концентрации внимания	25	28,3%	34	38,5%	0,128
Генитоуринарные расстройства	73	81,9%	77	86,5%	0,125
Оценка качества жизни в целом	31	35,0%	53	59,6%	0,034

Общую удовлетворённость качеством жизни в целом после оперативного лечения по данным анкетирования выразили более половины участниц исследования: 59,6% пациенток в сравнении с 35,0% до лечения ($p=0,034$). Статистически значимая разница в удовлетворённости лечением до и после операции была также получена в домене влияния препарата на интерес в интимной жизни ($p=0,023$) и психоэмоциональную сферу ($p=0,028$).

60-ти пациенткам в послеоперационном периоде была проведена стимуляция функции яичников при визуализации антральных фолликулов по данным ультразвукового исследования в сочетании со снижением уровня ФСГ до 15 МЕ/л и менее. Гонадотропная стимуляция функции яичников длительностью не более 10-12 дней, проводилась с использованием средних суточных доз гонадотропинов не более 225МЕ.

У 49 пациенток отмечен фолликулярный рост на фоне стимуляции функции яичников, при этом у 40 из них получены ооциты, 38 выполнен перенос эмбрионов в полость матки. В результате исследования к настоящему моменту достижение беременности отмечено у 22 пациенток (23 беременности), из них у 16 с использованием собственных ооцитов, при этом у 3-х из них беременность наступила самопроизвольно (у одной из пациенток дважды). 8 беременностей завершились живорождением 9-ю здоровыми детьми. Частота ранних

репродуктивных потерь беременности от числа наступивших- 18,75% (n=3) (Рисунок 12).

Все пациентки были родоразрешены в условиях Центра. Оценка состояния новорожденных по шкале Апгар составляла от 7 до 9 баллов. Послеродовый период протекал без осложнений. 6 из 8 женщин находились в периоде лактации от 3 месяцев до 1 года. Общее самочувствие женщин, несмотря на отсутствие приема ЗГТ в связи с грудным вскармливанием было удовлетворительным. У 4 из 8 пациенток отмечено спонтанное восстановление менструаций на фоне лактации. Проводится динамическая оценка состояния здоровья женщин и их детей с периодичностью 1 раз в 3 месяца в условиях Центра.

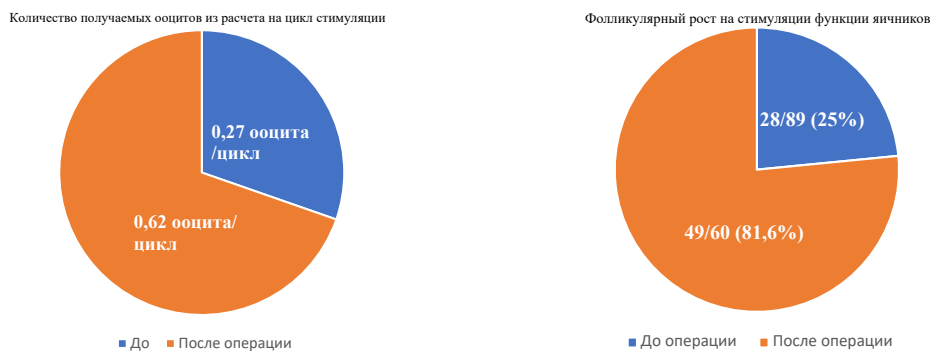


Рисунок 12 - Результативность стимуляции функции яичников у пациенток до и после проводимого комплексного лечения.

На основании ретроспективного сравнительного анализа разработаны собственные критерии отбора пациенток для проведения данного вмешательства на основании клинико-лабораторных показателей, ультразвуковой фолликулометрии, данных интраоперационной морфометрической визуализации, верифицированные при гистологическом и иммуногистохимическом исследованиях. (Таблица 5,6).

Таблица 5- Определение интраоперационных предикторов эффективности комплексного лечения (непараметрический критерий Манна-Уитни).

	Длина более 1,8 см	Соотношение длины и ширины яичника более чем 3/2	Отсутствие каменистой плотности ткани при инструментальной пальпации	Отсутствие четкой дифференцировки коркового и мозгового слоя яичника	Плотная структура мозгового слоя	Наличие стигм функциональной активности различной степени давности
Ответ на стимуляцию функции яичников						
есть (n=49)	32 (65%)	0 (0%)	40 (82%)	37 (76%)	35 (71%)	3 (6%)
нет (n=11+29)	4 (10%)	2 (5%)	4 (10%)	5 (11%)	6 (15%)	0 (0%)
p	0,0351		0,0014	0,0034	0,0087	

Таблица 6- Определение клинико-лабораторных критериев для проведения хирургического этапа комплексного лечения (ранговые корреляции Спирмена).

Клинико-лабораторные критерии	Ответ на стимуляцию функции яичников после операции	Наступление беременности
	ФСГ не более 25 мМЕ/мл	0,589286
ФСГ/ЛГ 2/1	0,769470	0,313006
продолжительность нарушений цикла не более 2 лет	0,687826	0,445195
объем яичников более 2,5 см ³	0,552291	0,445195
возраст менее 42 лет	0,613608	0,362466
единичные антральные фолликулы (по данным УЗИ)	0,729542	0,425604

Для проведения гистологического исследования были отобраны 178 образцов коркового слоя яичников и 89 образцов ткани эндометрия пациенток со сниженным овариальным резервом.

Проведена морфологическая оценка фолликулярного аппарата яичников у всех пациенток, включенных в исследование. Выявлены следующие закономерности (Таблица 7):

Наличие фолликулярного аппарата и/или стигм функциональной активности при морфологическом исследовании значимо коррелирует с результативностью стимуляции функции яичников (Рисунок 13).

Наличие поверхностного эпителия яичников на большей площади поверхности исследуемого образца ткани яичника свидетельствует о наиболее длительном течении заболевания и коррелирует с продолжительностью предшествующего лечения (Рисунок 14).

Выраженность сосудистого компонента коркового слоя овариальной ткани обратно коррелирует с ответом на стимуляцию функции яичников.

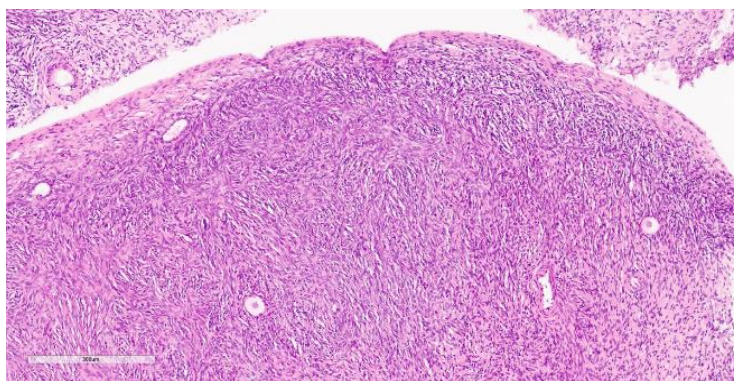


Рисунок 13- Первичные и примордиальные фолликулы, окраска гематоксилин-эозин, х 100.

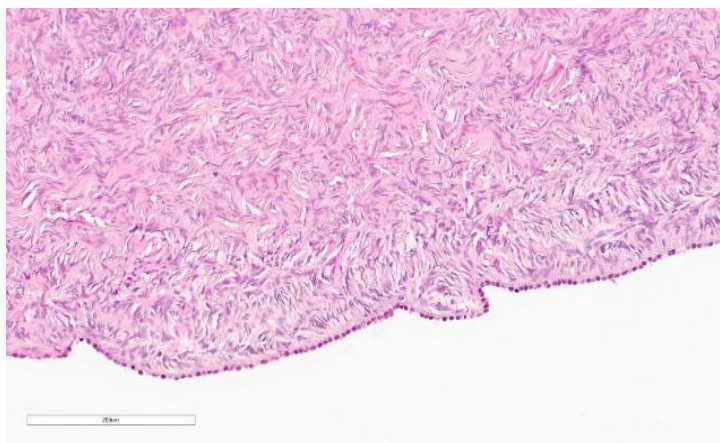


Рисунок 14 - Поверхностный эпителий яичника, окраска гематоксилин-эозин, х 200.

Таблица 7- Определение корреляционных взаимосвязей между параметрами гистологического исследования и ответом на стимуляцию функции яичников после операции (коэффициент корреляции)

Коэффициент корреляции между параметрами гистологического исследования и ответом на стимуляцию функции яичников после операции	
Примордиальные и первичные фолликулы	0,602333
Кистозно-атрезирующие фолликулы	0,137984
Фиброзные тела	0,390683
Наличие поверхностного эпителия яичников	-0,214333
Выраженность сосудистого компонента	-0,519431

Иммуногистохимическая оценка тканей яичников и эндометрия проведена у 14 пациенток (28 образцов тканей яичников и 14 образцов тканей эндометрия), включенных в исследование.

Определен уровень экспрессии белков, участвующих в передаче сигнала по Hippo-сигнальному пути (YAP, MST-1, LATS-1) и PTEN в строме, железистом компоненте эндометрия, и в ткани яичников (Рисунок 15).

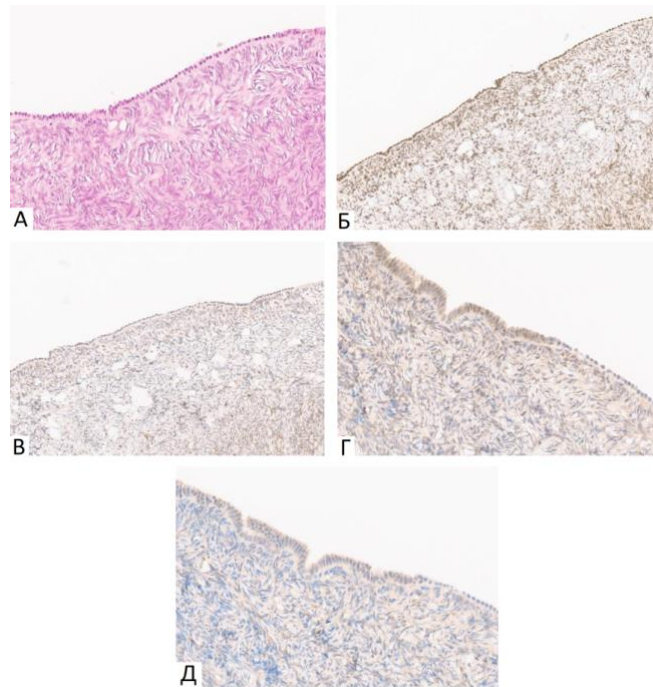


Рисунок 15 - Экспрессия маркеров PI3K / Akt / mTOR и Hippo-сигнальных путей в корковом слое яичника с сохраненным поверхностным эпителием и отсутствием стигм фолликулогенеза, А. Окраска гематоксилином и эозином, х 200. Б. Экспрессия LATS1, х 200, В. Экспрессия PTEN, х 200, Г. Экспрессия MST1, х 200, Д. Экспрессия YAP, х 200

При соотнесении уровня экспрессии тканевых маркеров с данными представленными в Human Protein Atlas установлены статистически значимые отличия по степени экспрессии белков-компонентов Hippo-сигнального пути. Средние значения уровней экспрессии в исследуемой группе (среднее значение, приведенное в атласе экспрессии белков, уровень значимости, p): LATS-1

45,51±13,35 (9,3±1,7 p=0,0001); MST-1 23,61±7,94 (12,5±9,1 p=0,0001); YAP 23,60±6,44 (53,1±12,7 p=0,0001); PTEN 24,9±8,26 (28,0±9,7 p=0,11)

Уровень экспрессии всех перечисленных маркеров был достоверно выше в железистом компоненте эндометрия, за исключением PTEN, уровень экспрессии которого был достоверно выше в строме эндометрия (Рисунок 16 А,Б,В,Г).

Уровень экспрессии YAP, PTEN, LATS-1 и MST-1 в образцах эндометрия пациенток со сниженным овариальным резервом был значительно выше по сравнению с экспрессией в образцах эндометрия женщин с регулярным менструальным циклом.

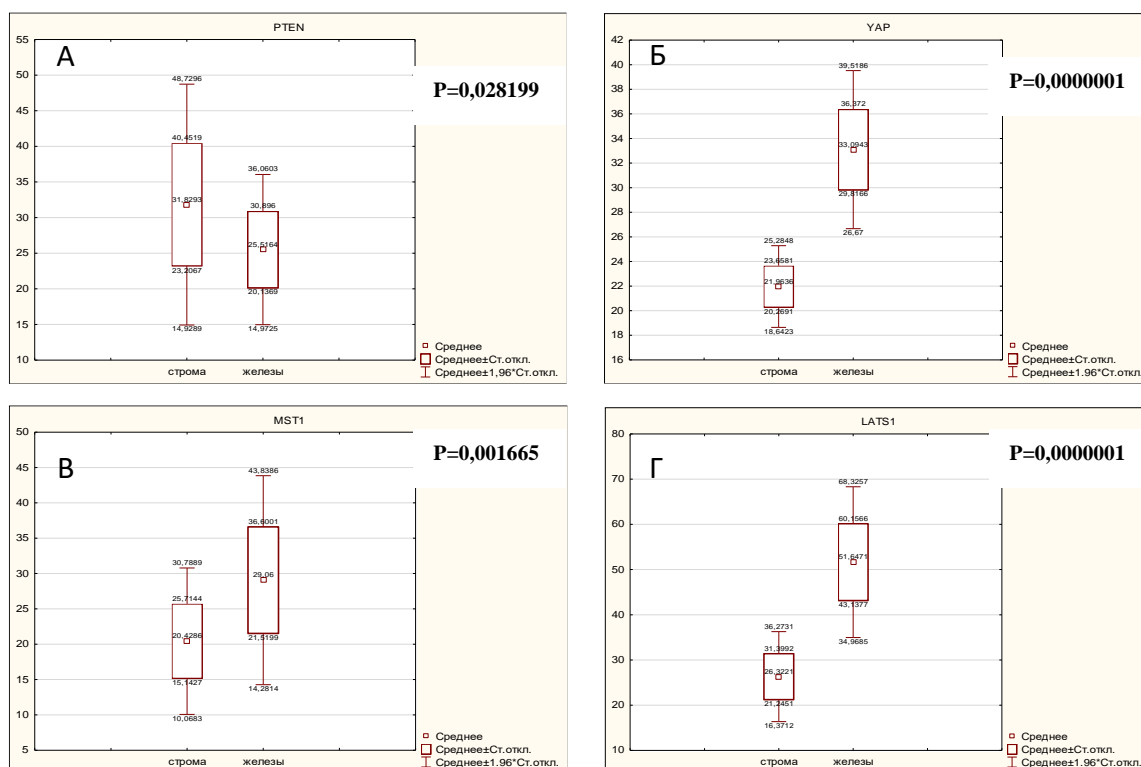


Рисунок 16 -А,Б,В,Г. Уровни экспрессии PTEN, YAP, MST-1, LATS-1 в строме и железистом компонентах эндометрия пациенток, включенных в исследование

Выводы

1. Факторами риска снижения овариального резерва являются: наличие ранней менопаузы в семейном анамнезе, перенесенные заболевания, включая воздействие стрессовых факторов, хронические заболевания щитовидной железы,

преимущественно аутоиммунного генеза, связанные со снижением ее функции, вредные привычки (курение), наряду с которыми выявлено нарушение функционирования внутриклеточных сигнальных путей, прежде всего PTEN-зависимого Hippo-сигнального пути.

2. Комплексный подход к лечению больных с крайне низким овариальным резервом, включающий одноэтапный хирургический метод активации функции яичников является эффективным методом лечения бесплодия, способствуя улучшению общего самочувствия, снижению уровня гонадотропинов, в том числе с достижением референсных значений у пациенток с оккультной и биохимической ПНЯ, увеличению среднего количества антральных фолликулов на яичник во всех группах пациенток, а также увеличению числа получаемых ооцитов в 2,3 раза с частотой наступления беременности из расчета на цикл стимуляции равной 26,6%.

3. Положительными прогностическими факторами эффективности комплексного лечения, определенными на основании интраоперационной морфометрической визуализации яичниковой ткани являются следующие параметры: длина более 1,8 см, соотношение длины и ширины яичника менее чем $3/2$, отсутствие каменистой плотности ткани при инструментальной пальпации, отсутствие четкой дифференцировки коркового и мозгового слоя яичника, плотная структура мозгового слоя, наличие стигм функциональной активности различной степени давности.

4. Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников является наиболее приемлемым в сравнении с предложенными ранее двухэтапными техниками, отсутствие фармакологической активации нивелирует возможные онкологические риски, а также обеспечивает значимо меньшую стоимость операции. Ипсилатеральная реимплантация в толщу яичника сохраняет архитектуру органа, и в сочетании с гистологической верификацией диагноза также позволяет свести к минимуму риски возникновения пролиферативных процессов.

5. Клинико-морфологическими параллелями между гистологической структурой яичниковой ткани и результативностью стимуляции функции яичников у пациенток со сниженным овариальным резервом являются: наличие фолликулярного аппарата и/или стигм функциональной активности при морфологическом исследовании; наличие поверхностного эпителия яичников на большей площади поверхности исследуемого образца ткани яичника; выраженность сосудистого компонента коркового слоя овариальной ткани.

6. У пациенток с крайне низким овариальным резервом отмечено нарушение функционирования внутриклеточных сигнальных путей (прежде всего YAP и PTEN-зависимых), которое происходит как в овариальной ткани, так и в эндометрии. Представленные данные экспрессии иммуногистохимических тканевых маркеров демонстрируют биологические различия ткани эндометрия, находящейся в ремоделированном состоянии на фоне приема гормональной терапии и слизистой полости матки у пациенток, имеющих нормальный менструальный цикл.

Практические рекомендации

1. Для повышения результативности лечения женщин с бесплодием и сниженным овариальным резервом необходима комплексная оценка причин неэффективности предшествующей терапии.

2. Целесообразным является своевременное консультирование пациенток совместно с хирургами для решения вопроса о возможности проведения оперативного лечения: диагностической лапаро- и гистероскопии, установления иных причин бесплодия, возможного выполнения одноэтапного хирургического метода активации функции яичников, что позволит предотвратить развитие необратимых изменений в яичниковой ткани и соответственно повысить эффективность лечения.

3. Целесообразно проводить комплексное лечение бесплодия у пациенток с крайне низким овариальным резервом с использованием одноэтапного

хирургического метода активации функции яичников при наличии условий и показаний (патент на изобретение № 2748246).

4. Рекомендовано проведение одноэтапного хирургического метода активации функции яичников у пациенток с бесплодием, ассоциированным с крайне низким овариальным резервом и отсутствие эффекта от проводимого ранее лечения при следующих клинико-лабораторных данных: возраст до 42 лет; нарушение менструального цикла по типу олиго-аменореи длительностью не более 2-х лет; уровень ФСГ на фоне приема заместительной гормональной терапии не более 25 мМЕ/мл, соотношение ФСГ/ЛГ 2/1 и более; Наличие единичных антральных фолликулов по данным ультразвуковой фолликулометрии в сочетании с объемом яичников не менее 2,5 см³.

5. Целесообразна оценка состояния полости матки путем проведения гистероскопии с целью исключения внутриматочной патологии, биопсии эндометрия с последующим гистологическим исследованием, при отсутствии эффекта от проводимого ранее лечения бесплодия.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Адамян Л.В., Степанян А.А., Дементьева В.О. Роль минимально инвазивной хирургии в сохранении репродуктивного потенциала у пациенток с преждевременной недостаточностью яичников (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2018;24(5):72-76. <https://doi.org/10.17116/repro20182405172>
2. Адамян Л.В., Дементьева В.О., Асатурова А.В., Назаренко Т.А. Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников (первое клиническое наблюдение). Проблемы репродукции. 2019;25(1):97-99. <https://doi.org/10.17116/repro20192501197>
3. Адамян Л.В., Дементьева В.О., Асатурова А.В. Новое в репродуктивной хирургии: одноэтапный хирургический метод активации функции яичников. Акушерство и гинекология. 2019; 3: 147-51. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.3.147-151>
4. Адамян Л.В., Дементьева В.О., Смольникова В.Ю., Асатурова А.В. Новые возможности хирургии в восстановлении утраченных функций яичников при преждевременной недостаточности яичников у женщин репродуктивного возраста // Доктор.Ру. 2019. № 11 (166). С. 44–49. DOI: 10.31550/1727-2378-2019-166-11-44-49
5. Адамян Л.В., Дементьева В.О., Асатурова А.В., Степанян А.А., Смольникова В.Ю., Аракелян А.С., Гус А.И., Николаева А.В. Впервые в России: роды двойней у пациентки с преждевременной недостаточностью яичников после выполнения одноэтапного хирургического метода активации функции яичников. Акушерство и гинекология. 2020; 10: 42-47 <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.10.42-47>
6. Адамян Л.В., Дементьева В.О., Асатурова А.В., Степанян А.А., Смольникова В.Ю., Аракелян А.С., Гус А.И. Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников у пациенток с преждевременной недостаточностью яичников и «бедным» овариальным ответом. Проблемы репродукции. 2020;26(5):58-64. <https://doi.org/10.17116/repro20202605158>

7. Адамян Л.В., Дементьева В.О., Асатунова А.В., Аракелян А.С., Смольникова В.Ю. Морфофункциональная оценка состояния фолликулярного аппарата яичников у пациенток со сниженным овариальным резервом. Проблемы репродукции. 2020;26(4):30-36. <https://doi.org/10.17116/repro20202604130>
8. Адамян Л.В., Дементьева В.О., Степанян А.А., Асатунова А.В., Аракелян А.С., Смольникова В.Ю. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика тканей яичников и эндометрия у пациенток со сниженным овариальным резервом. Проблемы репродукции. 2021;27(4):26-31. <https://doi.org/10.17116/repro20212704126>
9. Адамян Л.В., Дементьева В.О., Степанян А.А., Асатунова А.В., Смольникова В.Ю. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика состояния эндометрия у пациенток со сниженным овариальным резервом. Проблемы репродукции. 2021;27(3):58-64. <https://doi.org/10.17116/repro20212703158>
10. Л.В. Адамян, В.Ю. Смольникова, А.В. Асатунова, В.О. Дементьева. Патент на изобретение «Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников для лечения преждевременной недостаточности яичников и восстановления овариальной функции» RU2748246C1
11. Адамян Л.В., Дементьева В.О., Асатунова А.В. Комплексное лечение преждевременной недостаточности яичников с использованием хирургических технологий. Критерии отбора пациенток: собственный опыт на основании ведения более 100 больных. //Проблемы репродукции. 2022;28(4):106-114. <https://doi.org/10.17116/repro202228041106>
12. Дементьева В.О., Адамян Л.В., Смольникова В.Ю., Тонян Н.М. Сниженный овариальный резерв и преждевременная недостаточность яичников: современный взгляд на проблему диагностики, комплексного лечения и восстановления репродуктивной функции: собственные данные. //Проблемы репродукции. 2022;28(4): [128-136](https://doi.org/10.17116/repro202228041128). <https://doi.org/10.17116/repro202228041128>