

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И  
ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**ДЕМЕНТЬЕВА ВИКТОРИЯ ОЛЕГОВНА**

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

3.1.4. Акушерство и гинекология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители: академик  
РАН, доктор медицинский наук, профессор

Л.В. Адамян

доктор медицинских наук

А.В. Асатурова

Москва 2022

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1 Преждевременная недостаточность яичников и «бедный» овариальный ответ на стимуляцию функции яичников как медицинская и социальная проблема.....	17
1.2    Определение и основные причины преждевременной недостаточности яичников.....	18
1.2.1 Роль некодирующих малых РНК в генезе снижения овариального резерва.....	27
1.2.2 Негенетические причины ПНЯ.....	29
1.2.3 Роль инфекционных заболеваний в анамнезе в генезе снижения овариального резерва.....	38
1.3    Достижение беременности при ПНЯ.....	40
1.4    Адьювантная терапия в комплексном лечении ПНЯ.....	45
1.5    Результативность лечения бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом и аномальными формами кариотипа.....	49
1.6    Оценка эффективности методов верификации овариального резерва.....	49
1.7    Современные методы ультразвуковой диагностики в оценке овариального резерва у пациенток со сниженным овариальным резервом.....	52
1.8    Роль гистологической оценки состояния фолликулярного аппарата яичников при сниженном овариальном резерве с целью оптимизации лечения бесплодия.....	55
1.9    Применение хирургических технологий в лечении бесплодия при сниженном овариальном резерве.....	57

ГЛАВА 2. Материалы и методы обследования пациенток с крайне низким овариальным резервом.....	64
2.1. Общая характеристика исследования.....	64
2.2. Дизайн исследования.....	66
2.3. Объем выборки исследования.....	68
2.4. Клинические и лабораторные методы исследования.....	68
2.5. Инструментальные методы исследования.....	70
2.6 Хирургический этап лечения.....	71
2.7 Специальные методы исследования материала, полученного в ходе оперативного вмешательства.....	72
2.8 Проведение программы ЭКО в рамках комплексного лечения бесплодия.....	73
2.9 Методы статистического анализа.....	76
ГЛАВА 3. Общая характеристика пациенток со сниженным овариальным резервом (Результаты собственных исследований).....	77
ГЛАВА 4. Предоперационная подготовка и выполнение хирургического этапа лечения.....	85
4.1 Предоперационное гормональное лечение.....	85
4.2 Выполнение хирургического этапа лечения.....	86
4.3 Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников.....	87
4.4 Ход операции.....	87
4.4.1 Особенности структуры яичников у пациенток с крайне низким овариальным резервом (данные интраоперационной визуализации) .....	89
4.4.2 Определение зоны биопсии яичниковой ткани.....	91
4.5 Морфометрические особенности яичниковой ткани у пациенток с низким числом CGG- повторов в гене FMR1.....	95

ГЛАВА 5. Состояние эндометрия у пациенток со сниженным овариальным резервом: гистероскопическая картина.....	98
ГЛАВА 6. Результативность комплексного лечения бесплодия у пациенток с крайне низким овариальным резервом .....	100
6.1 Динамика показателей гормонального профиля у пациенток с крайне низким овариальным резервом.....	100
6.2 Ультразвуковое исследование органов малого таза у пациенток с крайне низким овариальным резервом .....	106
ГЛАВА 7. Стимуляция функции яичников у пациенток с крайне низким овариальным резервом.....	109
ГЛАВА 8. Гистологическое исследование образцов биоптатов яичниковой ткани и эндометрия, полученных в ходе выполнения хирургического этапа лечения.....	118
8.1 Результаты патоморфологического исследования яичниковой ткани у пациенток со сниженным овариальным резервом.....	118
8.2 Результаты патоморфологического исследования эндометрия у пациенток со сниженным овариальным резервом.....	125
8.3 Клинико-морфологические параллели между структурой тканей яичников и эндометрия у пациенток с крайне низким овариальным резервом (данные гистологического и иммуногистохимического исследований).....	127
ГЛАВА 9. Обсуждение полученных результатов.....	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	153
ВЫВОДЫ.....	157
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	159
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	160
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	162

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Эффективность лечения бесплодия у пациенток различных групп в настоящее время обусловлено широким внедрением методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) по всему миру. Около 2,5% новорожденных в странах Европы по литературным данным рождается в связи с проведением программ ВРТ [136]. Одним из основных этапов проведения программы ЭКО является стимуляция функции яичников, цель которой состоит в получении оптимального количества зрелых ооцитов с целью возможной компенсации ошибок эмбриологического этапа, селекции и переноса эмбрионов лучшего качества [83]. Существует необходимость комплексного подхода к лечению бесплодия независимо от возраста, что обусловлено частотой наступления беременности из расчета на перенос эмбриона не превышающей 30-40%, независимо от прогрессивного развития новых технологий [156]. Одним из факторов, значительно снижающим результативность программы ЭКО является «бедный овариальный ответ» на стимуляцию функции яичников, определяемого с частотой от 9 до 24% случаев, что ведет к снижению количества полученных ооцитов, отмене циклов стимуляции функции яичников, и таким образом, к значительному уменьшению частоты наступления беременности [22, 56, 184, 49]. Диагностическими критериями «бедного» ответа на стимуляцию функции яичников, впервые представленными в 2011 г. Европейском Обществом Репродукции Человека и Эмбриологии (ESHRE) являются: снижение овариального резерва (число антральных фолликулов  $< 5-7$  и/или концентрация антимюллера гормона (АМГ) в сыворотке крови  $< 0,5-1,1$  нг/мл); наличие факторов риска снижения резерва яичниковой ткани; отмеченный «бедный» ответ на стимуляцию функции яичников в анамнезе. Для постановки диагноза «бедный» овариальный ответ необходимо наличие

как минимум двух из трех представленных критериев или указание на два и более эпизода бедного ответа на стимуляцию функции яичников в анамнезе [140]. Несмотря на определение достоверных факторов риска, к которым относятся ряд клинико-анамнестических данных, а также лабораторно-инструментальных показателей таких как: возраст женщины старше 37 лет, высокий ИМТ, преждевременная недостаточность яичников, воспалительные заболевания органов малого таза, спаечный процесс в малом тазу, а также влияние вредных факторов окружающей среды хирургические вмешательства на яичниках в анамнезе, гонадотоксическое лечение, наличие различных форм эндометриоза и др. этиология данного состояния остается неизвестной [151].

Единственным вариантом достижения беременности у пациенток со значительным снижением овариального резерва, имеющим доказанную эффективность и обоснованность, до сегодняшнего дня являлась программа ЭКО с использованием донорских ооцитов, что связано результативностью программ ВРТ у пациенток с ПНЯ с использованием собственных ооцитов равной до 6%. Несмотря на это многие женщины по различным соображениям (этическим, религиозным и пр.) настаивают на использовании собственного генетического материала [67].

Таким образом, пациентки с крайне низким овариальным резервом в сочетании с нереализованной репродуктивной функцией представляют особую группу, требующую персонифицированного, комплексного подхода к ведению.

В настоящее время решение задачи реализации репродуктивной функции у пациенток со значительным снижением овариального резерва невозможно представить без использование современных методов репродуктивной хирургии, уникальные возможности которой представлены в ряде научных исследований.

В ряде опубликованных работ, в которых рассматривается вопрос активации *in vitro* резидуальных фолликулов представлен механизм

индукции изменений в системе сигнальных путей, который лежит в основе альтернативных методов лечения бесплодия у пациенток с преждевременной недостаточностью яичников (ПНЯ) в качестве альтернативы программам донации ооцитов [18].

Активация пула примордиальных фолликулов происходит за счет передачи сигнала по фосфоинозитид-3-киназному пути (PI3K-Akt- Foxo3), а с вовлечением гомолога фосфатазы и тензина, делегированного на хромосоме 10 (PTEN) происходит блок функционирования данного сигнального пути.

Вышесказанное подтверждено визуализацией антральных фолликулов, содержащих зрелые ооциты на стадии метафазы II с экспансией кумулюсных клеток, что определяется при выполнении гистологического исследования фрагмента ткани яичника, обработанной ингибитором PTEN через 36 ч после введения препарата хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) [18].

Апробация метода активации фолликулярного роста брала начало в экспериментальных исследованиях, постепенно показав эффективность при проведении клинических исследований. Первоначально методика заключалась в проведении оперативного вмешательства, в ходе которого производилось удаление одного из яичников, далее выполнялась криоконсервация извлеченной ткани, ее фрагментация и активацией *in vitro* с добавлением в среду культивирования ингибитора PTEN и активатора PI3K-сигнальных путей, длящаяся в течение двух дней.

Далее выполнялась трансплантация фармакологически обработанной размороженной ткани под серозную оболочку одной из фаллопиевых труб ипсилатерально. Проведение прикладных фундаментальных исследований позволило установить, что процедура фрагментации овариальной ткани изолированного приводит к нарушению передачи сигнала по Hippo пути, [97] с последующим ростом фолликулов без какого-либо лекарственного воздействия. Таким образом, объем операции был сокращен и ограничивался биопсией коркового слоя яичника, а вышеуказанная методика стала использоваться в лечении бесплодия у пациентов с «бедным» ответом на

стимуляцию функции яичников [79]. Первичные фолликулы находятся на расстоянии 1-2 мм от поверхности яичника, что определяет объема коркового слоя, достаточный для биопсии [54].

Таким образом, учитывая вышесказанное является актуальным проведение исследования по оценке роли использования новых хирургических технологий в комплексном лечении бесплодия у пациенток с крайне низким овариальным резервом или при отсутствии эмбрионов пригодных для переноса в предшествующих попытках 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 пациентов 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-анамнестических 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.

### **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 клиничко-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 см<sup>3</sup>, 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).

### **Научная новизна исследования**

Разработана концепция ведения пациенток со сниженным овариальным резервом, включающая современные методы клинично-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.

С целью повышения эффективности лечения, направленного на восстановление репродуктивной функции, предложены подходы к стимуляции функции яичников в зависимости от возраста, клинико-гормонального статуса, параметров ультразвуковой визуализации, а также данных, полученных в ходе выполнения оперативного вмешательства.

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 пациентов 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.

### **Методология и методы исследования.**

Методология исследования включала оценку эффективности комплексного подхода к лечению бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом, подразумевающего современные методы диагностики, визуализации, хирургического лечения и стимуляции функции яичников в послеоперационном периоде в программах ВРТ. Выполнялись морфологическое и иммуногистохимическое исследование операционного материала. Исследование выполнено с соблюдением принципов доказательной медицины. Произведен отбор больных и статистическая обработка результатов. Проведена проспективная оценка отдаленных результатов хирургического и восстановительного лечения, включая методы ВРТ.

### **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, а именно пунктам 3, 4 и 5 паспорта специальности акушерство и гинекология.

### **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 результаты исследования, представляющие как научный, так и безусловный практический интерес 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 качестве демонстрационного и информационного материала практических курсов для студентов, ординаторов, врачей, а также семинаров и лекций.

## **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.

# **Глава 1. Современные представления о лечении бесплодия при сниженном овариальном резерве и возможностях активации функции яичников с использованием хирургических технологий (Обзор литературы)**

## **1.1 Преждевременная недостаточность яичников и «бедный» овариальный ответ на стимуляцию функции яичников как медицинская и социальная проблема.**

Каждая 6-я супружеская пара в нашей стране по опубликованным статистическим данным сталкивается с проблемой отсутствия наступления беременности, которая несмотря на возможности использования различных методов вспомогательных репродуктивных технологий является до конца нерешенной [3]. Существенным препятствием в наступлении беременности, в особенности в программах с использованием собственного генетического материала является сниженный овариальный резерв, представляющий основную причину или сочетанный, наряду с другими, фактор женского бесплодия, что обусловлено снижением результативности стимуляции функции яичников, даже при использовании высоких доз препаратов в рамках гонадотропной стимуляции [67].

## **1.2 Определение и основные причины развития преждевременной недостаточности яичников**

Угасание функции яичников у женщин до 40-летнего возраста, у которых ранее наблюдались физиологические характеристики менструального цикла, которое сопровождается крайней степенью снижения овариального резерва, входит в понятие преждевременной недостаточности яичников. Верификация диагноза происходит на основании двукратного определения повышенного

ФСГ ( $> 25$  МЕ/л) с интервалом в 4 недели [34]. Распространенность данной нозологии варьирует в пределах от 1 до 13% [148].

Стратификация различных форм преждевременной недостаточности яичников- классической, оккультной и биохимической явилась принципиальным моментом, указывающим на необходимость реализации репродуктивного потенциала до полной клинической манифестации заболевания [138]. Бесплодие неизвестной этиологии в сочетании с регулярным менструальным циклом при определении физиологического базального уровня ФСГ представляет собой реализацию оккультной формы ПНЯ. Снижение овариальной функции при незначительном повышении по отношению к базальному уровню ФСГ у пациенток с отсутствием наступления беременности неясного генеза при регулярном менструальном цикле происходит на так называемой биохимической стадии. Манифестная форма ПНЯ характеризуется развернутой клинической симптоматикой, ассоциированной со снижением сывороточных концентраций женских половых гормонов в сочетании с бесплодием ановуляторного происхождения [202]. Фолликулярный рост представленный менее чем 3-мя фолликулами, индуцируемый использованием высоких доз гонадотропинов составляет общепринятое понятие- «бедный» ответ на стимуляцию функции яичников, который опосредует до половины частоты отмены всех циклов ЭКО [140].

ПНЯ наблюдается у 1 % женщин, не достигших 40-летнего возраста. Исследование SWAN (многоцентровое, многонациональное, когортное исследование женщин в периоде менопаузального перехода) продемонстрировало распространенность ПНЯ среди женщин равную 1,1%; Представлено следующее распределение частоты встречаемости в зависимости от национальности: 1% европеоидов, 1,4% афроамериканок, 1,4% латиноамериканок, 0,5% китайок и 0,1% японок. Разница в частоте встречаемости среди этих этнических групп была статистически значимой [44].

Наблюдается более высокая распространенность ПНЯ в странах со средним и низким уровнем социального развития [99]. Частота составляет 4–8% у женщин, страдающих вторичной аменореей и 10–28% при первичной аменорее [19]. Расчетный коэффициент заболеваемости в зависимости от возраста представлен следующими соотношениями: 1: 100 случаев в возрасте 40 лет, 1: 250 случаев в возрасте 35 лет, 1: 1000 случаев к 30 годам и 1:10 000 случаев в возрасте 18–25 лет [160].

Преждевременная недостаточность яичников обычно является спонтанной или идиопатической, поскольку ее этиология в основном остается не определенной [160]. Было высказано предположение, что ПНЯ опосредуется рядом механизмов, такими как раннее истощение фолликулярного пула, остановка дифференцировки фолликулов и др. [155].

Выявленные причины ПНЯ, потенциально участвующие в этих механизмах, могут быть сгруппированы в две категории: генетические и негенетические. Негенетические причины включают аутоиммунные и метаболические нарушения, инфекции, факторы окружающей среды, ятрогенное воздействие и пр. [127, 160, 161].

Исследованы маркеры преждевременной менопаузы и распространенность аутоиммунной преждевременной недостаточности яичников в когорте, включающей 6870 женщин в постменопаузе, которые были рандомизированы в соответствии с возрастом наступления менопаузы, ее причинами, выявленными по данным анкетирования. Для идентификации аутоиммунного статуса использовали специфические иммунопреципитационные тесты для определения стероидогенных аутоантител против 21-гидроксилазы, фермента расщепления боковой цепи (анти-SCC), 17альфа-гидроксилазы, а также богатого лейцин-повторяющимся доменом белка и антинейтрофильные цитоплазматические антитела (NACHT).

Преждевременная менопауза выявлена у 2,8% женщин, у которых выше частота бесплодия (37,4% против 19,7%), ожирения (28,7% против

21,4%), остеопороза (17,1% против 11,6%), частота использования заместительной гормональной терапии (59,1% против 36,9%) ( $P < 0,05$ ) по сравнению с женщинами с менопаузой, наступившей в возрасте  $\geq 40$  лет. Ятрогенные причины были обнаружены у 91 (47%) женщины, а экстрагонадные причины — у 27 (14%) пациенток, в то время как у 77 (39%) участниц исследования выявлена ПНЯ неясной этиологии, таким образом распространенность идиопатической ПНЯ составила 1,1 %. После проведения полноценного статистического анализа установлено, что нуллипарность была единственной переменной, значимо связанной с ПНЯ (отношение шансов 2,46; 95% ДИ 1,63–3,42). Аутоиммунитет объясняет 4,5% случаев идиопатической ПНЯ, что подтверждается положительным уровнем стероидогенных аутоантител [157].

Целью исследования **Grisotto G и соавторов** была оценка связи особенностей питания, в частности влияния вегетарианства с ранним началом менопаузы. Проведено проспективное исследование со средним периодом наблюдения 20 лет среди женщин в пременопаузе, проживающих в США. Участники NHS ( $n = 121\ 701$ ) и NHSII ( $n = 116\ 429$ ) были включены с 1984 г. (средний возраст [стандартное отклонение]; 44,9 [4,3]) и 1991 г. (средний возраст [стандартное отклонение]; 36,4 [4,6]) соответственно. Особенности питания были изучены путем анкетирования, проводимого каждые 4 года.

Во время наблюдения у 715 и 2185 женщин была установлена ранняя менопауза в выборках NHS и NHSII соответственно. После поправки на возможные искажающие факторы не было отмечено связи между особенностями диеты и частотой ранней менопаузы ни в одной из групп в отдельности, ни при объединении результатов обеих групп, за исключением индекса «нездоровой растительной диеты» (частое потребление фруктовых соков, очищенных злаков, картофеля, напитков с высоким содержанием сахара, десертов), который был ассоциирован с более высоким риском ранней менопаузы ( $P = 0,04$ ) [27].

Большой интерес представляет влияние ПНЯ на показатели общей смертности. Период наблюдения в исследовании **Blümel JE и соавторов** составил 30 лет. Были проанализированы данные о 1119 женщинах. Средний возраст составил 47 лет (44-52 года). Исходная распространенность ПНЯ была равной 6,7 %. В конце наблюдения 34,7 % женщин с ПНЯ умерли в сравнении с 19,3 % женщин без данного заболевания ( $p < 0,001$ ). Причиной смерти большего числа женщин с ПНЯ явились сердечно-сосудистые заболевания (12,0 % против 5,1 %), тогда как не было существенной разницы в смертности от рака (6,7 % против 7,7 %). При анализе скорректированной модели Кокса ПНЯ явилась одним из основных факторов, ассоциированных со смертностью (отношение рисков [ОР] 1,60, 95 % ДИ: 1,03-2,47), после диабета (ОР 2,51, 95 % ДИ: 1,40-4,51) и артериальной гипертензии (ЧСС 1,75, 95% ДИ: 1,29-2,37). Несмотря на то, что частота встречаемости ПНЯ в общей популяции низкая, ее связь со смертностью представляется значимой, что требует дальнейшего изучения и разработки возможных методов воздействия [108].

Преждевременная недостаточность яичников оказывает значимое негативное влияние на общее самочувствие и качество жизни в целом. Целью исследования **Ates S и соавт.** была оценка распространенности нарушений сна, уровня тревожности, депрессии и общей астенизации у женщин с ПНЯ.

В исследование были включены 62 пациентки. В рамках анкетирования использованы Питтсбургский индекс качества сна, индекс тяжести бессонницы, шкала сонливости Эпворта, госпитальная шкала тревоги и депрессии и шкала выраженности усталости и стресса. Согласно данным многопараметрического логистического регрессионного анализа, наличие брака в анамнезе и ПНЯ были связаны с худшим качеством сна, а наличие большего количества детей при этом было ассоциировано с повышением уровня депрессии у всех обследуемых пациенток. Дополнительный анализ показал, что у замужних женщин с ПНЯ риск плохого качества сна был в 6,5 раз выше.

Таким образом, женщины с преждевременной недостаточностью яичников чаще страдают от плохого качества сна (что в особенности выражено у замужних пациенток), бессонницы и депрессии (в частности, у женщин с большим количеством детей), в сравнении с индивидуумами без данного заболевания [174].

Родственники первой степени родства примерно в 10–30% случаев идиопатической ПНЯ также имеют данное заболевание, что убедительно подтверждает его генетическую детерминированность [45].

Хромосомные аномалии, генетические полиморфизмы и моногенные нарушения являются доказанными причинами ПНЯ [203]. Аномалии X-хромосомы включают дупликации, делеции и транслокации, тогда как синдром Тернера представляет собой полную или частичную делецию одной из X-хромосом, что вызывает истощение фолликулярного пула еще до менархе [45]. Трисомия X-хромосомы, в особенности генотип 47XXX, связан с недостаточностью яичников в сочетании с гипогонадотропным состоянием [159].

Другим генетическим нарушением, приводящем к ПНЯ, является наличие повторов CGG (в диапазоне 55–199) в гене ломкой X хромосомы (FMR1), которое также ассоциировано с синдромом Мартина-Белла [45,143].

Нарушения фолликулогенеза, обусловленные наличием синдрома ломкой X-хромосомы связаны с изменением процессов митоза гранулезных клеток, что приводит к ускоренной атрезии фолликулов. Атрезия еще больше интенсифицирует процесс митотического деления и образования антральных фолликулов. Повышенная атрезия антральных фолликулов приводит к снижению выработки АМГ. Снижение уровня АМГ в свою очередь уменьшает ингибирование рекрутинга примордиальных фолликулов. Активация примордиальных фолликулов в конечном итоге, приводит к снижению овариального резерва и ранней менопаузе [168].

Риск развития ПНЯ у женщин, имеющих премутацию в гене FMR1 составляет от 13 до 26% [78].

Сообщается что средний возраст наступления менопаузы и манифестации ПНЯ среди носителей премутации составляет примерно на 5 лет раньше по сравнению с женщинами не имеющих данное хромосомное нарушение [28, 183,187].

Распространенность премутации FMR1 у пациенток с ПНЯ в Японии составляет 1,56%. Частота CGG повторов в гене FMR1 > 36 определялась значительно чаще у пациенток с ПНЯ, чем у здоровых женщин (клиническая значимость равная таковой при идентификации уровня премутации).

Исследование, проведенное в Китае, показало, что частота премутации в гене FMR1 относительно низкая (1,6%) у женщин, страдающих ПНЯ в связи с чем данное молекулярно-генетическое исследование рутинно не показано в данной популяции [179].

Гены гомеобокса (гены, определяющие процессы роста и дифференцировки в организме) яичников новорожденного (NOBOX) и фактора зародышевой линии альфа (FIGLA) являются ооцит-специфичными факторами транскрипции, вовлеченными в патогенез ПНЯ.

Мутации гена NOBOX вызывают апоптоз ооцитов после рождения, тогда как мутации FIGLA нарушают регуляцию генов, регулирующих структуру блестящей оболочки (zona pellucida), тем самым вызывая постнатальную потерю примордиальных фолликулов [192]. Другие нарушения, связанные с ПНЯ- это мутации, встречающиеся в локусе L2 «белка вилочной коробки» (фактор транскрипции, принадлежащий к суперсемейству FOX- FOXL2) [152], WT1 (белок опухоли Вильмса 1), гена, кодирующего белок стероидогенного фактора 1 (NR5A1) [128], влияющие на фолликулогенез, ассоциированы со снижением овариального резерва. Изменение экспрессии гена костного морфогенетического белка 15 (BMP15) [57], фактора роста и дифференцировки 9 (GDF-9), трансформирующего суперсемейства фактора роста  $\beta$ , также имеют решающее значение в генезе яичниковой недостаточности [133, 128, 129].

Ген стероидогенного фактора 1 (SF-1, NR5A1) играет ключевую роль в дифференцировке гонад, контролируя синтез половых гормонов посредством влияния на функцию стероидогенного острого регуляторного белка (StAR) [150], цитохром P450, эстрогенсинтазу- полипептид 1-семейства 19, подсемейства А (CYP19A1) [68], ген рецептора лутропин-хориогонадотропного гормона (LHR) [173] и гены альфа-субъединицы ингибина (INHА) [60], играющих важную роль в стероидогенезе в пределах оси гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы. Показана связь между развитием ПНЯ и специфичными для оогенеза спираль-петля-спираль (SOHLH) 1 и 2 ДНК-связывающими факторами [41, 60, 170, 193]. Эти мутации вызывают бесплодие и истощение фолликулярного пула яичников.

Полногеномное секвенирование (GWAS) применяется в исследовании общих генетических вариантов в популяции, чтобы выявить связь генетических факторов с ПНЯ у сходных этнических групп. Из-за ограниченного размера выборки и в связи с относительно низкой частотой встречаемости ПНЯ возникают трудности при идентификации кандидатных генов при данном заболевании [45].

Установленные гены-кандидаты ПНЯ: специфичный ген для сперматогенеза и оогенеза -кодирующий основную спираль-петлю-спираль, содержащую белок 1 (SOHLH1), ген рецептора фолликулостимулирующего гормона FSHR [94,126]; стромальный антиген 3 (STAG3), контролирующий репарацию повреждений ДНК [134], белок-1 центрального элемента синаптонемного комплекса (SYCE1) [71], каркасный белок, участвующий в репарации ДНК (SPIDR) [7], ген, кодирующий белок из семейства АТФаз, участвующий в регуляции организации структурного порядка хромосом и их динамических изменений (PSMC3) [204], АТФ-зависимый гомолог ДНК-геликазы (HFM1) [14], гомолог белков, участвующих в репарации ДНК- MutS 4 и 5 (MSH4 и MSH5) [11, 129, 116], факторы «лицензирования репликации ДНК» 8 и 9 (MCM8 и MCM9) [121, 72], гибридный белок CSB-PGBD3 [50], нуклеопорин 107 кДа (NUP107) [12]; и мРНК- эукариотические

факторы инициации трансляции 4E ядерного фактора 1 (eIF4ENIF1) [13] и КН-домен, акцептирующий РНК-связывающий белок 1 (KHDRBS) [13] и др.

В рамках исследования **Yuan ZZ. соавт.** пациентке 21 года с ПНЯ проведено секвенирование экзона. После обработки данных был детектирован новый миссенс-вариант в гене POF1B- premature ovarian failure protein 1B (белок преждевременной недостаточности яичников 1B): NM\_024921, с.932A>C, р. K311T. Данный новый гомозиготный вариант (NM\_024921, с. 932A>C, р.K311T) располагался вблизи с известной мутацией (р.R329Q); в связи с этим предполагалось, что K311T, как и R329Q, может нарушать способность белка POF1B связывать немышечные актиновые филаменты, но при этом мутация реализуется мягче в клиническом смысле, чем R329Q, поэтому K311T приводит к вторичной, а не к первичной аменорее. Были предложены две гипотезы относительно патогенеза реализации генетической мутации POF1B.3 Временные рамки экспрессии белка POF1B согласуются с переходом зародышевых клеток от стадии пахитены к диплотене мейоза, что исключают его участие в первичной их миграции. Из-за сниженной способности указанного протеина связываться с актином, POF1B может участвовать в спаривании хромосом в процессе мейоза, а мутации с потерей функции в нем могут вызывать гибель клеток и существенное снижение конечного числа ооцитов.

Также, POF1B может участвовать в регуляции апоптоза зародышевых клеток путем влияния на структуру актинового цитоскелета. Изменения актинового цитоскелета связаны с высвобождением активных форм кислорода из митохондрий и апоптозом зародышевых клеток. POF1B может ингибировать апоптоз зародышевых клеток и поддерживать нормальное развитие яичников. Измененный цитокинез эпителиальных клеток яичников, затронутых мутацией в гене POF1B, может быть основной причиной ПНЯ [15].

Дискутируется вопрос об изменении транскриптомных профилей гранулезных клеток яичников и мононуклеарных клеток периферической

крови у женщин с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ) по сравнению с молодыми женщинами с бедным и нормальным ответом на овариальную стимуляцию. Несмотря на количество антральных фолликулов при СПКЯ, зачастую наблюдается их фенотипическая неоднородность (как по размеру, так и по стадии созревания, со скомпрометированным качеством ооцитов и соответственно высокой частотой получения незрелых гамет). В результате динамика фолликулярного роста у данной группы пациенток значительно отличается от таковой у женщин с бедным ответом на стимуляцию функции яичников или сниженным овариальным резервом.

В мононуклеарах периферической крови при СПКЯ было определено 65 дифференциально экспрессируемых генов по сравнению с пациентками с нормальным овариальным резервом и 16 по сравнению с молодыми женщинами с бедным ответом на стимуляцию функции яичников. В гранулезных клетках пациенток с СПКЯ 4 гена показали пониженную экспрессию по сравнению с образцами женщин, имеющих нормальный овариальный резерв, в то время как 58 генов были дифференциально экспрессированы по сравнению с образцами, полученными от пациенток с бедным ответом на овариальную стимуляцию. Проведенный анализ функционального обогащения показал, что дифференциально экспрессируемые гены в клетках гранулезы при СПКЯ по сравнению с нормальным или сниженным овариальным резервом были преимущественно вовлечены в процессы убиквитинирование белка, окислительное фосфорилирование, митохондриальную функцию и сигнальные пути сиртуинов [194].

В исследовании **Liu L и коллег** сравнивались профили экспрессии генов кумюсных клеток у пациенток со сниженным и нормальным овариальным резервом. Всего у пациенток со сниженным овариальным резервом было идентифицировано 294 гена с повышенной активностью и 336 генов с пониженной регуляцией по сравнению с группой пациенток с нормальным овариальным резервом. Биоинформационный анализ показал,

что гены с пониженной экспрессией были обогащены сигнальным путем Wnt, что ведет к негативной регуляцией сборки стрессовых волокон и активации хемотаксиса клеток, в то время как активированные гены были высоко обогащены элементами, связанными с регуляцией продукции интерлейкина-5 и таким образом вовлечены в процессы функционирования иммунной системы.

В соответствии с дифференциальными уровнями экспрессии и их потенциальными функциями подобный рецептору -1 интерлейкина- 1 (IL1RL1), интерлейкин-33 (IL33), секретируемый скрученный белок 4 (SFRP4) и сфингозин-1-фосфатный рецептор 1 (S1PR1) были выявлены методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией и подтверждены секвенированием РНК. Таким образом, экспрессия генов, участвующих в регуляции иммунного статуса- IL1RL1, IL33, SFRP4 и S1PR1 в клетках кумулюса может быть вовлечена в патогенез снижения овариального резерва [58].

### **1.2.1 Роль некодирующих малых РНК в генезе сниженного овариального резерва**

Роль некодирующих РНК (нкРНК) в биологии стала предметом пристального внимания, поскольку они широко изучены для определения измененной функции белков при различных заболеваниях в качестве эпигенетических регуляторов [190, 65, 112]. МикроРНК (miRNAs) эндогенно присутствуют в яичниках млекопитающих [124], а паттерны их экспрессии изменяются на протяжении развития яичников и фолликулогенеза [55].

В работе **Wang и соавт.** сообщается, что lncRNA HCP5 (длинная некодирующая РНК лейкоцитарного антигенного комплекса гистосовместимости P5- Histocompatibility leukocyte antigen complex P5) отвечает за развитие ПНЯ. HCP5 регулирует экспрессию гомолога белка MutS5 (задействован в процессах восстановления структуры ДНК или

мейотической рекомбинации) -MSH5 и функцию гранулезных клеток, напрямую связываясь с транскрипционным фактором Y-box (YB1) и модулируя его субклеточную локализацию. Это исследование также выявило вклад длинной некодирующей РНК-НСР5 в дисфункцию клеток гранулезы, через транскрипционную регуляцию MSH5 и репарацию поврежденной ДНК путем связывания с YB1, обеспечивая новый эпигенетический механизм патогенеза ПНЯ [125].

В многочисленных исследованиях сообщалось, что идентификация микро-РНК может привести к появлению новых клинических маркеров для верификации заболевания, а также выявить потенциальные терапевтические подходы к лечению преждевременной недостаточности яичников [188, 149, 137].

Мутации в гене FOXL2 (Белок «вилочной коробки» L2) связаны с ПНЯ в форме BPES типа 1 (синдром, включающий блефарофимоз, птоз, и эпикантус инверсус, с преждевременной недостаточностью яичников). FOXL2 - один из генов, ответственных за формирование гонад, вовлеченный в процессы фолликулогенеза.

Фенотип яичников у женщин с мутациями FOXL2 варьирует. **Meduri et al.** сообщили о двух пациентах с мутацией FOXL2; у одной наблюдалась блокировка созревания фолликулов, а другая имела гистологически нормальные яичники, но с измененным соотношением примордиальных и первичных фолликулов и склонностью к развитию функциональных кист [80].

Синдром BPES и предполагаемая мутация FOXL2 может также обуславливать фенотип яичников, характерный для дисгенезии гонад-яичники в виде тяжистых структур [23].

Мутации в гене рецептора фолликулостимулирующего гормона обычно вызывают первичную аменорею и нарушение роста фолликулов, что продемонстрировано в одном из исследований, проведенном на финской популяции [130].

### 1.2.2 Негенетические причины ПНЯ

Аутоиммунные причины опосредуют развитие ПНЯ в 4–30% случаев [34,64]. Изменения гомеостаза, характеризующиеся провоспалительными изменениями отрицательно влияют на фолликулогенез, что приводит к нарушению функции яичников [110]. Несмотря на то, что основными мишенями реализации аутоиммунных механизмов являются стероидпродуцирующие клетки в преовуляторных фолликулах и желтых телах, иногда наблюдается истощение первичных и примордиальных фолликулов, фиброз и аномальная активация эпителиальных клеток [145, 110].

Лимфоцитарный оофорит и наличие антиовариальных антител являются признаками аутоиммунной этиологии ПНЯ [35, 77, 110]. Лимфоцитарный оофорит чаще встречается при болезни Аддисона ассоциированной с ПНЯ, чем при изолированной яичниковой недостаточности [90]. Признаки лимфоцитарного оофорита гистопатологически обнаруживаются в биоптатах яичников женщин с нормальным кариотипом, страдающих аменореей [10]. Гипотиреоз, аутоиммунная недостаточность надпочечников, аутоиммунный полигландулярный синдром и болезнь Аддисона являются наиболее распространенными заболеваниями, ассоциированными с ПНЯ.

Установлено, что туберкулез органов малого таза вызывает ПНЯ у 3% пациентов. Кроме того, курение может способствовать развитию данного заболевания из-за негативного влияния полициклических углеводов, содержащихся в табачном дыме.

Наиболее частыми ятрогенными причинами ПНЯ являются химиотерапия, лучевая терапия, чье воздействие на яичники сильно варьирует в зависимости от степени гонадотоксичности используемых препаратов [77].

Метаболические причины ПНЯ представлены галактоземией, миотонической дистрофией, дефицитом гидроксилазы и др. Описан клинический случай пациентки с классической галактоземией и мутацией галактозо-1-фосфат уридилтрансферазы (Q188R/K285N GALT), которая дважды забеременела, несмотря на выраженную недостаточность яичников.

Пациентка 20-ти лет с классической галактоземией и ПНЯ достигла беременности без какого-либо вмешательства и менее чем через год после первых родов забеременела повторно.

В настоящее время в имеющейся литературе описано всего 90 беременностей у пациенток с галактоземией. Яичниковая недостаточность является долгосрочным, не зависящим от характера питания осложнением классической галактоземии, встречающимся примерно у 90% больных.

Данный случай подтверждает неоднозначное течение заболевания, так как даже наличие неблагоприятных факторов (отсутствие своевременного полового созревания, ранняя манифестация ПНЯ, неопределяемый АМГ) не исключает возможность наступления беременности [197].

По данным Медицинского факультета Университета Святой Марианны и Rose Ladies Clinic, суммарный положительный результат 16-ти тестов на обнаружение аутоантител (антинуклеарные антитела, антитела к нативной ДНК, антицентромерные антитела, анти-SSA-антитела (анти-связанные с синдромом Шегрена аутоантитела к антигену A), анти-SSB-антитела-антитела к цитоплазматическому антигену SS-B, антитело к экстрагируемому ядерному антигену Sm (анти-SM), антитело против антитопоизомеразы- I (SCL-70), антитело к экстрагируемым ядерным антигенам RNP (анти- RNP), антиядерное антитело связанное с воспалительными миопатиями, такими как полимиозит и дерматомиозит (Антитело Jo-1), антитело против тиреоглобулина, антицитопероксидазные антитела, микросомный тест, тиреоидный тест, антикардиолипидные антитела, в том числе антитело против В2-гликопротеина (CL / b2GP1) и ревматоидный фактор), которые

были определены у пациенток с нормальным кариотипом, страдающих ПНЯ -составил 45%.

У 41 пациентки (15% пациентов с положительными аутоантителами) были диагностированы аутоиммунные заболевания. Аутоиммунное расстройство, наиболее часто связанное с ПНЯ -гипотиреоз в сочетании с гиперпаратиреозом.

Несмотря на то, что аутоиммунные заболевания часто ассоциируются с ПНЯ, **Hoek et al.** сообщили, что, гистологически оофорит можно выявить только у пациентов с циркулирующими аутоантителами к клеткам надпочечников или яичников [89].

**Welt et al.** подтверждают ассоциацию ПНЯ и заболеваний щитовидной железы и предполагают, что антитела к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО) следует оценивать ежегодно при получении положительного результата, а скрининговые лабораторные исследования можно проводить с интервалом в 5 лет при предшествующем отрицательном результате. Таким образом, скрининг на наличие антител к тканям щитовидной железы следует выполнять женщинам с ПНЯ неизвестной этиологии, а также при подозрении на аутоиммунный характер заболевания.

Помимо перечисленных определен ряд аутоантител к различным мишеням, включая рецептор лютеинизирующего гормона (ЛГ), рецептор фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и блестящую оболочку (*zona pellucida*), претерпевающие ряд структурных и функциональных изменений при ПНЯ [144, 169, 43].

Антиооцитарные антитела обнаруживаются у 24–73% пациентов с подтвержденным диагнозом ПНЯ [37].

Различные типы антител могут быть вовлечены в патогенез недостаточности яичников с широким диапазоном антигенных мишеней в овариальной ткани. В-субъединица ФСГ чаще всего является мишенью.

Другие антитела теоретически могут действовать против клеток, продуцирующих гормоны, желтого тела, блестящей оболочки, клеток

гранулезы, ооцитов, стероидогенных ферментов, таких как альдегиддегидрогеназа-1A1 (ALDH1A1), селен связывающий белок 1 (SBP1), белок теплового шока 90-β (HSP90β), 3β-гидроксистероид-дегидрогеназа (3β-HSD) и анти-α-енолаза [52,64].

Наиболее тесно связанная группа эндокринопатий ассоциированных с ПНЯ -это заболевания щитовидной железы, такие как гипотиреоз, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса и др. [103].

Дискуссионным остается вопрос об ассоциации аутоиммунных заболеваний щитовидной железы со снижением овариального резерва у женщин при нормальных функциональных показателях щитовидной железы (эутиреоз).

В исследовании китайских ученых были ретроспективно проанализированы данные 4302 пациенток с эутиреоидным состоянием с нормальным и сниженным овариальным резервом, включая биохимическую преждевременную яичниковую недостаточность и манифестную ПНЯ. Также была определена корреляция между антителами к тиреопероксидазе (АТ-ТПО), антителами к тиреоглобулину (АТ-ТГ) и маркерами овариального резерва. Распространенность положительного аутоиммунного статуса щитовидной железы была равномерно распределена между женщинами с нормальным и сниженным овариальным резервом ( $P = 0,080$ ,  $P = 0,172$ ); распространенность положительных результатов на АТ-ТПО была выше в группе сниженного овариального резерва ( $P = 0,005$ ). После стратификации овариального резерва и ТТГ было определено, что повышение уровня антитиреоидных антител было достоверно связано с манифестной ПНЯ, когда ТТГ имел концентрацию  $>2,5$  мкМЕ/мл (все  $P < 0,001$ ); в случае, когда уровень ТТГ составлял  $\leq 2,5$  мкМЕ/мл подобная ассоциация не прослежена. Не обнаружено корреляции между титрами антитиреоидных антител с показателями овариального резерва: АМГ ( $P = 0,218$ ,  $P = 0,368$  соответственно) и количеством антральных фолликулов ( $P = 0,184$ ,  $P = 0,315$

соответственно) у пациентов со сниженным овариальным резервом; титр АТ-ТПО положительно коррелировал с ФСГ ( $P = 0,039$ ).

Среди всех обследованных женщин с эутиреозом аутоиммунный статус не был связан с низким овариальным резервом, но был значительно ассоциирован с манифестной ПНЯ у женщин с уровнем ТТГ  $> 2,5$  мкМЕ/мл [29].

ПНЯ также сочетается с множеством других заболеваний, включая ревматоидный артрит, болезнь Крона, миастению *gravis*, системную красную волчанку и рассеянный склероз [163].

Аутоиммунный лимфоцитарный оофорит проявляется мононуклеарной инфильтрацией яичников, клеток теки, особенно в развивающихся фолликулах и желтых телах, не затрагивая при этом примордиальные и первичные фолликулы. Яичники на этой стадии могут быть нормального размера или увеличены. Гистопатологическое подтверждение болезни проводится примерно в 10% случаев ПНЯ.

Иммуногистохимические исследования выявляют инфильтрацию Т-лимфоцитами (CD4 +, CD8 +), В-лимфоцитами, естественными клетками-киллерами и плазматическими клетками, вырабатывающими в основном антитела класса- IgG. Изменения в иммунном ответе приводят к аномалиям в функционировании макрофагов и дендритных клеток. Соотношение CD4 + / CD8 + и экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II гранулезными клетками зачастую является аномальной.

Воспалительная реакция влияет на стероидпродуцирующие клетки в преовуляторных фолликулах, особенно во внутреннем и внешнем слоях теки, желтого тела, а нередко и в клетках гранулезы. Иногда отмечается периневральная и периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация [64, 69].

Одно из последних исследований направлено на изучение уровня цитокинов в фолликулярной жидкости женщин со сниженным овариальным резервом, проходящих лечение бесплодия методом ЭКО.

Концентрации 480 цитокинов и связанных с ними факторов роста в фолликулярной жидкости определяли с помощью мультиплексного иммуноанализа у 194 пациенток, включенных в исследование. 59 цитокинов имели значительно отличающиеся концентрации (53 выше и 6 ниже) при сниженном овариальном резерве по сравнению с контрольной группой после поправки на возраст и индекс массы тела. Таким образом, фолликулярное микроокружение различается у женщин при сниженном и нормальном овариальном резерве. Цитокины с различными концентрациями, представленными при различных характеристиках овариального резерва вовлечены в различные процессы, такие как созревание фолликулов и овуляторная функция [9].

Охарактеризованы профили Т-клеток и цитокинов в фолликулярной жидкости и оценен их вклад в развитие сниженного овариального резерва. Оценена ультраструктура, процессы пролиферации и апоптоза клеток гранулезы. Определены уровни лиганда- 5 хемокина (CCL5) и цитокинов в фолликулярной жидкости. Классифицированы Т-клетки и проанализирована продукция цитокинов в них. Цитоплазматическая вакуолизация, диссоциация ядрышек, частичное укорочение, набухание и слияние митохондриальных крист были идентифицированы в фолликулярной жидкости при сниженном овариальном резерве. При этом уменьшалась интенсивность процесса пролиферации гранулезных клеток и увеличивалась доля их апоптоза.

Негативная регуляция гена, кодирующего белок В-клеточной лимфомы- 2 (Bcl-2) и повышающая регуляция гена каспазы- 3 наблюдались в клетках гранулезы у пациенток со сниженным овариальным резервом. Количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток и соотношение CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> при сниженном овариальном резерве превышали таковые при нормальном состоянии яичников. При сниженном овариальном резерве был обнаружен более высокий процент трансмембранного лектинового протеина С-типа (CD69), С-С-рецептора хемокина 5 (CCR5) и интерферона- гамма (IFN- $\gamma$ ) в CD8<sup>+</sup> Т-

клетках, сниженный уровень интерлейкина-10 (IL-10) в CD4<sup>+</sup> Т-клетках и мембранного белка надсемейства иммуноглобулинов (PD-1) в CD8<sup>+</sup> Т-клетках. CCL5 накапливается, способствуя аттракции CD8<sup>+</sup> Т-клеток в фолликулы при их взаимодействии.

Аномальная пропорция CD8<sup>+</sup> Т-клеток и повышенный уровень CCL5 и IFN- $\gamma$  могут изменять иммунный баланс в фолликулярной жидкости и нарушать функционирование гранулезных клеток, что, в свою очередь, способствует прогрессированию снижения овариального резерва [20].

В одном из исследований определялся профиль цитокинов в фолликулярной жидкости и парных образцах сыворотки крови у пациентов с биохимической ПНЯ методом мультиплексного иммуноферментного анализа, включающий определение 45 цитокинов у 35 пациенток с ПНЯ и 37 женщин группы сравнения. В фолликулярной жидкости пациенток с ПНЯ значительно повышен уровень следующих хемокинов: MIP-1 $\alpha$ -макрофагального воспалительного белка 1-альфа (P = 0,043), интерлейкина-8 (CXCL8) (P = 0,024), индуцируемого интерфероном гамма-белка- 10 (IP-10) (P = 0,041) и эотаксина-1 (P = 0,015), а также факторов роста: сосудистого эндотелиального фактора роста- D (VEGF-D) (P = 0,047), нейротрофического мозгового фактора (BDNF) (P = 0,043), лейкемия-ингибирующего фактора (LIF) (P = 0,002) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) (P = 0,046).

Содержание этих хемокинов и факторов роста в фолликулярной жидкости достоверно коррелирует с показателями овариального резерва (P <0,05). В парных образцах сыворотки крови цитокиновый профиль не соответствовал таковому в фолликулярной жидкости за исключением повышенного уровня IP-10 (P = 0,032) у пациентов с биохимической ПНЯ и отмечена его значимая корреляция с уровнем ФСГ и количеством антральных фолликулов (P <0,05). Среди всех дифференциально экспрессируемых цитокинов концентрация RANTES (селективный аттрактант Т - лимфоцитов и моноцитов) в фолликулярной жидкости

коррелировала с количеством эмбрионов хорошего качества на третий день развития ( $P = 0,035$ ) [63].

Представляет несомненный интерес ассоциация сахарного диабета со сниженным овариальным резервом. Несмотря на то, что у большинства пациентов в популяции встречается сахарный диабет 1-го или 2-го типов, моногенная природа заболевания наблюдается в 5—10% всех случаев. Данная группа представлена доминантно наследуемыми нарушениями, вызванными дисфункцией генов, влияющих на функцию  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. Данный фенотип сахарного диабета, впервые описан в 1975 году как вариант MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young)-сахарный диабет зрелого типа у молодых.

В работе **Alvarez M и др.** представлен клинический случай 23-летней пациентки с диабетом зрелого типа 3 у молодых (MODY 3) и преждевременной недостаточностью яичников. Нет доказанной корреляции между MODY 3 и ПНЯ. В литературе ранее не была описана ассоциация между этими двумя заболеваниями, и нет представленных подобных клинических случаев. Сахарный диабет 3-го типа в молодом возрасте (MODY 3) — нечастая форма сахарного диабета, которую следует учитывать у молодых пациентов с атипичными проявлениями диабета 1-го или 2-го типа. MODY 3 в большей степени ассоциирован с микрососудистыми осложнениями, поэтому важно диагностировать его как можно раньше с целью адекватной коррекции уровня гликемии. Нарушение метаболизма глюкозы было продемонстрировано у пациенток с преждевременной недостаточностью яичников и менопаузой [120].

Существующие исследования ассоциации возраста менархе и возраста естественной менопаузы с диабетом противоречивы. Изучение взаимосвязи возраста менархе и менопаузы с сахарным диабетом, а также оценка влияния на индекс массы тела, частоту абдоминального ожирения, артериальной гипертензии и дислипидемии вызывает определенный интерес, что находит отражение в ряде публикаций.

Так, перекрестное исследование группы ученых из Китая включало 5090 женщин в постменопаузе. Не наблюдалось значимой ассоциации возраста менархе и менопаузы с индексом массы тела, абдоминальным ожирением, гипертензией, дислипидемией и риском развития сахарного диабета.

Позднее менархе связано с меньшей распространенностью сахарного диабета, тогда как ранняя менопауза ассоциирована с более высокой распространенностью данного заболевания.

Не наблюдалось значимого изменения индекса массы тела, абдоминального ожирения, артериальной гипертензии или дислипидемии [30].

Считается, что изменения в составе микробиома кишечника могут влиять на развитие ПНЯ посредством аутоиммунного механизма. Состав кишечной микробиоты здоровых женщин ( $n = 18$ ) и женщин с ПНЯ ( $n = 35$ ) были проанализированы на основании изучения 16S субъединицы рРНК путем секвенирования. Phylum Firmicutes, роды *Bulleidia* и *Faecalibacterium* были больше распространены у здоровых женщин, в то время как тип *Bacteroidetes*, род *Butyricimonas*, *Dorea*, *Lachnobacterium* и *Суттерелла* значительно преобладал у женщин с ПНЯ. Более того, эти изменения микробиома кишечника у женщин с ПНЯ коррелировали с уровнем ФСГ, ЛГ, эстрадиола, АМГ и соотношением ФСГ/ЛГ. Таким образом, у женщин с ПНЯ наблюдается ряд изменений микробного профиля кишечника, которые ассоциированы с уровнями гормонов сыворотки крови [31].

В настоящее время отсутствуют доказательные данные о лечении аутоиммунной ПНЯ. Необходимы масштабные клинические исследования для изучения истинного влияния аутоиммунитета на функцию яичников и выявление отдельных групп пациентов, которым показана иммуносупрессивная терапия [110].

Потенциальный положительный эффект иммуносупрессивной терапии при ПНЯ при установленной аутоиммунной этиологии заболевания сообщается только в одном из исследований [154].

### **1.2.3 Роль инфекционных заболеваний в анамнезе в генезе снижения овариального резерва**

В ряде исследований показано, что вирусные инфекции могут быть ассоциированы с последующим нарушением функции яичников. Однако только оофорит, связанный с эпидемическим паротитом, считается доказанной причиной ПНЯ, составляя 3–7% от всех случаев заболевания [111].

По данным Медицинского факультета Университета и женской клиники Rose Ladies Clinic в Св. Марианне, 827 пациенток с ПНЯ и 8 женщин с нормальным кариотипом без возможных аутоиммунных или ятрогенных причин переносили в анамнезе либо эпидемический паротит (N = 2) либо аппендицит с признаками перитонита (N = 6) в детском возрасте. Однако представлены лишь отдельные случаи, и нет достоверных данных, однозначно указывающих на инфекционное заболевание в анамнезе как причину ПНЯ.

### **1.2.4 Роль микровезикул-экзосом в генезе снижения овариального резерва**

Было показано, что небольшие внеклеточные везикулы функционируют при ПНЯ, запуская несколько сигнальных путей, включая фосфоинозитол-3-киназный сигнальный путь (PI3K / АКТ), сиртуин-4 и 7 (SIRT4, SIRT7) [73,175,95]. Сигнальный путь PI3K / АКТ важен для активации примордиальных фолликулов, которые играют принципиальную

роль в фолликулогенезе, а также для пролиферации клеток гранулезы путем ингибирования процессов апоптоза [164].

Было показано, что внеклеточные везикулы, полученные из эмбриональных стволовых клеток (ESC-sEV), влияют на уровни эстрадиола, ФСГ и АМГ, увеличивают количество антральных фолликулов и уменьшают количество атрезизирующихся фолликулов после трансплантации при изучении на животной модели ПНЯ [175].

Описанная выше группа микровезикул способна приводить к снижению экспрессии белков, связанных с апоптозом, таких как регулятор апоптоза BAX (член семейства Bcl-2) и каспаза-3, и к увеличению экспрессии Bcl-2 [177].

**Yang и др. (2020)** также продемонстрировали, что микровезикулы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток пуповины (HucMSC), стимулируют примордиальные фолликулы, активируя путь PI3K / mTOR ооцитов, неся функциональные miRNA, такие как miR-146a-5p или miR-21-5p.

Активация сигнального пути PI3K / mTOR ооцитов приводит к стимуляции примордиальных фолликулов и ускорению их развития после трансплантации овариальной ткани под капсулу почки в экспериментальных моделях. Было показано, что интрабурсальная инъекция HucMSC-экзосом пожилым самкам мышей способствует восстановлению фертильности с увеличением продукции ооцитов и улучшением их качества. Недавнее исследование показало, что miR-17-5p из HucMSC-sEVs улучшает функцию яичников при ПНЯ, регулируя сиртуин-7 (SIRT7) [74].

Количество антральных фолликулов и суммарного фолликулярного пула значительно увеличилось в яичниках мышей, страдающих ПНЯ, при применении экзосом. Выделенная из человеческих мезенхимальных стволовых клеток экзосомная miR-320a регулирует АДФ / АТФ транслоказу-2 (ANT2), AMP-зависимую киназу (AMPK) и длинную форму связанной с динамином ГТФазы, контролирующей митохондриальную функцию,

целостность крист, энергетический баланс и поддержание митохондриальной ДНК (L-OPA1) через сиртуин-4 (SIRT4), что предотвращает продукцию активных форм кислорода [73].

Анти-miR-320a на животной модели ПНЯ, индуцированной химиотерапевтическим воздействием, приводило к подавлению экспрессии генов-мишеней SIRT4. Так, микровезикулы, полученные из стволовых клеток были предложены в качестве одной из терапевтической стратегией лечения ПНЯ [46, 104, 76, 172].

### 1.3 Достижение беременности при ПНЯ

Дефицит женских половых гормонов обуславливает наличие широкого спектра жалоб, которые могут быть эффективно устранены при помощи использования различных форм заместительной гормональной терапии. Однако в рамках репродуктивного периода жизни женщины, основной жалобой, имеющей социальное значение является бесплодие, нередко резистентное к стандартным методам лечения.

Гонадотропин-зависимая фаза фолликулогенеза, ход которой отражается в числе антральных фолликулов в рамках менструального цикла, ограничивает возможности использования экзогенной овариальной стимуляции относительно неизменяемыми временными границами. У пациенток, страдающих преждевременной недостаточностью яичников и при бедном овариальном ответе на стимуляцию их функции наблюдается резкое снижение числа антральных фолликулов вплоть до отсутствия возможности их детекции. Таким образом, необходимо выявление механизмов воздействия на процесс фолликулогенеза в пределах гонадотропин-независимой стадии-то есть на этапе рекрутинга примордиальных фолликулов, что позволит оптимизировать последующий этап стимуляции функции яичников и

соответственно повысить эффективность лечения бесплодия в данной группе больных [106].

Частота спонтанного зачатия у женщин с ПНЯ после постановки диагноза составляет в среднем 4,4% [166].

**Bachelot et al.** сообщили в своем поперечном исследовании, проведенном на 507 пациентках с идиопатической ПНЯ, о спонтанном возобновлении функции яичников у 117 (23%) пациенток и о спонтанном зачатии у 18 (3,6%) женщин [166].

Кроме того, в обсервационных исследованиях у пациенток с ПНЯ, получавших заместительную терапию эстрогенами, частота наступления беременности составила 4,8% [39].

Суммарная частота наступления беременности при попытках индукции овуляции у пациенток с ПНЯ составила 6,3%, а гонадотропная стимуляция с использованием агонистов гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРг) по сравнению с плацебо не привела к каким-либо различиям в частоте наступления беременности [198, 84, 199].

**Tartagni, Badawy и коллеги** представили рандомизированные исследования по изучению индукции овуляции у пациенток с ПНЯ [39, 67].

**Tartagni и соавт.** провели рандомизированное исследование с участием 50 женщин с ПНЯ, получавших этинилэстрадиол или плацебо за 2 недели до и во время овариальной стимуляции гонадотропинами, с целевым результатом – детекцией овуляции [39]. У 8 из 25 женщин, получавших этинилэстрадиол произошла овуляция, при этом четверо из них забеременели. Ни у одной из 25 женщин в группе плацебо не произошла овуляция. Овуляция была отмечена у женщин с уровнем ФСГ <15 мМЕ / мл во время лечения этинилэстрадиолом.

В исследовании **Badawy и др.**, 58 пациенток с идиопатической ПНЯ, получавших терапию гонадотропинами в сочетании с использованием а-ГнРГ были рандомизированы в зависимости от назначения дополнительного лечения дексаметазоном или плацебо, на основании предположения, что

некоторые пациенты может иметь аутоиммунную этиологию заболевания. Овуляция была обнаружена у 6 из 29 женщин, получавших дексаметазон, по сравнению с 3-мя из 29 в группе плацебо. Эта разница была значительной, но из-за небольшого размера выборки вывод не является достоверным.

В нескольких исследованиях предпринимались попытки индукции овуляции с использованием человеческих менопаузальных гонадотропинов / препаратов рекомбинантного ФСГ (рекФСГ) с десенситизацией гипофиза агонистами ГнРг при одновременном использовании эстрогенов. В связи с тем, что на процесс созревания фолликула от вторично-преантрального до преовуляторного уходит несколько месяцев, длительная стимуляция чМГ / рекФСГ при одновременном применении заместительной терапии эстрогенами и гонадолиберином может быть более эффективна для индукции роста фолликулов у пациентов с установленным диагнозом ПНЯ [86].

Цель ретроспективного исследования **Sik BA и соавторов** заключалась в изучении эффективности однократного введения антагониста гонадотропин-рилизинг-гормона (ант-ГнРг) на следующий день после применения ХГЧ в предотвращении преждевременной лютеинизации у пациенток со сниженным овариальным резервом в циклах ЭКО. Исследование включало 267 пациенток с бесплодием, у которых единичный антральный фолликул был обнаружен с помощью УЗИ на 2-3-й день менструального цикла до начала стимуляции функции яичников. Частота преждевременной овуляции была значительно ниже в основной по сравнению с контрольной группой (6,86 против 20,6% на цикл стимуляции) ( $p = 0,022$ ). Кроме того, частота извлечения ооцитов (93,14 против 67,87% на цикл) ( $p = 0,013$ ), частота получения зрелых ооцитов (79,42 против 47,87%) ( $p = 0,041$ ), частота оплодотворения (65,68 против 34,54%) ( $p = 0,018$ ) и частота переноса эмбрионов на цикл лечения (44,11 против 18,78%) ( $p = 0,003$ ) были выше в группе применения антагонистов ГнРГ. Введение антагониста ГнРГ на следующий день после триггера овуляции в циклах ЭКО у пациенток со

сниженным овариальным резервом позволяет значительно снизить частоту преждевременной овуляции, но не влияет на частоту живорождения [162].

Исследуется эффективность вагинального введения гонадотропинов у женщин, в рамках проведения программы ЭКО. В предыдущем исследовании указанных авторов вагинальное введение продемонстрировало более быстрое всасывание и медленное выведение гонадотропинов, а у женщин наблюдался надлежащий фолликулярный рост и частота наступления беременности. В этом исследовании 266 женщинам со сниженным овариальным резервом вводили интравагинально от 300 до 675 МЕ гонадотропинов каждые три дня в рамках контролируемой стимуляции функции яичников. Инъекции выполняли иглами, расположенными под углом 15-30° к средне-верхним отделам боковой стенки влагалища, на глубину 1-2 мм. Женщины в среднем получили  $3,0 \pm 0,9$  вагинальных инъекций и общую дозу вводимых гонадотропинов  $1318,4 \pm 634,4$  МЕ, что привело к получению  $2,2 \pm 1,9$  зрелых ооцитов и  $1,0 \pm 1,2$  эмбрионов хорошего качества. Среди полученных эмбрионов было перенесено  $0,9 \pm 1,0$ , с достижением частоты клинической беременности равной 18,1% и коэффициентом живорождения -16,7%. Прерывистое вагинальное введение гонадотропинов оказалось эффективным у женщин со сниженным овариальным резервом в рамках проведения программы ЭКО [146].

В исследовании **Yenigul NN** и коллег сравнивалась эффективность двух протоколов контролируемой стимуляции функции яичников; рекФСГ + человеческие менопаузальные гонадотропины (чМГ) либо изолированное использование рекФСГ в протоколе с антагонистами ГнРГ при сниженном овариальном резерве в возрасте до 35 лет.

Не отмечено положительного эффекта добавления ЛГ в циклах ЭКО у женщин моложе 35 лет со сниженным овариальным резервом по сравнению с использованием рекФСГ в протоколе с антагонистами ГнРг [191].

Несмотря на то, что установлено существование нескольких волн фолликулогенеза в рамках менструального цикла, эффективность

контролируемой стимуляции овуляции как в фолликулярной, так и в лютеиновой фазах одного и того же овариального цикла (DuoStim) у женщин с ПНЯ/сниженным овариальным резервом не установлена.

В исследовании **Hsu СС и др.** изучалась эффективность DuoStim с использованием интраовариальной инъекции рекомбинантного человеческого фолликулостимулирующего гормона (рчФСГ) во время трансвагинальной пункции у женщин со сниженным овариальным резервом. Для стимуляции в лютеиновой фазе в качестве стартовой дозы использовались интраовариальное (группа А, N = 28) или подкожное (группа В, N = 18) введение 300 МЕ рчФСГ сразу после извлечения ооцитов, а также повторное подкожное введение гонадотропинов соответственно для дальнейшей стимуляции в обеих группах. В группе А были использованы значительно более низкие дозы гонадотропинов и отмечена более короткая продолжительность стимуляции функции яичников, большее количество антральных фолликулов и большее число суммарно извлеченных ооцитов и зрелых яйцеклеток. Новый подход с использованием интраовариальной инъекции рчФСГ представляется эффективным в лечении бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом [107].

Целью исследования **Fouks Y и соавт.** было оценить частоту анеуплоидии у молодых женщин со сниженным овариальным резервом и бедным ответом на стимуляцию функции яичников.

Данные 383 женщин со сниженным овариальным резервом сопоставлялись с группой сравнения. Частота анеуплоидии между двумя группами существенно не различалась (42,2% против 41,7%). Не было выявлено различий в показателях живорождения из расчета на перенос эмбриона между женщинами с нормальным и сниженным овариальным резервом после селективного переноса эуплоидного эмбриона (56,0% и 60,5% соответственно). Оценка частоты анеуплоидии у пациенток с бедным ответом на стимуляцию функции яичников по сравнению с пациентами с нормальным ответом на овариальную стимуляцию показала сходную частоту

анеуплоидии между двумя группами (41,1% против 44%). Распространенность циклов с «отсутствием эуплоидных эмбрионов» в когорте женщин с бедным ответом на стимуляцию была выше (26% против 13%);

У молодых женщин со сниженным овариальным резервом и бедным ответом на стимуляцию функции яичников наблюдается эквивалентная частота анеуплоидии и живорождения из расчета на перенос эуплоидного эмбриона, что сопоставимо с популяционной результативностью программы ЭКО в зависимости от возраста, индекса массы тела и др. Меньший процент циклов с отсутствием эуплоидных эмбрионов, пригодных для переноса у пациенток со сниженным овариальным резервом, связан с уменьшением общего количества ооцитов/развивающихся эмбрионов, а не с увеличением частоты анеуплоидии в них [8].

#### **1.4 Адьювантная терапия в комплексном лечении ПНЯ**

В одном из метаанализов, включающем 2461 исследование, определялись сывороточные уровни андрогенов (общего тестостерона, дегидроэпиандростерона сульфата, андростендиона и глобулина, связывающего половые гормоны) у женщин с преждевременной недостаточностью яичников с целью установления снижения уровня андрогенов у данной категории пациенток. Женщины с ПНЯ подвержены риску снижения концентрации андрогенов: тестостерона, дегидроэпиандростерон сульфата и андростендиона. При этом уровень ДГЭА-С у пациенток с ПНЯ превышает таковой у женщин в постменопаузе. Статистически значимой разницы в концентрации ГСПГ отмечено не было [123].

В проспективном обсервационном исследовании **Wong, Q.H.Y и соавт.** изучалась эффективность 12-месячного приема дегидроэпиандростерона (ДГЭА) с позиции регуляции менструального цикла, маркеров овариального

резерва и профиля безопасности у женщин с преждевременной недостаточностью яичников. Пациенткам с ПНЯ назначали ДГЭА в дозе 25 мг три раза в сутки в течение 12 месяцев. Ультразвуковая оценка объема яичников и количества антральных фолликулов, а также измерение сывороточных уровней АМГ, ФСГ, эстрадиола, тестостерона, печеночных ферментов и гемоглобина проводилось до начала терапии и ежемесячно в течение 13 месяцев после приема указанного препарата. В исследование была включена 31 пациентка, средний возраст составил 36 лет, а медиана исходных концентраций ФСГ и АМГ оказалась равной 82,2 МЕ / л и 0,01 нг / мл соответственно. Возобновление ритма менструаций не происходило на фоне приема препарата. Уровни АМГ, ФСГ и количество антральных фолликулов существенно не изменились. Не было выявлено значимых побочных эффектов. Полученные результаты не подтверждают какого-либо значительного улучшения функции яичников после 12-месячного приема биологически активной добавки-ДГЭА у пациенток с ПНЯ [185].

Проанализированы исследования, касающиеся изучения роли андрогенов в фолликулогенезе и соответственно возможности их клинического применения в контексте оптимизации лечения бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом, опубликованные до сентября 2021 года, по данным электронного поиска в MEDLINE, Embase, Кокрановской библиотеке, Кокрановском центральном регистре контролируемых исследований, Scopus, ClinicalTrials.gov, реестре ISRCTN и Международном реестре клинических испытаний Всемирной организации здравоохранения. Не было обнаружено существенных различий в отношении количества извлеченных ооцитов, числа зрелых ооцитов, частоты клинической беременности, частоты живорождения и частоты выкидышей, при использовании дегидроэпиандростерона в сравнении с плацебо или отсутствием лечения. Прайминг с использованием препаратов тестостерона привел к получению большего количества ооцитов (средняя разница 0,94; 95% доверительный интервал 0,46–1,42) и к более высокой частоте

наступления клинической беременности (отношение рисков 2,07; 95% доверительный интервал 1,33–3,20).

Несмотря на то, что дегидроэпиандростерон не оказывал явного влияния на результативность ВРТ, установлено потенциально положительное влияние прайминга с использованием препаратов тестостерона на ответ яичников на стимуляцию и исходы беременности [132].

Концентрация метаболитов андрогенов, таких как ДГЭА, увеличивается в начале полового созревания, достигает максимума во втором и третьем десятилетии жизни, а затем снижается независимо от функции яичников. Проведен обзор литературы, опубликованной в период с 1985 по 2021 год, касающейся потенциальных преимуществ и рисков приема метаболитов андрогенов у женщин. В исследованиях изучалась потенциальная польза терапии ДГЭА для снижения частоты возраст-ассоциированных заболеваний, сексуальной дисфункции, бесплодия, в оптимизации метаболического статуса костной ткани, когнитивных функций и др. при первичной надпочечниковой недостаточности, гипопитуитаризме и анорексии, а также его применение у здоровых женщин в качестве пожизненной терапии.

Данные подтверждают улучшение качества жизни и психоэмоционального фона, при отсутствии влияния на статус тревожности или сексуальную функцию у женщин с первичной или вторичной надпочечниковой недостаточностью или анорексией. Не наблюдалось никаких положительных эффектов применения ДГЭА в отношении симптомов менопаузы, сексуальной функции, когнитивных функций или общего самочувствия у здоровых женщин. Местное введение ДГЭА оказывает благоприятное воздействие на слизистую оболочку влагалища при вульвовагинальной атрофии. Использование препарата для улучшения индукции овуляторного ответа яичников у женщин со сниженным овариальным резервом рутинно не рекомендуется, так как сопряжено с риском эстроген и андроген-зависимых побочных эффектов [206].

Цель исследования **Vasankgil ВН и др.** состояла в оценке влияния витамина D на маркеры овариального резерва, включая уровень АМГ в сыворотке, уровень фолликулостимулирующего гормона и количество антральных фолликулов у женщин с бесплодием, ассоциированным со сниженным овариальным резервом и дефицитом витамина D. Было проведено проспективное нерандомизированное перекрестное исследование женщин в возрасте от 18 лет до 41 года с отсутствием наступления беременности в течение 12 месяцев при нормальной проходимости маточных труб, нормозооспермией партнера, сниженным овариальным резервом и дефицитом витамина D. Оценивали количество антральных фолликулов и сывороточные уровни АМГ, ФСГ, витамина D, кальция, фосфатов, щелочной фосфатазы и паратгормона до и после прохождения курса приема витамина D в дозе 300 000 МЕ. Уровни перечисленных выше клинико-лабораторных показателей оказались статистически значимо выше после приема витамина D. Статистически значимое снижение уровней ФСГ ( $P < 0,01$ ) и щелочной фосфатазы ( $P < 0,05$ ) наблюдалось после приема витамина D. Не было обнаружено статистически значимых корреляций между уровнем витамина D и числом антральных фолликулов, уровнем АМГ и уровнем ФСГ до и после приема препарата ( $P > 0,05$ ). Витамин D можно рассматривать в качестве адьювантной терапии для лечения бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом и дефицитом данного элемента [40].

### **1.5 Результативность лечения бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом и аномальными формами кариотипа**

В исследовании **Grin L и др.** оценивался репродуктивный потенциал пациенток с преждевременной недостаточностью яичников с аномальным кариотипом, проходящих лечение бесплодия. Фолликулярный рост был достигнут в 29% (89/307) циклов контролируемой овариальной стимуляции у 57% (28/49) пациенток. Попытки получения ооцитов были предприняты у

47% (23/49) пациенток, при этом доля успешных попыток извлечения ооцитов из расчета на пункцию составила 59,4% (41/69). Среднее количество извлеченных ооцитов -  $2,4 \pm 2,7$  из расчета на пациентку, а частота оплодотворения достигла 70,7% (29/41). Перенос эмбрионов выполнен у 8 пациенток, что привело к частоте живорождения из расчета на перенос эмбрионов -33,3% (3/9). 3-е пациенток родили здоровых детей (частота живорождения из расчета на пациентку- 6,1% (3/49)). Женщины с мозаичным синдромом Тернера имели большую продолжительность аменореи в анамнезе и более низкие шансы на адекватный рост фолликулов и получение ооцитов на пункции- 35,7% (5/14) пациенток, тогда как у пациенток с кариотипом 47XXX отмечена более кратковременная аменорея, а стимуляция функции яичников с отмеченным фолликулярным ростом проведена у 83,3% (5/14). Контролируемая овариальная стимуляция может дать возможность женщинам с ПНЯ с аномальным кариотипом достичь беременности с использованием собственных ооцитов [100].

### **1.6 Оценка эффективности методов верификации овариального резерва**

Отмечается значительная изменчивость клинико-лабораторных параметров у пациенток с различной степенью снижения овариального резерва. Таким образом, целесообразна детальная его верификация, с целью обоснования оптимального метода лечения бесплодия.

Анализ опубликованной литературы по проблеме достоверного установления резерва яичниковой ткани показал многократное сопоставление возможных методов его диагностики, отмечаемое с конца 1980-х годов. На сегодняшний день актуальность анализа указанной проблемы не снижается, в связи с необходимостью адекватной оценки функционального состояния яичников, являющегося одним из ведущих фактором эффективности методов лечения бесплодия. Функциональное состояние яичников находится под влиянием множества факторов, что

приводит к значительной вариативности биохимических и ультразвуковых параметров, снижающей их диагностическую ценность в определении истинного овариального резерва.

Остается открытым вопрос о факторах связанных с репродуктивными исходами у пациенток со сниженным овариальным резервом при использовании методов ВРТ.

В исследование **Li L и соавт.** было включено 900 женщин со сниженным овариальным резервом. Из 900 пациенток со сниженным овариальным резервом 138 женщин забеременели после первого цикла ЭКО/ИКСИ. АМГ был независимым предиктором частоты переноса эмбриона после поправки на вмешивающиеся факторы ( $P < 0,001$ ). Примечательно, что уровень АМГ, равный 0,355 нг/мл при этом обладал чувствительность 62,6% и специфичностью 65,6%. После проведения многофакторной логистической регрессии было показано, что возраст связан с частотой клинической беременности в циклах переноса эмбриона, а у женщин моложе 35 лет частота наступления беременности была выше по сравнению с женщинами старше 40 лет ( $p < 0,001$ ).

Уровень АМГ ассоциирован с количеством получаемых ооцитов и частотой выполняемого переноса эмбриона, а его сывороточный уровень равный 0,355 нг/мл является пороговым значением для прогнозирования возможности выполнения переноса эмбриона. У пациенток со сниженным овариальным резервом, дошедших до переноса эмбриона уровень АМГ не связан с частотой клинической беременности, а возраст является независимым фактором, влияющим на нее [205].

В работе **Yin WW и др.** показано, что уровень АМГ в сыворотке крови может изменяться в течение короткого промежутка времени после применения различных лекарственных препаратов. В частности, использование комбинированных оральных контрацептивов (КОК), метформина и кломифена цитрата приводит к снижению уровня АМГ, а применение ДГЭА и витамина D способствует повышению его уровня,

использование агонистов гонадолиберина опосредует динамическую вариабельность уровня АМГ. Все перечисленные изменения коррелируют с наличием СПКЯ, ожирением, возрастом пациенток и продолжительностью приема лекарственных средств. Воздействие этих препаратов следует учитывать при использовании АМГ в качестве маркера овариального резерва [186].

Ретроспективное исследование **Aslan K и соавт.** направлено на определение наиболее достоверного прогностического маркера овариального резерва при несоответствии между уровнем АМГ и количеством антральных фолликулов (КАФ) у пациенток со сниженным овариальным резервом. Всего было проанализировано 662 цикла ЭКО/ИКСИ. Уровень АМГ в сыворотке крови имеет большую прогностическую ценность с позиции результативности стимуляции функции яичников, при несоответствии с числом антральных фолликулов. При дискордантности данных о числе антральных фолликулов и сывороточном уровне АМГ у пациенток со сниженным овариальным резервом, ответ яичников на стимуляцию лучше у пациенток с высоким АМГ и низким КАФ, чем у пациенток с низким АМГ и высоким КАФ. Важна комплексная оценка показателей овариального резерва, основанная на клинико-лабораторных и инструментальных данных пациенток со сниженным овариальным резервом [207].

### **1.7 Современные методы ультразвуковой диагностики в оценке овариального резерва у пациенток со сниженным овариальным резервом**

Основанное на биопсии ткани яичников определение овариального резерва в различных клинических ситуациях не является обоснованным, в связи с примерно равной частотой достижения беременности среди женщин, имеющих фолликулярный и афолликулярный типы яичников. В связи с этим наиболее целесообразно выявление отрицательной корреляционной

взаимосвязи между сывороточной концентрацией эстрадиола (E2) и размерами определяемого пула фолликулов с использованием ультразвукового исследования.

Число примордиальных и количество развивающихся фолликулов находятся в прямой зависимости, таким образом при снижении числа dormantных фолликулов уменьшается объем когорты таковых, ежемесячно рекрутируемых в овуляторном цикле. Объективизация количественных и качественных характеристик пула фолликулов прижизненно невозможна, поэтому необходимы косвенные методы его определения. Ведущим методом, дающим возможность достоверно оценить состояние резерва яичниковой ткани, [189] наряду с гормональным обследованием является ультразвуковое исследование, подразумевающее оценку объема яичников и количества антральных фолликулов, которое может быть в ряде случаев дополнено доплерометрической оценкой показателей яичникового кровотока (ЦДК).

Объем яичника  $< 3 \text{ см}^3$  [189, 47] и визуализация менее 5 антральных фолликулов являются показателями сниженного овариального резерва [189]. Состояние пула резидуальных фолликулов достоверно соотносится с числом антральных фолликулов, определяемых при проведении трансвагинальной эхографии. Таким образом, в настоящее время является доказанным фактом прямая зависимость между количеством примордиальных и растущих фолликулов [189, 47].

Исследование фолликулярного пула сегодня оптимизировано, благодаря современным возможностям ультразвуковой диагностики [114]. Программа Sono AVC применяемая на ультразвуковой платформе 3D, автоматически идентифицирует фолликулы, находящиеся в данном яичнике и производит расчет их размера с высокой точностью [48]. Вышеописанная программа может быть использована в рамках проведения программы ЭКО. Оценивая объем фолликула с помощью Sono AVC, в сравнении со стандартной фолликулометрией, в качестве критерия для назначения триггера овуляции может улучшить результативность программ ВРТ путем

разработки персонифицированного подхода к стимуляции функции яичников и получения клеточного материала более высокого качества. Простота использования и высокая точность Sono AVC- основание к применению 3D сканирования в оценке динамических структур, в том числе фолликулов, так как объем, в данном случае имеет большее диагностическое значение в сравнении с определением диаметра [81].

Согласно критериям NICE, уровень АМГ и количество антральных фолликулов являются скрининговыми параметрами для определения оккультной формы преждевременной недостаточности яичников у женщин с бесплодием и нарушениями менструального цикла [131]. При этом ультразвуковые критерии овариального резерва имеют наибольшее значение в постановке диагноза и определения дальнейшей тактики ведения [142].

Данные исследования **Asifa Majeed и соавторов**, целью которого было выявление корреляционной связи между уровнем перифолликулярной васкуляризации и исходами программ ВРТ у пациенток с «бедным» овариальным ответом на стимуляцию функции яичников свидетельствуют о том, что показатели цветового доплеровского картирования при оценке фолликулярного кровотока соотносятся с количеством получаемых ооцитов, частотой оплодотворения, потенциалом развития эмбриона и частотой наступления беременности в циклах ЭКО [119].

Оптимальное время определения количества антральных фолликулов в рамках менструального цикла- предмет многочисленных дискуссий [105, 153]. Так, в работе **Dimitrios Mavrelos и соавторов**, проведенной на когорте женщин с бесплодием, показано, что число антральных фолликулов, определяемое в ранней и поздней фолликулярной фазе статистически достоверно различается (достигая 30%) [200].

Разница в диаметре антральных фолликулов может иметь важное прогностическое значение в определении «бедного» овариального ответа на стимуляцию функции яичников у пациенток с нормальными параметрами овариального резерва. Было обнаружено, что разница в размерах между

наибольшим и наименьшим антральными фолликулами более 3,5 мм обладает чувствительностью 75% в предикции данного состояния [25].

Цель исследования **Yu L и соавт.** состояла в том, чтобы изучить прикладную ценность трансвагинальной цветной доплерографии с использованием усовершенствованного алгоритма в диагностике идиопатической преждевременной недостаточности яичников.

В данное исследование было включено 80 пациенток с идиопатической ПНЯ, а также 40 пациенток группы сравнения, которым была проведена трансвагинальная доплерография в рамках диспансеризации. В то же время был предложен усовершенствованный алгоритм, основанный на технологии искусственного интеллекта и примененный к обработке ультразвуковых изображений. Сравнивались параметры доплерометрии яичниковых артерий пациенток обеих групп, включая пиковую систолическую скорость кровотока, конечную диастолическую скорость кровотока, индекс резистентности и пульсативный индекс. Степень различия результатов сегментации алгоритма в этом исследовании была значительно ниже, чем у Snake, Live wire и традиционного алгоритма среднего сдвига, в то время как относительная степень перекрытия (ROD) и коэффициент Дайса были ниже, при этом различия были достоверными ( $P < 0,05$ ). Медиолатеральный диаметр в контрольной группе составил  $2,87 \pm 0,31$  см, переднезадний -  $1,86 \pm 0,28$  см; тогда как в экспериментальной группе они равнялись  $2,11 \pm 0,36$  см и  $1,13 \pm 0,34$  см соответственно, что свидетельствует о значительных различиях между группами ( $P < 0,05$ ). Из 80 пациенток основной группы выявлено 132 случая нарушений кровотока в яичниковых артериях; среди 76 пациенток экспериментальной группы у 40 выявлены нарушения показателей васкуляризации яичниковых артерий, при этом частота выявления нарушений гемодинамики в экспериментальной группе была достоверно ниже, чем в контрольной группе ( $P < 0,05$ ).

Параметры доплерометрии яичниковой артерии в экспериментальной группе были значительно выше, чем в контрольной группе, а различия были

статистически значимыми ( $P < 0,05$ ). Результаты показали, что данные сегментации оптимизированного алгоритма в этом исследовании превосходили результаты сегментации других алгоритмов. Ультразвуковая трансвагинальная цветная доплерография на основе алгоритма сегментации искусственного интеллекта позволяет наглядно показать функциональное состояние и гемодинамику яичников.

Допплерометрические показатели скоростей кровотока яичниковой артерии могут использоваться в качестве параметров для диагностики ПНЯ [209].

### **1.8 Роль гистологической оценки состояния фолликулярного аппарата яичников при сниженном овариальном резерве с целью оптимизации лечения бесплодия**

Биопсия ткани яичников в качестве метода исследования их фолликулярного аппарата в настоящее время является дискуссионной. Проведение биопсии с последующим морфометрическим анализом может значимо дополнять данные о состоянии фолликулярного аппарата и может являться верифицирующим методом оценки различных этапов фолликулогенеза [1].

**Massin N. et al.** продемонстрировали высокую диагностическую значимость биопсии овариальной ткани в сравнении с подсчетом числа антральных фолликулов при использовании ультразвуковой сонографии [70].

Несомненное скрининговое значение определения ультразвуковых параметров и уровня АМГ в сыворотке крови с целью оценки состояния овариального резерва, не исключает необходимость проведения гистологического исследования, имеющего большую информативность в обсуждаемом аспекте, прежде всего в связи с возможностью определения раннего фолликулярного роста (фолликулы до 2 мм в диаметре) даже при малых размерах исследуемого образца. По причине отсутствия собственной

гормональной активности фолликулов малого диаметра их визуализация при ультразвуковом и гормональном исследовании не представляется возможной.

Во ходе лапароскопических операций, выполняемых по поводу бесплодия целесообразно выполнение биопсии яичниковой ткани в особенности у пациенток с подозрением на сниженный овариальный резерв для детальной оценки фолликулярного аппарата яичников и определения обоснованной тактики ведения в рамках лечения бесплодия [113].

Гистологическое исследование является «золотым стандартом» диагностики большого числа гинекологических заболеваний, а также может иметь проспективное значение в лечении бесплодия, особенно у женщин со сниженным овариальным резервом.

В исследовании **К. Kawamura и соавт** используется гистологическое исследование в качестве определяющей стадии комплексного лечения, в ходе которого определяется целесообразность проведения реимплантации фрагментированной овариальной ткани [101].

Таким образом, определение гистологического строения ткани, подвергаемой механической активации, представляется перспективным как с точки зрения фундаментальной науки, а также имеет прикладное значение, расширяя понимание гистологического строения ткани яичников у пациенток со сниженным овариальным резервом, находящихся на фоне приема заместительной гормональной терапии, позволяя установить корреляционную взаимосвязь между особенностями морфологических структур, определяемых в объеме исследуемой ткани яичника и репродуктивными исходами.

Гистологическое исследование ткани яичников при ПНЯ является окончательным методом оценки состояния фолликулярного аппарата и соответственно овариального резерва (Massin et al., 2004). Изучение данных морфологических изменений способствует пониманию степени нарушений фолликулогенеза, а также позволяет описать тип ПНЯ и определить фактическую этиологию заболевания (Massin et al., 2004).

Гистологическое строение яичников зависит от фенотипа ПНЯ. Однако большинство антральных фолликулов гистологически аномальны- они подвергаются атрезии, что определяется как частичное слущивание вплоть до полного отсутствия гранулезных клеток [171]. Хотя примордиальные фолликулы не доступны для УЗИ визуализации, оценка сывороточного АМГ позволяет выявить пациенток с ПНЯ, у которых с большей вероятностью сохранен фолликулярный аппарат. Данные пациентки перспективны с позиции вероятности последующего спонтанного или индуцированного фолликулярного роста. [32, 21].

### **1.9 Применение хирургических технологий в лечении бесплодия при сниженном овариальном резерве**

Сегодня, решение вопроса достижения беременности у пациенток с крайне низким овариальным резервом нельзя представить, не беря во внимание новые технологии, наиболее изученной из которых является хирургическая активация роста фолликулов.

Изначально предложенной и апробированной методикой инициации роста фолликулов является так называемая «in vitro activation» (IVA), изученная соавторами К. Kawamura и Н. Aaron и пр. она предполагала проведение двух последовательных оперативных вмешательств с интервалом в двое суток, во время которых происходила культивация яичниковой ткани с применением фармакологических активаторов сигнальных путей (PI3K-Akt-Foxo3, PTEN). Гистологическое исследование части фрагментов овариальной ткани при этом являлось определяющим этапом в решении вопроса о целесообразности проведения второго хирургического вмешательства- реимплантации «активированной» ткани яичников под серозную оболочку одной из маточных труб. Несмотря на необходимость проведения 2-х хирургических вмешательств в короткий промежуток времени при радикальном объеме одного из них (овариэктомии), использование фармакологических

активаторов с высокой стоимостью и не до конца изученными отдаленными последствиями на овариальную и другие ткани, находящиеся в непосредственной анатомической близости метод был воспринят и акцептирован более чем в 8 странах мира в связи с крайне актуальной клинической необходимостью поиска альтернативных донации ооцитов подходов к тактике ведения пациенток с крайне низким овариальным резервом. [97].

Далее этой же группой авторов предложена так называемая методика IVA без фармакологического воздействия («drug-free IVA»), которая была успешно реализована в клинической практике К. Kawamura и последователями в качестве возможного варианта восстановления фертильности при «бедном» ответе на стимуляцию функции яичников и ПНЯ, характеризующейся непродолжительным периодом предшествующей терапии бесплодия компенсируемой назначением ЗГТ аменореи. Реимплантация в контексте данной модификации проводилась в противоположный яичник тому, где было выполнено иссечение участка коркового слоя в предварительно сформированное пространство между корковым и мозговым веществом с применением с целью сопоставления краев разреза противоспаечных барьеров [109].

Колабораторами так же ведется изучение свойств метаболитов мембран клеток, таких как сфингозин- 1- фосфат, способных негативно воздействовать на передачу сигнала по пути Hippo в малых антральных и примордиальных фолликулах в качестве возможных неинвазивных методов активации фолликулярного роста. Нарушение сигнализации Hippo-пути реализуется в каскаде следующих изменений: стимуляция ядерной транслокации «yes»- ассоциированного белка (YAP) в клетках гранулезы путем усиления экспрессии фактора роста CCN2 (фактор роста соединительной ткани), что ведет к интенсивному росту вторичных фолликулов. При анализе результатов культивирования ткани яичников с применением сфингозин-1-фосфата в среде культивирования опосредовало

повышение экспрессии фактора роста CCN и рост вторичных фолликулов. Представлен патент на изобретение: **PCT/US2013/059800** [88].

Большинством авторов, частично или полностью акцептированных оригинальную методику японских исследователей ведется разработка модификаций метода с учетом особенностей страны проживания, в том числе клиничко-экономической эффективности. Большинство имеющихся изменений представлены сегодня модификацией этапа реимплантации.

Методика F. Fabregues подразумевает оптимизацию хода реимплантации с использованием хирургического клея- N.Нexyl-2-Суаноacrylate, который применяется как альтернатива шовному материалу. Коллеги применяют электрическую энергию (биполярную коагуляцию) в ходе иссечения 2/3 и более объема коркового слоя яичника с целью уменьшения кровопотери [75].

Первый опубликованный клинический случай использования активации *in vitro* (IVA) в Индии, представлен Mahajan et al. в 2019 году. Модификация включает хирургическое вмешательство, выполняемое с использованием минилапаротомного доступа, а реимплантация производится в мезосальпинкс [102].

Лапароскопическая аутоотрансплантация ткани яичника в рамках активации фолликулярного роста (IVA) проведена Lunding S и соавторами, выполнившими реимплантацию фрагментированной овариальной ткани субперитонеально с закрытием пространства хирургическим зажимом. К сегодняшнему дню представленные результаты данного варианта метода хирургической активации отсутствуют [36].

Особый взгляд на вопросы реализации репродуктивного потенциала при «бедном» ответе на стимуляцию функции яичников продемонстрировал A. Pellicer. Особая хирургическая тактика при этом вызывает интерес ввиду выделения ряда последовательных этапов вмешательства: иссечение коркового слоя яичника в рамках односторонней лапароскопической биопсии и фрагментация овариальной ткани до размеров не превосходящих 1 мм<sup>2</sup>. Затем происходит реимплантация фрагментов под остаточную часть

коркового слоя и брыжейку яичника с той же стороны. Таким образом, Pellicer производит биопсию коркового слоя яичника с одной из сторон с реимплантацией ткани субкортикально [79].

Далее профессор Pellicer изучил возможность применения мобилизованных из костного мозга аутологичных стволовых клеток (ASCOT) как возможных индукторов фолликулярного роста, вводя их эндоваскулярным доступом в сосуды яичника путем инфузии. При этом наступило 5 беременностей, в том числе 3 из них оказались спонтанными [38]. Полученные данные показывают, что фолликулярный рост может быть активирован при использовании стволовых клеток, костномозгового происхождения. Описанное действие может быть опосредовано способностью ткани яичника к аттракции недифференцированных стволовых клеток.

Китайскими учеными во главе с Chang X показано восстановление овариальной функции после хирургического вмешательства, подразумевающее механическое воздействие на овариальную ткань. Указанный способ характеризуется лишь выполнением биопсии и скретчинга ткани яичника без извлечения, фрагментации участков коркового слоя и их реимплантации [167].

Одним из основ хирургического воздействия в контексте возможной эффективности использования описанного метода является полимеризация актина под влиянием фрагментации овариальной ткани, нарушение функционирования сигнального пути Hippo, ведущее к увеличению уровней ростовых факторов CCN и ингибиторов апоптоза BIRC 1,7 [17].

Недавние исследования показали, что механическая фрагментация коркового слоя и дреллинг яичников могут способствовать росту фолликулов у пациенток с ПНЯ и синдромом поликистозных яичников. Общим элементом, характерным для этих методов лечения, является механическое нарушение архитектоники тканей внеклеточного матрикса яичников. Предполагается, что упрощенная процедура лапароскопического

разреза поверхности всего яичника (WOLI) может обеспечить изменения внутрияичникового гомеостаза, необходимые для активации резидуальных фолликулов у пациенток с крайне низким овариальным резервом.

В исследование включены женщины, с несколькими отменами циклов стимуляции функции яичников в анамнезе из-за отсутствия роста фолликулов. Всего в период с 2015 по 2017 год 6 пациенткам была проведена процедура WOLI, описанная выше. После операции ответ яичников и наличие фолликулярного роста контролировали в течение 90 дней при использовании гонадотропной стимуляции или в случае наблюдения в естественных менструальных циклах. После лечения у 5 из 6 пациенток наблюдалось значительное повышение уровня эстрадиола в сыворотке крови и рост фолликулов ( $p = 0,001$ ). У каждой из этих пациенток было получено по несколько ооцитов, с последующим переносом эмбрионов у 4 из них ( $p = 0,010$ ). В среднем промежуток времени от процедуры WOLI до забора ооцитов путем трансвагинальной пункции составил 24 дня (от 11 до 58 дней). В результате переноса эмбриона 2 пациентки забеременели и родили здоровых детей, в 1 случае наступила биохимическая беременность. У 1 пациентки эмбрионы криоконсервированы, ожидается перенос.

Стандартизированная процедура WOLI оптимизировала ответ яичников на стимуляцию их функции у большинства пациенток с крайне низким овариальным резервом, что может быть перспективно с позиции реактивации яичниковой ткани у пациенток со сниженным овариальным резервом и преждевременной недостаточностью яичников [208].

В связи с высокой актуальностью, развитием и внедрением технологий сохранения фертильности по различным показаниям на первый план выходит безопасность выполняемых процедур, в том числе хирургического этапа лечения. В работе **Meng L и др.** изучена кривая обучения хирургов, выполняющих лапароскопическую трансплантацию овариальной ткани у женщин с преждевременной недостаточностью яичников различного генеза.

Лапароскопическая трансплантация ткани яичника в целом является безопасной, учитывая низкую частоту описанных в литературе послеоперационных осложнений, равную 1,55%. Метод трансплантации не может быть ключевым фактором, определяющим длительность операции. Эффективная командная работа в ходе вмешательства более важна для сокращения длительности манипуляции, чем хирургическая техника сама по себе [115].

В работе **Patel NH и др.** рассматривается клинический случай пациентки 34 лет с ПНЯ, которой была проведена немедикаментозная активация фолликулов *in vitro* с последующей ауто трансплантацией, что привело к клинической беременности. Ауто трансплантацию выполняли путем лапароскопии, между правым яичником и маточной трубой создавали небольшое окно (2 см × 2 см), а стрипы кортикальной ткани яичника переносили в него через модифицированную трубку Райла. Окно ушивалось тонким викриловым швом (2.0.) Это первый клинический случай в Индии, который показывает, что процедура эффективна и может быть воспроизводима у пациенток с ПНЯ [61].

Данные о модификациях хирургической активации яичниковой ткани, используемых на сегодняшний день суммированы в работе **К Kawamura и соавт.** с представленной видеодемонстрацией этапов лечения [https://youtu.be/Eg37o\\_brTGI](https://youtu.be/Eg37o_brTGI) [178].

Основой первого вмешательства, проведенного в нашей стране академиком РАН Л.В. Адамян 06.03.2019 года также явилась активация функции яичников через хирургическое воздействие (Патент на изобретение № 2748246 «Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников для лечения преждевременной недостаточности яичников и восстановления овариальной функции»). Таким образом представлены собственные подходы к тактике ведения, подразумевающей выполнение хирургического этапа лечения в части определения зоны биопсии овариальной ткани под оптическим увеличением, микрохирургического

иссечения минимально возможного участка коркового слоя яичников, формирования пространства для реимплантации фрагментированной ткани яичника, а также наложение швов до сопоставления краев разреза с целью оптимизации этапа реимплантации.

## **Глава 2. Материалы и методы исследования**

### **2.1 Общая характеристика исследования**

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 ( 14.11.2018 г.). Все участницы исследования 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"

#### **2.1.1 Критерии включения и исключения из исследования**

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 экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с использованием донорских ооцитов как единственно возможный вариант достижения беременности.

Со всеми пациентками полностью обсуждены аспекты планируемого лечения, необходимого объема обследования, рассмотрена и уточнена эффективность изучаемого метода комплексного лечения, подразумевающего хирургический этап в зависимости от возраста, данных анамнеза, текущих клинико-лабораторных показателей, а также на основании данных литературы и международного опыта с последующим получением информированного добровольного согласия на участие в исследовании.

## 2.2 Дизайн исследования

Для задач №1, №2, №4

- Проанализировать данные анамнеза, параметры клинического и гормонального статуса у обследуемых пациенток со сниженным овариальным резервом
- Определить клинико-лабораторные показания к использованию хирургического этапа лечения в исследуемой группе с целью разработки критериев отбора пациентов для его применения.
- Оценить возможности хирургической активации яичников в группе пациентов с нарушениями раннего эмбриогенеза- при отсутствии эмбрионов пригодных для переноса при предыдущих попытках ЭКО.

Ретроспективное исследование случай-контроль. (Задача №1, №2)

Контролируемое клиническое исследование с контролем по принципу «до и после». (Задача №4)

Данные анамнеза, параметры клинического и гормонального статуса

Параметры эмбрионального развития:

- количество полученных ооцитов
- частота оплодотворения ооцитов
- частота бластуляции

Конечные точки исследования:

- Задача №1, №2 ОШ сниженного овариального резерва в зависимости от клинико-лабораторных данных пациенток.
- Задача №4. Средние параметры раннего эмбриогенеза в исследуемой группе.

**Пациенты:**

- Исследуемая группа: пациенты со сниженным овариальным резервом (n=89); Пациенты с отсутствием эмбрионов пригодных для переноса при предыдущих попытках ЭКО (n=12).

- Группа сравнения: пациенты ЭКО с трубно-перитонеальным фактором бесплодия с нормальным ответом на овариальную стимуляцию (n=35)

Для задач №5. Оценить результативность проведенного комплексного лечения по следующим параметрам: динамика изменений гормональных показателей пациенток (увеличение уровня E2, снижение уровня ФСГ и ЛГ), числа антральных фолликулов; частота наступления беременности как спонтанной, так и с применением методов вспомогательных репродуктивных технологий.

Проспективное когортное исследование.

Исходы беременности из расчета на цикл стимуляции:

- клиническая беременность (%)
- неразвивающаяся беременность в I триместре (%)

Эмбриологические показатели:

- количество аспирированных ооцитов
- количество зрелых ооцитов
- частота оплодотворения ооцитов
- качество эмбрионов

Группы пациентов:

- Группа 1 – Пациенты с крайне низким овариальным резервом (n=89)

Конечные точки исследования:

- ОШкор динамики изменений гормонального статуса (повышение уровня E2, снижение уровня ФСГ и ЛГ) в изучаемых группах.
- ОШкор динамики изменений ультразвуковых параметров овариального резерва- количества антральных фолликулов.
- ОШкор наступления беременности в группе исследования

### **2.3 Объем выборки исследования**

Объем выборки исследования, представленный 89-ю пациентками, включенными в исследование, а также использование современных методов обследования, диагностики и статистической обработки данных определяют достоверность выполненной диссертационной работы.

### **2.4 Клинические и лабораторные методы исследования**

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

Предварительное полное клинико-лабораторное обследование с использованием общеклинических и специальных методов проводилось амбулаторно в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 31.07.2020 N 803 н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению".

Анамнестические данные, показатели клинического обследования и гормонального статуса у пациенток, включенных в настоящее исследование, были детально нами изучены.

При рассмотрении анамнестических данных заостряли внимание на перенесенных соматических заболеваниях, так или иначе влияющих на репродуктивную функцию. Анализировалось наличие и структура перенесенных заболеваний щитовидной железы, инфекционно-воспалительных процессов, нарушений метаболического профиля и пр. Прицельно изучались наследственные факторы такие как: возраста наступления менопаузы и особенности репродуктивного анамнеза матерей, а также родственниц второй степени родства (при наличии доступных данных), особенностей периода гестации и родов (возможное влияние

факторов окружающей среды, вредных привычек, стрессов, профессиональных вредностей и пр).

Гинекологическое исследование подразумевало оценку состояния наружных половых органов, включая характер полового оволосения, наличие изменений шейки матки. При выполнении двуручного влагалищно-абдоминального исследования устанавливались размер и форма матки, отмечались ее подвижность, болезненность, смещаемость, а также наличие пальпируемых образований в области придатков матки, и пр.

Перед включением в исследование, а также перед реализацией программы ЭКО и по показаниям проводили анализ параклинических данных (клинический, биохимический анализы крови, исследование параметров гемостаза и др.), а также данных инструментальных исследований.

В связи с необходимостью оценки наличия мужского фактора бесплодия, а также степени его тяжести с целью подбора оптимального метода коррекции проводился анализ параметров спермограммы в соответствии с нормативами Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), принятыми в 2010г, а также оценка MAR теста (mixed agglutination reaction). Определение морфологической структуры мужских половых клеток проводилось в соответствии с критериями, предложенными Kruger T.F. в 1999г. и одобренными ВОЗ.

Гормональное исследование проводилось в Клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И.Кулакова» МЗ РФ (руководитель лаборатории - д.м.н. Иванец Т.Ю.). 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, для решения вопроса о возможности,

целесообразности, сроках проведения стимуляции функции яичников, а также для подбора протокола и оптимальных стартовых доз гонадотропинов исследовали уровни фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, пролактина, эстрадиола, общего тестостерона, андростендиона, 17-оксипрогестерона, кортизола, тиреотропного гормона, свободного тироксина, соматотропного гормона, дегидроэпиандростерона сульфата (ДЭАС) 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 с целью исключения хромосомных нарушений, а также определение статуса генов андрогенового рецептора (AR)- число CAG-повторов и FMR1-количество CGG-повторов методом флуоресцентной ПЦР.

## **2.5 Инструментальные методы исследования**

УЗИ органов малого таза выполняли в отделении ультразвуковой и функциональной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (руководитель отделения – д.м.н., Костюков К.В.) на аппарате GE Voluson E10 (США), используя трансвагинальный датчик с частотой 9,0 МГц. При проведении ультразвукового исследования органов малого таза определяли объем яичников и число антральных фолликулов, также оценивали состояние миометрия, шейки и полости матки.

## 2.6 Хирургический этап лечения

Всем обследованным пациенткам после получения информированного добровольного согласия выполнено оперативное вмешательство в объеме: лапароскопия, ревизия органов малого таза. 13 пациенток были исключены из исследования в связи с наличием сопутствующих гинекологических заболеваний впервые диагностированных интраоперационно. 89-ти женщинам в ходе хирургического вмешательства выполнена специфическая детекция зоны биопсии овариальной с учетом минимального кровоснабжения а также оптимальной толщины, иссечение участка коркового слоя в области верхнелатерального полюса обоих яичников с последующей его фрагментацией и одноэтапной реимплантацией в толщу яичника, гистероскопия, биопсия эндометрия, хромогидротубация [181, 182].

Лапароскопия выполнялась по стандартной методике под общей анестезией (эндотрахеальным наркозом), с использованием лапароскопа Hopkins II (0°) фирмы KarlStorz, Германия. Для проведения операции использовали электрохирургический генератор Autocon 350 (KarlStorz), работающий в непрерывном режиме ультрапульсации. В ходе оперативного вмешательства не были применены 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 урогенитального зонда типа С-Пайпель.

В послеоперационном периоде осуществляли динамическую оценку состояния больных, в том числе по результатам контрольных клинических исследований: клинический анализ крови, гемостазиограмма, биохимическое исследование, общий анализ мочи и др.

Проводилась антибактериальная, инфузионная и другие виды терапии по показаниям соотносимо с окончательным объемом и сроком выполнения оперативного вмешательства, профилактика тромбоэмболических осложнений, а также ранняя послеоперационная физиотерапия.

## **2.7 Специальные методы исследования материала, полученного в ходе оперативного вмешательства**

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 ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в 1-ом патологоанатомическом отделении (зав. отд. — д.м.н. А.В. Асатурова) с помощью микроскопа Axio Scope A1 («Karl Zeiss», Германия). Иммуногистохимическое исследование проведено с использованием биомаркеров LATS1 (клон ab39250, RTU, «Abcam», США), MST1 (клон phosphor Thr183, «Abcam», США), YAP (клон D8H1X XP, «Abcam», США) и PTEN (клон A2B1, «Abcam», США) по стандартной методике на автоматическом иммуногистостейнере Ventana Benchmark Ultra («Roche», Швейцария). Все препараты оцифрованы с помощью сканирующего микроскопа Aperio («Leica», Германия). Подсчет экспрессии осуществлялся количественным методом с использованием программного обеспечения ImageJ (открытый доступ), вычисление интенсивности экспрессии оценивалось с помощью определения оптической плотности и измерялось в условных единицах (УЕ), от 0 до 255. Для унификации полученных результатов количественная оценка экспрессии ранжирована и переведена в балльную систему (от 0 до 3 баллов, где оптической плотности 0 УЕ

соответствовала интенсивность экспрессии 0 баллов, 1—20 УЕ — 1 балл (слабая экспрессия), 20—60 УЕ — 2 балла (умеренная экспрессия), 60 и более УЕ — 3 балла (сильная экспрессия) в соответствии с данными D.G. Fuhrich и соавт [183].

## **2.8 Проведение программы ЭКО в рамках комплексного лечения бесплодия**

После оперативного вмешательства ряду пациенток проведена стимуляция функции яичников.

При проведении программы ЭКО в различные сроки послеоперационного периода (при наличии условий и показаний) использовалась стимуляция функции яичников с применением препаратов рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рекФСГ), человеческих менопаузальных гонадотропинов (чМГ), агонистов или антагонистов гонадолиберина (а-ГнРг, ант-ГнРг). Выбор протокола овариальной стимуляции осуществлялся персонафицированно с учетом возраста, анамнестических данных, в том числе анализ хода и результативности предшествующих попыток ЭКО, полученных интраоперационных данных в ходе выполнения хирургического этапа лечения, а также на основании сопоставления с имеющимся международным клиническим опытом. Обоснование подходов к выбору протоколов стимуляции функции яичников изложено в главах результаты исследования и обсуждение полученных результатов.

В данном исследовании применялись несколько вариантов стимуляции суперовуляции у обследуемых пациенток:

- Протокол с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (антГнРГ);
- «Короткий» протокол с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (аГнРГ);
- «Flare-up»- протокол с использованием препаратов аГнРГ.

- Стимуляция функции яичников в лютеиновую фазу менструального цикла
- Протокол двойной стимуляции функции яичников «DuoStim»

Были изучены клинические и эмбриологические аспекты для определения эффективности реализации программы ЭКО у пациенток с крайне низким овариальным резервом после оперативного лечения.

В дальнейшем в зависимости от исхода программы ЭКО/ при наступлении спонтанной беременности в послеоперационном периоде был проведен ретроспективный анализ данных анамнеза, клинико-гормонального статуса, интраоперационной верификации основного и сопутствующих сниженному овариальному резерву заболеваний, гистологической структуры яичниковой ткани и слизистой полости матки, детализация и особенности хода оперативного вмешательства в рамках хирургического этапа лечения с расчетом коэффициента сопряженности Пирсона (С) с выявлением силы связи между фактором и исходом.

Процедура ЭКО состояла из следующих этапов:

- обследование супружеских пар (партнеров);
- стимуляция функции яичников;
- трансвагинальная пункция фолликулов яичников с целью забора ооцитов;
- оплодотворение ооцитов с помощью ИКСИ;
- культивирование эмбрионов *in vitro*;
- перенос эмбрионов в полость матки;
- поддержка посттрансферного периода;
- диагностика ранних сроков беременности.

Выбор метода оплодотворения осуществлялся эмбриологом в зависимости от параметров спермограммы супруга пациентки и количества получаемых ооцитов в день ТВП.

На следующий день после аспирации производилась верификация и оценка фертилизации. Все манипуляции в рамках эмбриологического этапа проводились с использованием одноэтапных сред культивирования фирмы «СООК» (Австралия).

Перенос эмбрионов в полость матки проводился в рамках исследования одним и тем же врачом акушером-гинекологом у всех пациенток без применения анестезиологического пособия. Пациентка находилась в гинекологическом кресле. Шейка матки обнажалась в гинекологических зеркалах. Эмбриолог проводил выбор эмбриона в пользу лучших морфокинетических свойств с учетом всего наблюдаемого периода раннего эмбрионального развития. Далее эмбриолог передавал лично в руки врачу акушеру-гинекологу катетер с селективным эмбрионом, после чего он проводился через канал шейки матки в полость, где выводился из катетера под ультразвуковым контролем. Перенос выполняли в большинстве случаев посредством мягкого катетера фирм «Wallace» или «СООК» Во всех случаях выполнялся селективный перенос одного эмбриона в полость матки на 5-е сутки культивирования. Оставшиеся эмбрионы «хорошего» качества (при наличии) были подвергнуты криоконсервации.

Следуя последним клиническим рекомендациям по ведению периода после переноса эмбриона в том числе для снижения частоты преклинических потерь беременности, использовался препарат натурального прогестерона спустя 24 часа после трансвагинальной пункции в прогредидентной дозе от 200 до 400 мг/сутки ко дню переноса эмбриона в полость матки.

Определения концентрации В-ХГЧ в сыворотке крови через 14 дней после переноса эмбриона верифицировало наличие беременности. Клиническая беременность устанавливалась на основании проведения ультразвукового исследования в следующие сроки посттрансферного

периода: через 21 день после переноса эмбриона с оценкой наличия плодного яйца, а спустя 10 дней по визуализации эмбриона/эмбрионов с определяемым сердцебиением.

## **2.9 Методы статистического анализа**

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.

### Глава 3. Общая характеристика пациенток со сниженным овариальным резервом. (Результаты собственных исследований)

#### 3.1 Клиническая характеристика пациенток, включенных в исследование

Проведено проспективное клинико-лабораторное обследование 89 пациенток репродуктивного возраста с крайне низким овариальным резервом.

Все пациентки предъявляли жалобы на отсутствие наступления беременности, с отсутствием эффекта от проводимого ранее лечения, включая методы ВРТ. Единственно возможным вариантом реализации репродуктивной функции, рекомендованным репродуктологом до первичного обращения в Центр было проведение программы ЭКО с использованием донорских ооцитов. Помимо бесплодия отмечалась значительная вариабельность клинических проявлений дефицита женских половых гормонов.

Средний возраст обследуемых пациенток, основным поводом обращения которых явилось первичное или вторичное бесплодие, составил  $36 \pm 6,1$  года (представлено на рисунке 1). Оценка массы тела показала средний индекс у обследованных больных равный  $23,5 \pm 2,3$  кг/м<sup>2</sup>.

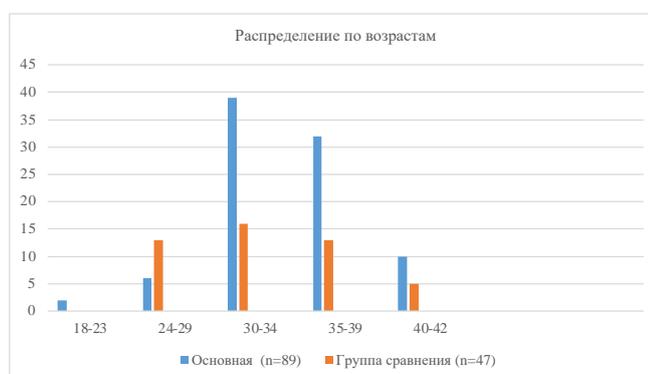


Рисунок 1- Распределение пациенток, включенных в исследование по возрастам

Анализ возможных нарушений различной степени выраженности в оси гипоталамус-гипофиз- яичники с определением сохранности системы обратных связей проводился на основании данных определения концентраций: ФСГ, ЛГ, эстрадиола, АМГ, ТТГ и др. Результаты их уровней подвергались интерпретации с учетом нормативным показателям лаборатории. Проводилось количественное определение аутоантител к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО), тиреоглобулину (АТ-ТГ) и к ТТГ (АТ-ТТГ) определяли в качестве тиреоидного скрининга.

Проанализированы данные анамнеза, клинико-гормональный статус пациенток, включенных в исследование, с выявлением ряда характерологических особенностей.

Представляет особый интерес детализация данных о возможных определяемых пациентками самостоятельно причинах развития заболевания. Так, пациентки наиболее часто указывали на влияние стрессовых факторов как ведущую причину своего состояния – отмечено в 28,76% случаев, однако большинство пациенток не смогли субъективно определить непосредственную причину развития снижения овариального резерва – выявлено у 71,24% женщин, включенных в исследование.

Средняя продолжительность бесплодия у обследуемых больных составила  $3,7 \pm 1,6$  года. При проведении детальной оценки анамнеза с точки зрения реализации репродуктивной функции определено что до манифестации заболевания беременности были у 36,1% (32/89) обследованных женщин. Суммарно у женщин, включенных в исследование, имела место 41 беременность, 31,2% (13/41) из которых завершились путем самопроизвольных срочных родов, при этом состояние здоровья новорожденных было удовлетворительным. Необходимо отметить, что в каждом 3-м случае было выполнено искусственное прерывание беременности по желанию женщины, в 38,8% (16/41) случаев исход беременностей характеризовался наличием самопроизвольных выкидышей.

На основании изучения данных репродуктивного анамнеза до начала манифестации заболевания установлено, что репродуктивная функция оказалась реализована в 14,6% (13/89) случаев (представлено на рисунке 2).

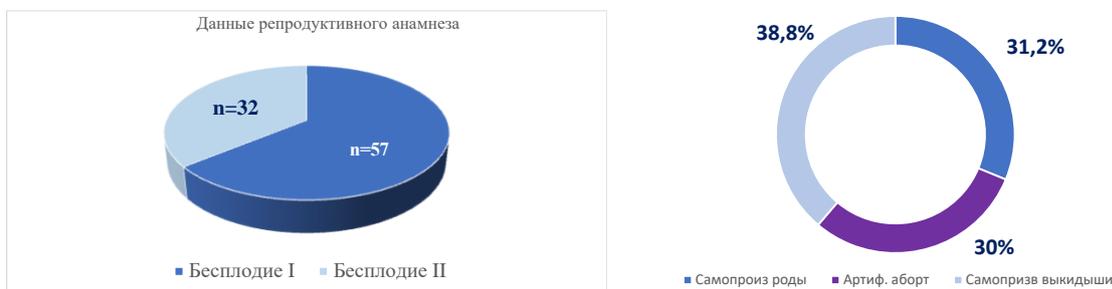


Рисунок 2 - Данные репродуктивного анамнеза пациенток, в том числе репродуктивные исходы женщин, включенных в исследование

Клиническое обследование включало изучение особенностей становления менструальной функции и анализ значимых изменений менструального цикла до начала заболевания. Менархе наступало в возрасте от 11 до 16 лет (в среднем в  $12,9 \pm 0,8$  года). Нарушения менструального цикла по типу олигоменореи с начала менструального цикла выявлены у 4 пациенток, что составило 4,5%. В большинстве случаев- 95,5% (85/89) менструальный цикл в течение 10 лет от менархе был регулярным со средним межменструальным интервалом, равным  $26,2 \pm 2,3$  дня, при этом длительность менструального кровотечения составила  $3,9 \pm 1,3$  дня.

Примечательно, что у 31% пациенток за 2-3 года до первичного обращения по поводу отсутствия наступления беременности отмечены следующие изменения межменструального интервала: укорочения (чаще) или удлинения (реже) продолжительности менструального периода на 3-4 дня, определяемые также на момент исследования. У 53,9%- 48/89 пациенток ритм менструаций на момент включения в исследование был сохранен, 46,1% (41/89) пациенток предъявляли жалобы на вторичную аменорею длительностью от 3 месяцев до 10 лет (показано на рисунках 3 А,Б; 4).



Рисунок 3 - Сохранность ритма менструаций у пациенток, включенных в исследование (А). Длительность нарушений менструального цикла у пациенток с вторичной аменореей (Б)

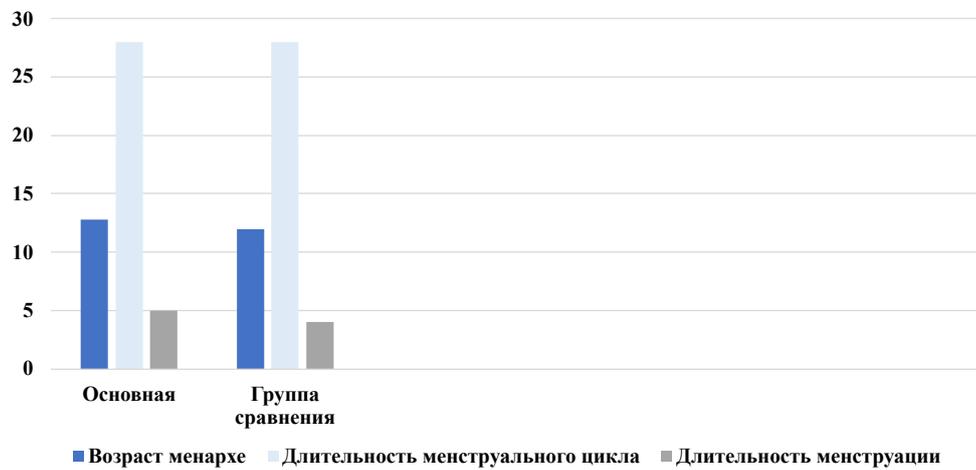


Рисунок 4- Оценка менструальной функции пациенток, включенных в исследование

Таблица 1- Характеристика менструальной функции пациенток обеих групп, включенных в исследование

Группы	Возраст менархе		Длительность цикла		Длительность менструации	
Основная	12.9±0.8	p=0.4856	26.2±2.3	p=0.9236	3,9±1,3	p=0.9329
Сравнения	11.97±1.17		28.23±1.17		4.53±0.71	

Анализ данных семейного анамнеза выявил следующие закономерности: у матерей женщин, включенных в исследование, выявлено угасание функции яичников в возрасте до 45 лет в 28,08% (25/89) случаев, что составляло понятие ранняя менопауза у 11 из них (12,3%), а у 11 (4,4%) – преждевременная недостаточность яичников (показано на рисунке 5). При детальном рассмотрении данных о менструальной функции у родственниц 2-й степени родства отмечено раннее выключение функции яичников в 5,2%.

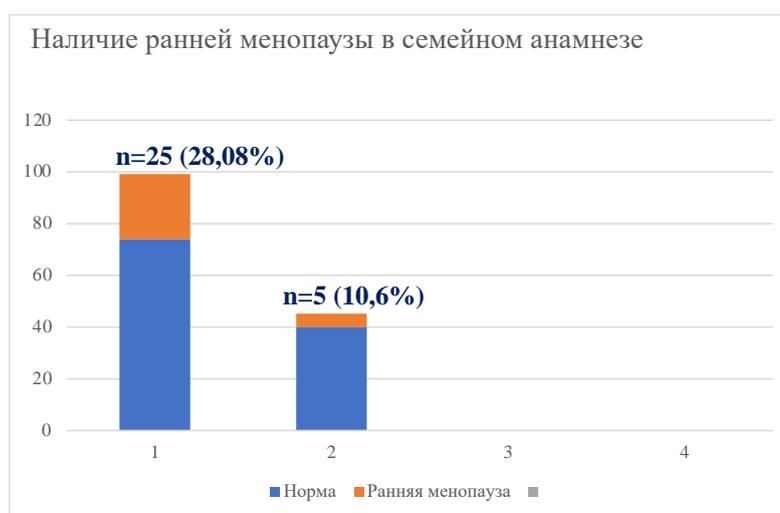


Рисунок 5 - Изучение семейного анамнеза по ранней менопаузе у обследованных больных

Анализ жалоб пациенток, помимо отсутствия наступления беременности, показал, что вегетососудистые проявления дефицита женских половых гормонов отмечали 12 пациенток вне приема заместительной терапии, при этом у 4 из них отмечались периодические приливы жара, преимущественно в ночное время даже на фоне приема лекарственных препаратов.

Психоэмоциональные расстройства, характеризующиеся депрессивными состояниями (астенизации, раздражительности, тревожности), а также изменения когнитивных способностей в виде снижения памяти и концентрации внимания определены у 78,3% (70/89) пациенток. 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 (показано на рисунке 6).

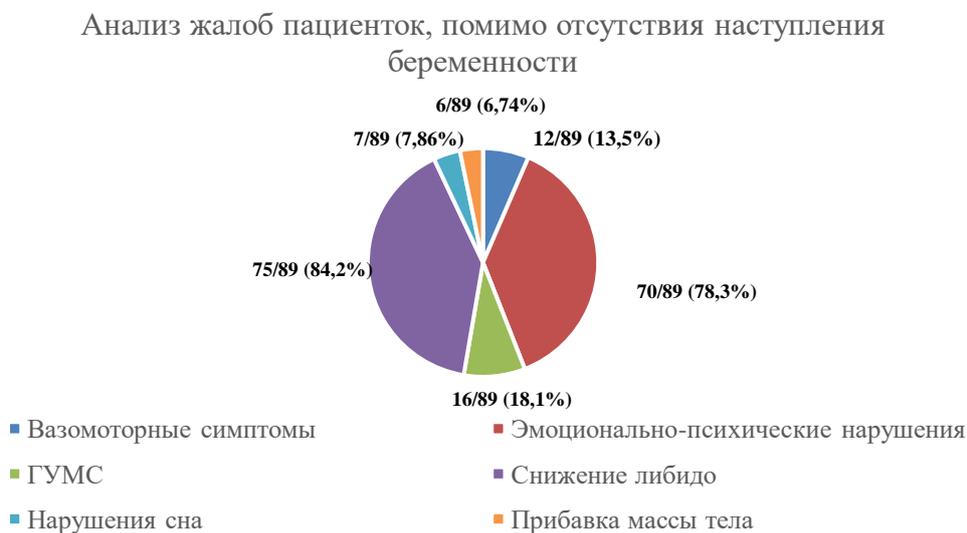


Рисунок 6 - Анализ жалоб пациенток, помимо отсутствия наступления беременности

В структуре экстрагенитальной патологии обращают на себя внимание заболевания щитовидной железы, выявляемые статистически значимо чаще в исследуемой группе (продемонстрировано на рисунке 7).



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

Проведенное гормональное обследование у всех пациенток, включенных в исследование, выявило: средний базальный уровень ФСГ у женщин с сохраненным ритмом менструаций составил  $8,5 \pm 2$  МЕ/л, ЛГ –  $6,3 \pm 4,4$  МЕ/л, что несколько превосходило нормативные показатели для ранней фолликулярной фазы менструального цикла женщин репродуктивного возраста. У пациенток, имеющих заместительную менструалоподобную реакцию на фоне приема заместительной гормональной терапии в связи с нарушениями менструального цикла по типу олиго-аменореи продолжительностью до 1,5 лет средний уровень гонадотропинов составлял: ФСГ-  $11,2 \pm 3,6$ ; ЛГ-  $9,4 \pm 4,7$  МЕ/л; при отсутствии самостоятельных менструаций более 1,5-2 лет сывороточные уровни ФСГ и ЛГ составили-  $43,2 \pm 10,6$ ; ЛГ-  $34,2 \pm 9,7$  МЕ/л соответственно. Примечательно, что у 10,1% (9/89) пациенток отмечалось изменение соотношения ФСГ/ЛГ в пользу сывороточного уровня ЛГ, равное 1,15-1,7.

Базальная концентрация эстрадиола у всех пациенток с сохраненным менструальным циклом (48/89) в среднем составила  $189,27 \pm 62,3$  пмоль/л, у пациенток с нарушениями менструального цикла до начала приема заместительной гормональной терапии была равной  $37,2 \pm 24,8$  пмоль/л. Средние показатели общего тестостерона в сыворотке крови обследуемых больных составили  $0,98 \pm 0,88$  нмоль/л. Средняя сывороточная концентрация пролактина оказалась равной  $334,3 \pm 106,8$  мМЕ/л.

Уровень АМГ равнялся в среднем  $0,13 \pm 0,09$  нг/мл, что достоверно ( $p < 0,001$ ) ниже значений ( $2,6 \pm 1$  нг/мл), характерных для женщин с нормальным ритмом менструаций в данной возрастной группе.

Уровень ТТГ в среднем составил  $3,9 \pm 0,8$  мМЕ/л. Средний уровень антител к ТГ составил  $19,4 \pm 4,7$  МЕ/л и находился в пределах референсных значений. Антитела к ТПО в среднем по группе составили  $9,4 \pm 3,5$  МЕ/л, что так же не выходило за рамки нормативных показателей. Уровень ТТГ в среднем составил  $3,9$  мМЕ/л, в том числе в сочетании с ультразвуковыми

признаками диффузных изменений щитовидной железы по типу ХАИТ, что статистически значимо отличалось от пациенток группы сравнения (приведено на рисунке 7).

Все пациентки, включенные в исследование, имели нормальный кариотип, а число CGG- повторов в гене FMR1 не доходило до уровня премутации.

## **Глава 4. Предоперационная подготовка и выполнение хирургического этапа лечения**

### **4.1 Предоперационное гормональное лечение**

Всем пациенткам, включенным в исследование, была назначена заместительная гормональная терапия с использованием препаратов содержащих эстрадиола валерат 2 мг + дидрогестерон 10 мг минимум на 2-3 менструальных цикла до проведения хирургического этапа лечения с целью нормализации уровней гонадотропинов и эстрадиола и повышения эффективности комплексного лечения. При наличии состояния пациенток на фоне ЗГТ в течении различного времени, предшествующего первичному обращению изучалась переносимость терапии, дозовый режим, пути введения лекарственных средств- пероральный либо трансдермальный, а также эффективность с позиции динамических изменений сывороточных уровней гонадотропинов и эстрадиола, а также наличие значимого клинического эффекта в виде нивелирования симптомов климактерического синдрома (при их наличии).

С нашей точки зрения, вышеописанные данные являются одним из основных клинико-лабораторных, наряду с длительностью нарушений менструального цикла, предикторов эффективности последующей терапии и могут указывать на целесообразность дальнейшего проведения хирургического этапа лечения. При выявлении пациенток, получающих терапию без соответствующей регуляции менструального цикла (отсутствие адекватной ЗМПР), с наличием симптомов дефицита эстрогенов, резистентных к проводимой терапии, при неудовлетворительной ее переносимости были изменены формы, дозовый режим и пути введения лекарственных препаратов. Так, при отсутствии эффекта от пероральной ЗГТ нами была назначена терапии с использованием трансдермальных форм эстрогенов, обладающих более высокой биодоступностью, и таким образом

обеспечивающих значимый клинический эффект при использовании меньших дозировок. В подавляющем большинстве случаев в рамках предоперационного гормонального лечения были использованы таблетированные лекарственные формы для перорального приема, содержащие 2 мг эстрадиола валерата и 10 мг дидрогестерона- у 76/89 (85,39%) пациенток.

## **4.2 Выполнение хирургического этапа лечения**

**Показания к операции:** бесплодие, ассоциированное с крайне низким овариальным резервом, настойчивое желание реализовать репродуктивную функцию с использованием собственных гамет, в сочетании с отсутствием эффекта от проводимого ранее консервативного лечения, включая методы ВРТ.

В исследование было включено 102 пациентки со сниженным овариальным резервом, страдающие бесплодием, с отсутствием эффекта от проводимого ранее консервативного лечения. После полного клинико-лабораторного обследования всем пациенткам было выполнено оперативное вмешательство в объеме: Лапароскопия, ревизия органов малого таза, гистероскопия, биопсия эндометрия. При наличии условий и показаний был выполнен одноэтапный хирургический метод активации функции яичников: биопсия коркового слоя обоих яичников с последующей фрагментацией и одноэтапной реимплантацией в толщу яичника.

13 пациенток были исключены из исследования в связи с наличием сопутствующих гинекологических заболеваний, впервые верифицированных интраоперационно.

12 пациенток в данной выборке имели в анамнезе неудачные попытки ЭКО с получением ооцитов и эмбрионов низкого качества.

В послеоперационном периоде при наличии условий и показаний проводилась стимуляция функции яичников, а также оценка вероятности наступления спонтанной беременности.

### **4.3 Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников**

Разработанный нами хирургический метод активации функции яичников подразумевает под собой: углубленное изучение структур яичников с использованием методов визуализации (УЗИ с оценкой кровотоков). Лапароскопия, иссечение участка коркового слоя по собственной методике, создание ложа для реимплантации, фрагментация биопсированной части яичника, унилатеральная реимплантация фрагментированных участков с обязательным гистологическим контролем 10-20% каждого «стрипа». Операция проводится с использованием только механической энергии и не предполагает использования гемостатических и инородных материалов. Одновременно для исключения других факторов бесплодия и повышения эффективности лечения проводится гистероскопия, биопсия эндометрия, хромогидротубация. Верификация диагноза выполняется по результатам гистологического исследования биопсированной ткани яичника и эндометрия с морфофункциональной оценкой.

### **4.4 Ход операции**

Проводится ревизия органов брюшной полости и органов малого таза. Обращается особое внимание на париетальный и висцеральный листки брюшины малого таза с выявлением очагов наружного генитального эндометриоза или карманообразных дефектов брюшины (синдрома Аллена-Мастерса- показано на рисунке 8). В ходе операции у ряда пациенток выявлены сопутствующие гинекологические заболевания. Определены особенности состояния эндометрия и полости матки: изменение длины и

формы у 56% пациенток, усиление сосудистого рисунка у трети из них, сохранение железистого компонента у 100% пациенток. Выявление внутриматочной патологии и аденомиоза у 6 и 18% пациенток соответственно, отражает необходимость исключения ее при отсутствии эффекта от проводимого ранее лечения бесплодия, в особенности при отсутствии иных его факторов.

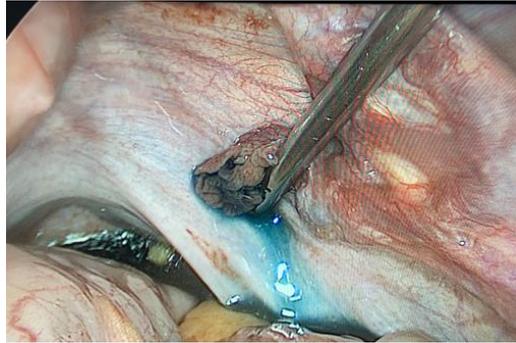


Рисунок 8- Визуализация карманообразных дефектов брюшины малого таза у пациенток со сниженным овариальным резервом

Наружный генитальный эндометриоз I-II ст. был выявлен у 36% пациенток со сниженным овариальным резервом, в том числе в сочетании с аденомиозом в 18% случаев. При этом эндометриоидные гетеротопии были отмечены у 82% пациенток при длительности нарушений менструального цикла по типу аменореи более 2-х лет, сопровождающихся приемом циклической заместительной гормональной терапии. При выявлении указанных патологических изменений на первом этапе проводилось восстановление топографо-анатомических взаимоотношений органов малого таза и восстановление архитектоники полости матки. Матка у пациенток с крайне низким овариальным резервом зачастую уменьшена в размерах, при этом степень выраженности изменений зависит от наличия и длительности нарушений менструального цикла, а также проводимой коррекции олиго-аменореи с индукцией регулярной заместительной менструалоподобной реакции. Обращает на себя внимание изменение соотношения длины шейки

матки к длине полости матки (показано на рисунке 9). Маточные трубы в подавляющем большинстве случаев определяются без видимых патологических изменений, фимбриальный отдел выражен. В ряде случаев отмечается выраженная элонгация маточных труб в сочетании со значительной их извитостью, при сохраненной анатомической проходимости маточных труб, верифицируемой путем хромогидротубации 6/89 пациенток (6,74%).



Рисунок 9 - Выявление сопутствующих гинекологических заболеваний впервые диагностированных интраоперационно у пациенток, включенных в исследование

#### **4.4.1 Особенности структуры яичников у пациенток с крайне низким овариальным резервом (данные интраоперационной визуализации)**

Яичники в разной степени уменьшены в размерах, фолликулярный аппарат визуально не определяется. Обращает на себя внимание соотношение длины к ширине яичников, что в ряде случаев опосредует вытянутую форму.

Визуально утолщенная белочная оболочка имеет цвет от светло-желтого до ярко белого. На поверхности белочной оболочки в большинстве случаев определяются многочисленные борозды различной глубины, однако у ряда пациенток яичник имеет гладкую, ровную поверхность, при этом цвет

белочной оболочки приближается к ярко белому (представлено на рисунке 10).



Рисунок 10 - Данные интраоперационной визуализации яичника у пациентки с крайне низким овариальным резервом

При проведении инструментальной пальпации яичников определяются следующие особенности: у большинства пациенток плотность яичников доходит до уровня каменистой, однако у части женщин с крайне низким овариальным резервом яичники при пальпации с несколько мягковатой поверхностью, что значимо коррелирует с наличием аутоиммунных заболеваний в анамнезе (хронический аутоиммунный тиреоидит, витилиго и др.)  $p < 0,05$ .

Необходимо особо отметить степень дифференцировки мозгового и коркового слоя у обследованных пациенток с крайне низким овариальным резервом. В большинстве случаев существует четкая граница между корковым и мозговым слоями яичниковой ткани, однако в ряде случаев разделение коркового и мозгового слоя затруднено, при этом они представляют собой единый субстрат без явной границы. Четкая дифференцировка слоев яичниковой ткани коррелирует с длительностью предшествующей аменореи 2 года и более. Плотность мозгового слоя яичников, определяемая в ходе формирования ложа для реимплантации неодинакова у обследованных больных. Так у пациенток с сохраненным менструальным циклом мозговое вещество плотное, эластичное в сочетании с меньшей плотностью коркового слоя. При наличии клинико-лабораторных свидетельств аутоиммунной ПНЯ, а также при длительной аменорее,

предшествующей хирургическому этапу лечения мозговой не структурирован и имеет мягковатую консистенцию (представлено на рисунке 11).



Рисунок 11 - Дифференцировка между корковым и мозговым слоем у пациентки с крайне низким овариальным резервом

#### **4.4.2 Определение зоны биопсии яичниковой ткани**

Принципиальным этапом в ходе выполнения хирургического лечения, направленного на активацию фолликулярного роста является детекция зоны биопсии яичниковой ткани. Она должна быть определена с учетом различных аспектов топографической и функциональной анатомии яичников и расположенных в непосредственной близости структур. При этом в обязательном порядке необходимо учитывать состояние мезовариума, связочного аппарата яичника, а также наличие ретенционных образований в его структуре. Предпочтительно придерживаться условий минимального кровоснабжения при достаточной толщине отдельных зон яичниковой ткани для оптимизации последующего этапа биопсии коркового слоя. Оптимальное определение зоны биопсии ткани яичника имеет безусловное диагностическое значение в рамках проведения последующего гистологического исследования операционного материала, а также влияет на ход операции в целом, определяя ее длительность, кровопотерю, необходимость использования различных методов гемостаза, что крайне нежелательно при выполнении подобных оперативных вмешательств. В ходе настоящего исследования иссечение участка коркового слоя во всех случаях

проводилось в области верхнелатерального полюса яичника острыми механическими ножницами по границе с мозговым слоем по всей площади биопсии размером 10 x 10 мм толщиной не более 1 мм.

Манипуляции с яичником проводятся с использованием малотравматичных мягких зажимов, биопсия коркового слоя проводится острыми лапароскопическими ножницами с несколько закругленными браншами с преимущественным захватом только кортекса яичника. Извлечение из брюшной полости участка коркового слоя яичника проводится мягким зажимом исключая избыточное давление на ткань и соответствующую травматизацию.

Фрагментация коркового слоя яичников проводится с использованием скальпеля, дополнительная демедулляция выполняется при необходимости.

Демедулляция проводится острым путем с использованием скальпеля с предпочтительным удалением элементов мозгового слоя единым блоком, таким образом манипуляция выполняется в слое между корковым и мозговым веществом (по возможности).

Острым путем проводятся параллельные разрезы с формированием идентичных друг другу фрагментов прямоугольной формы с последующим их делением на квадратные стрипы. В ходе этапа фрагментации всегда проводится замена скальпеля, что обеспечивает должную его остроту и исключает передавливание тканей. Для фиксации фрагментов используется мягкий анатомический пинцет с тонкими браншами.

При возможности необходимо использовать анатомический пинцет с изогнутым концом. При применении анатомического зажима с изогнутым концом заполняется уrogenитальный зонд типа С (Пайпель) фрагментами коркового слоя. При погружении последних в пайпель необходимо придерживаться плотного наполнения избегая пустых промежутков и попадания воздуха (показано на рисунке 12).



Рисунок 12 - Этап фрагментации коркового слоя яичников, подразумевающий непосредственно стрипирование биоптата яичниковой ткани последовательно после проведения демедулляции

Заполненный фрагментами коркового слоя яичников пайпель передается непосредственно из рук в руки хирургу после чего выполняется этап реимплантации. В сформированное в каждом яичнике ложе вводится пайпель с определением глубины пространства для реимплантации. Отходя на некоторое расстояние от дна ложа проводится выведение фрагментов коркового слоя из зонда. При визуализации некоторых фрагментов за пределами ложа проводится дополнительное погружение их с при помощи зажима Мане.

Обращаем внимание, что во время этапа формирования пространства для реимплантации воронко- тазовая связка фиксируется кишечным зажимом что обеспечивает практически отсутствие кровопотери и нивелирует необходимость использования хирургического и медикаментозного гемостаза в ходе оперативного вмешательства.

По нашему мнению, с целью оптимизации процесса реимплантации и исключения диссеминации фрагментированных участков коркового слоя, яичник не должен быть расположен близко к стенке таза, в связи с чем необходимо несколько вытянуть яичник в противоположную сторону без травматизации его связочного аппарата (продемонстрировано на рисунке 13).



Рисунок 13 - Оптимальное положение яичника во время этапа реимплантации

Для обеспечения лучшего сопоставления тканей во избежание выхода фрагментов коркового слоя яичника из ложа проводится захват и ушивание коркового слоя с использованием тонкого викрилового восьмиобразного шва (2,0). При завязывании и затягивании узлов необходимо придерживаться минимально возможного натяжения до сопоставления краев разреза.

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
- Всегда этап гистероскопии, биопсии эндометрия

Все операции были выполнены без осложнений за весь период постоперационного наблюдения. Средняя продолжительность операции

оказалась равной 1 час 10 минут со средней кровопотерей 10 мл. В послеоперационном периоде применялась антибактериальная, инфузионная терапия и ранняя послеоперационная физиотерапия. Выписка из стационара производилась на 3-5-е сутки после операции.

Ретроспективно, на основании сопоставления результатов стимуляции функции яичников в послеоперационном периоде с данными, полученными интраоперационно определены предикторы эффективности лечения на основании интраоперационной морфометрической визуализации яичниковой ткани (Непараметрический критерий Манна-Уитни): длина более 1,8 см, соотношение длины и ширины яичника менее чем  $3/2$ , отсутствие каменистой плотности ткани при инструментальной пальпации, отсутствие чёткой дифференцировки коркового и мозгового слоя яичника, плотная структура мозгового слоя, наличие стигм функциональной активности различной степени давности.

#### **4.5 Морфометрические особенности яичниковой ткани у пациенток с низким числом CGG- повторов в гене FMR1**

Определен относительный риск снижения овариального резерва в зависимости от числа CGG повторов гена FMR1. Известно, что при увеличении числа CGG повторов на каждые 5 в области более 30, риск выявления сниженного сывороточного уровня АМГ возрастает на 40% [184]. Зону числа CGG повторов менее 26 традиционно принято считать неизученной областью с позиции влияния на овариальный резерв. Более того отсутствуют данные о структуре яичниковой ткани в данных клинических ситуациях.

В ходе настоящего исследования определены характерологические особенности ткани яичников, выявляемые интраоперационно и по данным гистологического исследования. Количество CGG повторов менее 26 определено у 6 из 89 (6,74%) больных, включенных в исследование, при этом

у одной из пациенток их число оказалось равным 18. При проведении оперативного вмешательства у пациенток с низким числом указанных повторов в гене FMR1 яичники представляют собой структуры резко вытянутой формы со значительно измененным соотношением их длины к ширине в пользу длины, таким образом что яичниковая ткань была представлена тонкими длинными полосами в виде тяжей. При этом ворончатозовые связки были удлинены, а собственные связки яичника практически не определялись. Белочная оболочка имела ярко белый цвет, яичники характеризовались гладкой ровной поверхностью. Высокая плотность ткани яичников не была характерна для данных больных, несмотря на большую продолжительность аменореи. Корковый и мозговой слой яичников четко дифференцировались, мозговое вещество имело среднюю плотность, соотносимо с остальной выборкой обследуемых пациенток (представлено на рисунке 14).

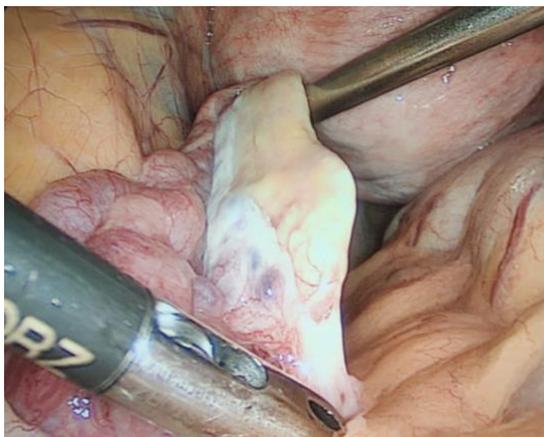


Рисунок 14 – Морфометрическая структура ткани яичников у пациенток с числом CGG- повторов в гене FMR1 <26 (интраоперационная визуализация)

Фолликулярный рост на стимуляции функции яичников в послеоперационном периоде выявлен только у 1 пациентки с визуализацией единичного антрального фолликула, достигшего среднего диаметра 13 мм с использованием высоких доз гонадотропинов (300 МЕ в сутки) с

последующей преждевременной лютеинизацией в одной из попыток и получение 1 дегенеративного ооцита во второй попытке ЭКО.

Таким образом, несмотря на схожий клинический портрет пациенток с данным заболеванием и одинаковую нозологическую форму в виде преждевременной недостаточности яичников определяется значительная вариабельность морфометрических данных яичниковой ткани у пациенток с изменениями в гене FMR1. 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.

## **Глава 5. Состояние эндометрия у пациенток со сниженным овариальным резервом: гистероскопическая картина**

В опубликованной литературе на сегодняшний день практически не представлены данные об особенностях состояния эндометрия при сниженном овариальном резерве, что не дает возможность в достаточной степени охарактеризовать его морфофункциональные характеристики в данной клинической ситуации.

Учитывая необходимость поиска механизмов воздействия в рамках овариальной стимуляции, во время переноса эмбриона и в посттрансферном периоде, с целью повышения эффективности лечения бесплодия у этой категории пациенток нами изучено состояние полости матки и эндометрия у всех пациенток, включенных в исследование.

Наряду с визуальной оценкой яичников, маточных труб и матки, выполнялось исследование состояния эндометрия с последующей гистологической верификацией.

Были отмечены следующие гистероскопические особенности полости матки и эндометрия: средняя длина полости матки по зонду составила 6,34 +/- 0,50 см. У 7 пациенток (8%) отмечалась частичная атрезия цервикального канала, что, по-видимому, связано с предшествующим деструктивным лечением заболеваний шейки матки с применением различных энергий. Полость матки у 68 пациенток (76%) имела седловидную форму. Железистый рисунок разной степени выраженности был сохранен у всех пациенток. Усиление сосудистого рисунка наблюдалось у 32 больных (36%). Устья маточных труб были доступны осмотру, свободны у 77 пациенток (86%). Облитерация устьев маточных труб наблюдалась у 12 женщин (14%), что было связано с предшествующей одно- или двусторонней тубэктомией в 2 случаях в плановом порядке в рамках подготовки к программе ЭКО, в 10 случаях в связи с одной или несколькими внематочными беременностями в анамнезе. В области дна матки у 16 пациенток (18%) эндометрий имел

трабекулярное строение, с определением эндометриoidных ходов, что являлось признаком внутреннего эндометриоза матки.

В ряде случаев в ходе выполнения гистероскопии была верифицирована внутриматочная патология с последующей интраоперационной коррекцией: неполная внутриматочная перегородка, занимающая до 1/3 полости матки, была выявлена в 6% (5 пациенток), полип эндометрия определялся в 3 случаях, полип цервикального канала был визуализирован у 5 пациенток, внутриматочные синехии обнаруживались у 2 пациенток.

Во всех случаях было выполнено патоморфологическое исследование эндометрия, полученного в ходе ЦУГ-биопсии или диагностического выскабливания в зависимости от интраоперационной ситуации. Патоморфологическое исследование состояния слизистой тела матки проводилось с учетом приема заместительной гормональной терапии.

## **Глава 6. Результативность комплексного лечения бесплодия у пациенток с крайне низким овариальным резервом**

Проанализированы результаты комплексного лечения бесплодия, включающего вышеописанный хирургический этап у 89 пациенток с крайне низким овариальным резервом. Через день после операции пациенты отмечали улучшение общего самочувствия, психоэмоционального состояния, купирование вазомоторных симптомов, головных болей, что отмечалось на протяжении всего периода наблюдения. В послеоперационном периоде проводили динамическое определение сывороточного уровня гонадотропинов и эстрадиола на 3 сутки после операции, а также на 2-3 день в каждом менструальном цикле после операции в сочетании с оценкой эхографических параметров овариального резерва.

### **6.1 Динамика показателей гормонального профиля у пациенток с крайне низким овариальным резервом**

Оценка показателей гормонального профиля пациенток, включенных в исследование, в послеоперационном периоде была проведена неоднократно. Сывороточные концентрации ФСГ, ЛГ и эстрадиола впервые определялись уже в день выписки из стационара, то есть на 3-5-е сутки после оперативного вмешательства. При этом у 78 из 89 пациенток (87,6%) концентрация эстрадиола возрастала в данные сроки в среднем в 3,6 раз. Необходимо обратить внимание на факт приема заместительной гормональной терапии в рамках предоперационной подготовки и включая весь периоперационный период, однако сопоставление уровней гормонов крови было выполнено между значениями до операции (уже на фоне приема ЗГТ) и после хирургического этапа лечения, что указывает на возможность сравнения данных параметров. Вызывает интерес факт повышения уровней ФСГ и ЛГ в пределах раннего послеоперационного периода (на момент выписки из

стационара) в среднем на 15-20% от исходных величин, однако в дальнейшем отмечается значительная динамика указанных параметров с течением послеоперационного периода. Данное увеличение вероятно связано с периоперационным стрессом и его влиянием на супрагипоталамические структуры и соответственно на ритм секреции гонадолиберина, что имеет адаптивное значение.

В данном случае соотношение показателей эстрадиола и гонадотропинов в сыворотке крови пациенток после операции свидетельствует о положительной прямой связи в системе гипоталамус-гипофиз-яичники. Последующие контрольные лабораторные исследования по определению сывороточных уровней гонадотропинов и эстрадиола выполнялись ежемесячно на 2-3 день менструального цикла на фоне приема ЗГТ (показано на Рисунках 15,16,17).

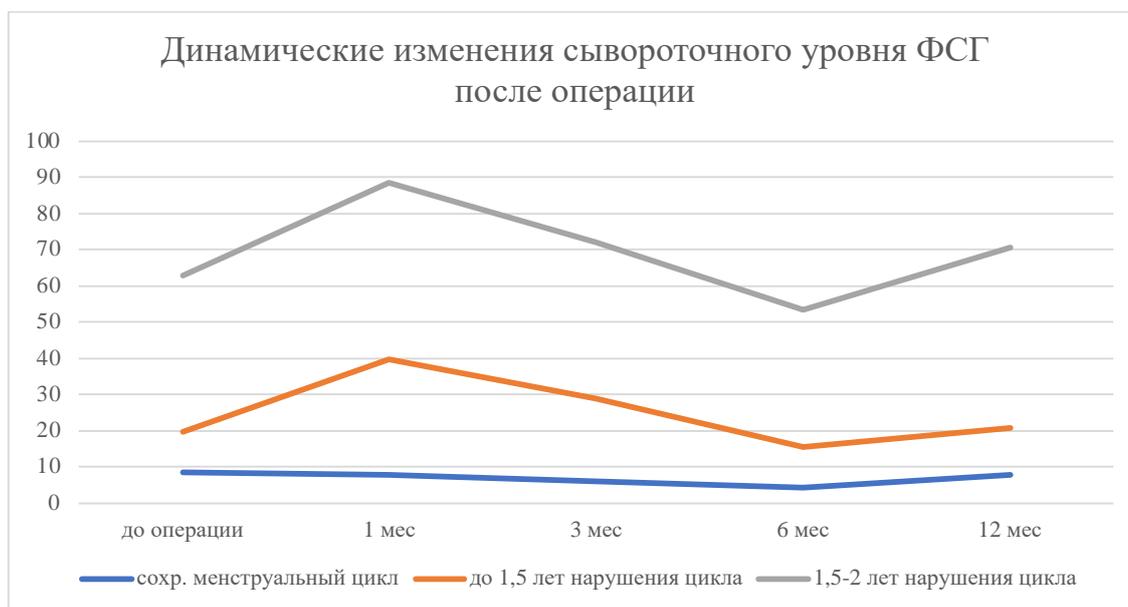


Рисунок 15- Динамические изменения сывороточного уровня ФСГ после хирургического этапа комплексного лечения.

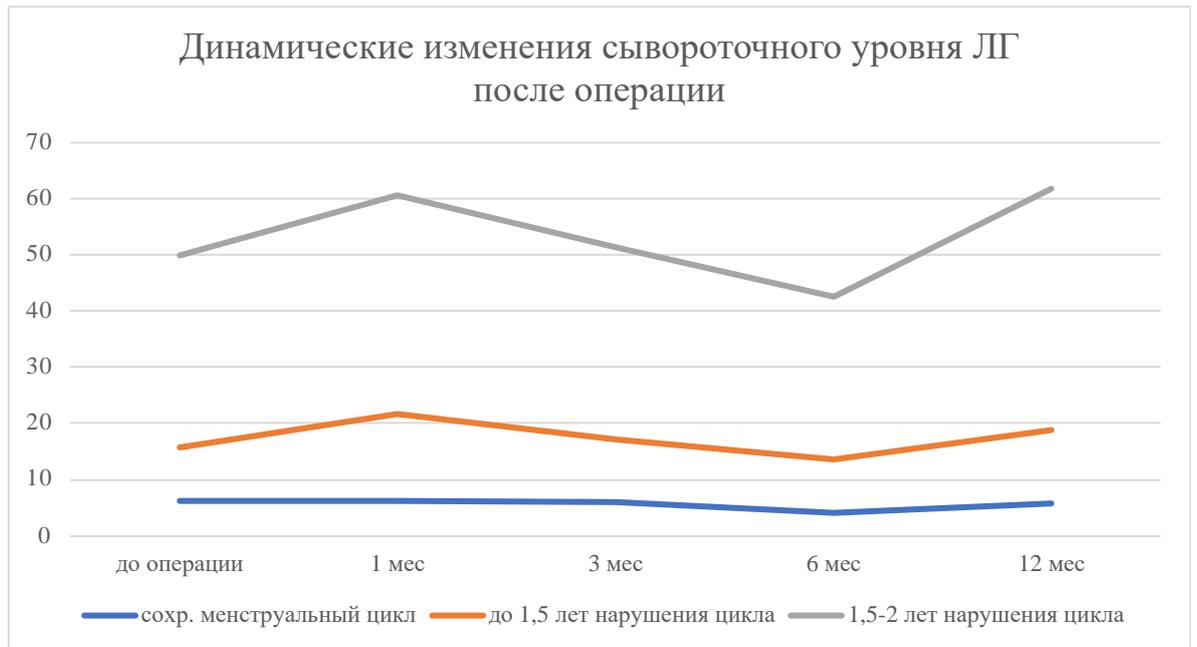


Рисунок 16- Динамические изменения сывороточного уровня ЛГ после хирургического этапа комплексного лечения.

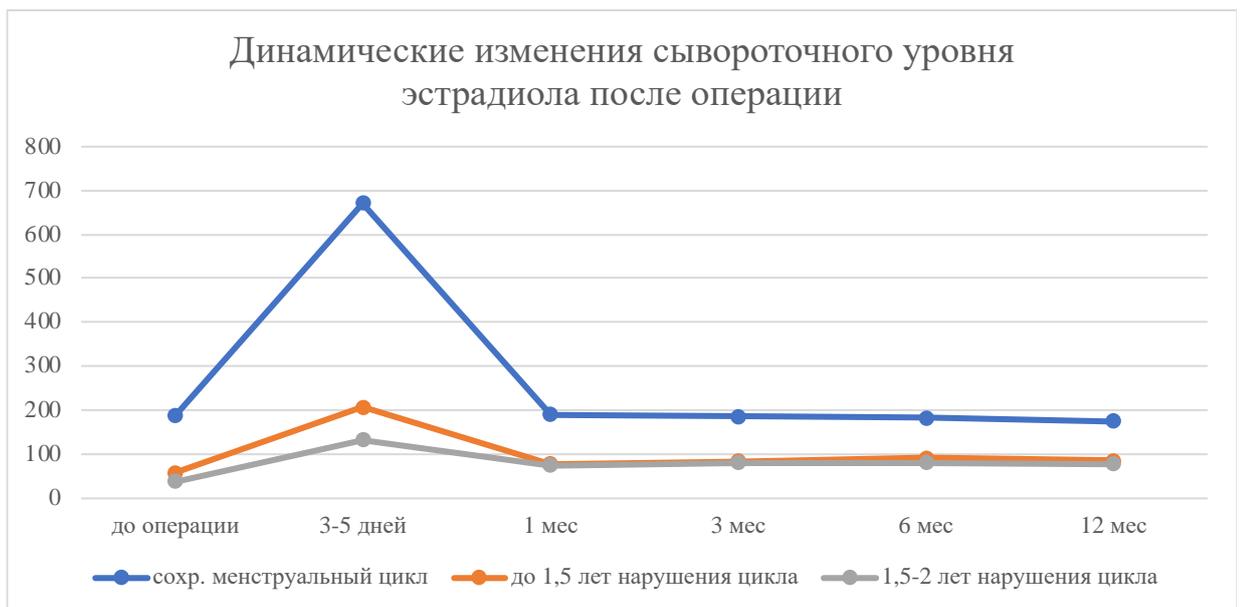


Рисунок 17- Динамические изменения сывороточного уровня эстрадиола после хирургического этапа комплексного лечения.

Динамика показателей вышеуказанных гормонов различалась в зависимости от исходных уровней гонадотропинов до операции. Так, при сывороточной концентрации ФСГ более 35 мМЕ/мл (на фоне приема гормональной терапии) в первые 2 менструальных цикла отмечалось еще

большее повышение его уровня на 15-20% что соответствовало постоперационным показателям (на 3-5-е сутки после вмешательства). Однако далее, на фоне продолжающегося использования циклической ЗГТ было выявлено снижение уровня ФСГ в 1,97 и ЛГ в 1,37 раз от исходного уровня, что в ряде случаев давало основание для начала гонадотропной стимуляции функции яичников. Динамика снижения уровня ЛГ была менее показательна в отличие от концентрации ФСГ, что соотносится с данными К. Kawamura и соавт. [185].

При определении сывороточной концентрации ФСГ менее 25 мМЕ/мл до операции, снижение его уровня в послеоперационном периоде наблюдалось уже в очередном после операции менструальном цикле и достигало 4,5 мМЕ/мл, что отражалось на сроках и выборе протокола овариальной стимуляции в пользу фиксированного короткого протокола с ант-ГнРг с использованием средних суточных доз гонадотропинов 150 МЕ.

Концентрация эстрадиола у всех пациенток в послеоперационном периоде составляла от 90 до 200 пг/мл, что входило в референсный интервал и было сопоставимо с таковыми показателями у женщин с регулярным ритмом менструаций в ранней фолликулярной фазе менструального цикла. Динамическая оценка концентрации эстрадиола в рамках постоперационного наблюдения не представляется в полной мере корректной в связи с состоянием всех пациенток на фоне ЗГТ.

Снижение уровней гонадотропинов в сочетании со стабильной концентрацией эстрадиола у пациенток со крайне низким овариальным резервом в послеоперационном периоде достигало своего предела в среднем через 4-5 менструальных циклов, выходя на условное плато к 6 месяцу послеоперационного наблюдения с последующим повышением соответствующих значений гонадотропинов, происходящим с индивидуальной скоростью.

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

послеоперационного периода. Однако следует отметить увеличение сывороточной концентрации АМГ у 3-х пациенток через 3-4 месяца после операции, дошедшей до порогового значения сниженного и нормального овариального резерва и равной 1,1-1,3 нг/мл.

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 крайне низким 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 (показано в Таблицах 2,3,4).

Таблица 2- 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	<b>0,0374</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0499</b>
до 1,5 лет нарушения цикла	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	1,0000	0,1323
1,5-2 лет нарушения цикла	<b>0,0486</b>	0,8919	0,0707	<b>0,0171</b>

Таблица 3- 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	<b>0,0017</b>	0,5214
до 1,5 лет нарушения цикла	<b>0,0002</b>	0,2389	0,8880	<b>0,0294</b>
1,5-2 лет нарушения цикла	0,1109	1,0000	0,0571	<b>0,0030</b>

Таблица 4- 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	<b>0,0030</b>	0,9361	0,7462	0,6240	0,2816
до 1,5 лет нарушения цикла	<b>0,0001</b>	<b>0,0170</b>	<b>0,0032</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0021</b>
1,5-2 лет нарушения цикла	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>

Таким образом, существуют определенные временные границы максимальной эффективности хирургического этапа лечения, который должен быть своевременно дополнен методами ВРТ при отсутствии наступления спонтанной беременности.

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) (представлено в Таблице 5).

Таблица 5 демонстрирует 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 5 - 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
<b>Психоэмоциональная сфера</b>	<b>19</b>	<b>21,7%</b>	<b>36</b>	<b>40,3%</b>	<b>0,028</b>
<b>Интерес в интимной жизни</b>	<b>14</b>	<b>15,8%</b>	<b>27</b>	<b>30,8%</b>	<b>0,023</b>
Способность к концентрации внимания	25	28,3%	34	38,5%	0,128
Генитоуринарные расстройства	73	81,9%	77	86,5%	0,125
<b>Оценка качества жизни в целом</b>	<b>31</b>	<b>35,0%</b>	<b>53</b>	<b>59,6%</b>	<b>0,034</b>

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 ( $p=0,028$ ).

Тактика планирования беременности после хирургического этапа лечения определялась совместно с пациенткой прежде всего с учетом ее возраста, наличия мужского фактора бесплодия, а также на основании верификации состояния маточных труб.

## 6.2 Ультразвуковое исследование органов малого таза у пациенток с крайне низким овариальным резервом

Для объективной оценки динамического состояния овариального резерва и с целью верификации сопутствующих гинекологических заболеваний у пациенток, включенных в исследование, проводилось ультразвуковое исследование органов малого таза, с получением серошкального изображения, а также с применением 3D визуализации.

Обращали особое внимание на размеры и объем матки, особенности анатомии ее полости и наличие патологических изменений в эндо и миометрии. При изучении внутренней структуры яичников определялся размер каждого из них с вычислением объема. Пристальное внимание было уделено подсчету числа антральных фолликулов различного диаметра с уточнением фенотипической неоднородности фолликулярного пула у ряда пациенток. Неоднородность размеров и структуры фолликулярного аппарата яичников у пациенток с крайне низким овариальным резервом подразумевает наличие фолликулов различного диаметра от 2 до 10 мм. Подсчет количества антральных фолликулов осуществляли в ручном режиме, а также с применением приложения SonoAVC доступного на используемом ультразвуковом аппарате.

Согласно общепринятой классификации состояния яичников по данным УЗИ пациенты были ранжированы в зависимости от наличия фолликулярного и афолликулярного типов ПНЯ. Примечательно, что только у 5 из 89 пациенток (5,6%) был выявлен афолликулярный тип ПНЯ. У остальных женщин, включенных в исследование определен фолликулярный аппарат со значительной вариабельностью количества антральных фолликулов. С целью унификации полученных результатов и для проведения сравнительного исследования с данными, полученными после хирургического этапа лечения, нами были использованы такие параметры как объем яичников и число антральных фолликулов из расчета на яичник.

После оперативного лечения 89 пациенткам со сниженным овариальным резервом проведена динамическая трансвагинальная эхография органов малого таза. При этом было отмечено увеличение объемов яичников до 32%, а также относительное улучшение перечисленных ультразвуковых показателей овариального резерва

Результаты исследования показали снижение объема яичников у женщин крайне низким овариальным резервом (до  $2,82 \pm 0,56$  и  $2,53 \pm 0,27$

см<sup>3</sup> для правого и левого яичников соответственно) и числа антральных фолликулов (до  $2,6 \pm 1,3$  фолликулов на яичник). Нами обнаружены фолликулы у 94,3% женщин, включенных в исследование, однако более чем у половины из них диаметр антральных фолликулов не превышал 3 мм. Полученные данные свидетельствует о потенциале к хирургической активации овариальной ткани, однако не противоречат определению понятия сниженный овариальный резерв.

У больных со сниженным овариальным резервом после оперативного лечения в различные сроки послеоперационного периода, было отмечено увеличение объемов яичников до 32%.

Так, фолликулярный тип ПНЯ был определен у 100% пациенток по сравнению с 94,3% до оперативного лечения, подразумевающего выполнение одноэтапного хирургического метода активации функции яичников, при этом у 56 (62,92%) пациенток определялось до 3 антральных фолликулов, у 33 (37,07%) пациенток - до 6 антральных фолликулов, что свидетельствует об относительном улучшении показателей резерва яичниковой ткани.

Полученная динамика соотносилась со снижением уровней гонадотропинов более чем в 1,5 раза, при этом тенденция изменений ЛГ по сравнению с ФСГ была менее выражена, что ранее было описано в исследовании К. Kawamura и соавторов [97].

Несмотря на визуализацию различного числа антральных фолликулов у всех пациенток после хирургического этапа лечения, стимуляция функции яичников оказалась обоснованной лишь у 60 (67,4%) из них, при этом эффект от овариальной стимуляции с позиции фолликулярного роста был получен у 81,6% пациенток. Таким образом визуализация антральных фолликулов при ультразвуковом исследовании должна быть критически оценена в зависимости от диаметра определяемых антральных фолликулов, что в значительной степени отражает их потенциал к росту на гонадотропной стимуляции.

## **Глава 7. Стимуляция функции яичников у пациенток с крайне низким овариальным резервом**

В рамках данного диссертационного исследования разработаны собственные подходы к стимуляции функции яичников у пациенток с крайне низким овариальным резервом, на основании имеющегося международного опыта, данных о предшествующих попытках ЭКО (при наличии), с учетом возраста пациенток, а также на основании клинико-лабораторных данных и показателях ультразвукового исследования в послеоперационном периоде.

52 пациентки из 89 включенных в исследование (58,4%) имели от 1 до 9 попыток ЭКО в анамнезе с отсутствием эффекта с позиции наступления беременности до первичного обращения в Центр. При этом у 14 из них (26,9%) имела место отмена циклов стимуляции по причине отсутствия фолликулярного роста по данным ультразвуковой фолликулометрии. У 15 пациенток (28,8%) не удавалось получить ооциты несмотря на наличие ответа на стимуляцию функции яичников в виде фолликулярного роста по причине преждевременной лютеинизации неовулирующего фолликула и преждевременной овуляции при диаметре фолликулов от 15 до 18 мм, несмотря на применение адекватных доз ант-ГнРг с целью предотвращения паразитарных пиков ЛГ.

У 12 пациенток (23,07%) отмечалось низкое качество эмбрионов, с отсутствием таковых к переносу. У 11 пациенток (21,1%) до оперативного лечения перенос эмбрионов в рамках предшествующих программ ЭКО не привел к достижению беременности.

32-м пациенткам (35,9%), включенным в исследование, ранее не проводились попытки стимуляции функции яичников в связи с недопустимыми уровнями гонадотропинов на начало возможной овариальной стимуляции. 5 пациенток из 37 без попыток предшествующей стимуляции не реализовали попытки ЭКО в связи с отказом от использования данного метода лечения бесплодия.

При анализе выполненных ранее протоколов стимуляции функции яичников отмечено наиболее частое использование короткого протокола с ант-ГнРг- у 88% пациенток, а также овариальная стимуляция с применением ингибиторов ароматазы (летрозол до 7,5 мг в сутки)- у 12% пациенток, что не приводило к росту более 3-х фолликулов и получению более 2-х ооцитов.

Обращает на себя внимание использование различных видов прайминга перед проведением программы ЭКО с преимущественным использованием препаратов ДГЭА в дозах от 25 до 75 мг в сутки.

Во время всего периода наблюдения после операции применялись препараты заместительной гормональной терапии (эстрадиола валерат 2 мг + дидрогестерон 10 мг).

Изначально нами был полностью перенят опыт зарубежных коллег во главе с К. Kawamura в плане подходов к стимуляции функции яичников после хирургического этапа лечения [62].

Таким образом, нами предпринимались попытки стимуляции функции яичников на фоне непрерывного использования заместительной гормональной терапии, что не приводило к эффекту с позиции индукции фолликулярного роста. Далее нами был выбран циклический режим применения ЗГТ. Первые протоколы стимуляции функции яичников проводились без учета уровней ФСГ и ЛГ на начало стимуляции (согласно оригинальной методике), сывороточная концентрация которых доходила при этом до 40 мМЕ/мл. Однако стимуляция функции яичников в данном случае не позволяла визуализировать фолликулярный рост даже при использовании высоких доз гонадотропинов (300-450 МЕ в сутки) с длительным их применением (15-21 день).

К. Kawamura и соавторы в ряде случаев использовали суточные дозы гонадотропинов, достигающие до 600 МЕ. В 2-х случаях при использовании подобных схем стимуляции нами получены ооциты, однако они были идентифицированы как дегенеративные и непригодные к оплодотворению.

В связи с нецелесообразностью использования высоких доз гонадотропинов, высокой стоимостью подобных программ и из соображений безопасности тактика последующих попыток стимуляции функции яичников была изменена в пользу использования средних доз гонадотропинов не превышающих 225 МЕ в сутки с длительностью овариальной стимуляции не более 12 дней, что было достаточно для верификации ответа на стимуляцию и принятия решения о дальнейшей тактике ведения в рамках настоящего протокола ЭКО.

Выбор препарата для стимуляции функции яичников в пользу только ФСГ-содержащих средств на начальном этапе основывался на данных опыта К Kawamura и коллег, что, по их мнению, нивелирует необходимость детекции уровня ФСГ на начало цикла стимуляции и позволяет избежать ЛГ-зависимых побочных эффектов (остановка фолликулярного роста, преждевременная овуляция, преждевременная лютеинизация и др.). Нами было предпринято ранжированное использование препаратов гонадотропинов с обращением особого внимания на возраст пациенток и на базальное соотношение ФСГ/ЛГ.

Известно, что в старшем и позднем репродуктивном возрасте обосновано применением ЛГ-содержащих препаратов с различным соотношением ЛГ/ФСГ, со значимым преимуществом последнего равного 2:1, что помимо ответа на стимуляцию функции яичников позволяет получить большее число ооцитов лучшего качества, а также оптимизирует структуру и толщину эндометрия, что в совокупности положительно влияет на частоту наступления беременности.

Возраст пациенток, включенных в исследования иностранных коллег не превышал 40 лет, в данном исследовании нами были предприняты попытки комплексного лечения у пациенток с крайне низким овариальным резервом в возрасте до 42, а в 2-х случаях до 46 лет в связи с крайне актуальной клинической необходимостью, установленной на основании обращаемости пациенток.

Настоящее исследование показало целесообразность ранжированного использования препаратов гонадотропинов в зависимости от возраста пациенток и сывороточных уровней гормонов гипофиза перед началом стимуляции. Так, при наличии уровня ЛГ равного или превосходящего ФСГ, а также при возрасте пациентки менее 35-37 лет предпочтительно использованием ФСГ-содержащих препаратов, что снижает частоту ЛГ-зависимых побочных эффектов. При физиологическом соотношении сывороточных концентраций гонадотропинов, а также в возрасте пациенток 40 и более лет обосновано использование ЛГ-содержащих препаратов в соотношении к ФСГ 1:1, либо 2:1.

Выбор гонадотропинов с позиции особенностей их производства в пользу рекомбинантных или мочевых менопаузальных форм осуществлялся преимущественно на основании опыта предшествующих стимуляций в том числе проводимых до оперативного лечения.

Стимуляция функции яичников проводилась при достижении уровня ФСГ равного 15 мМЕ/мл и менее. При этом диапазон его сывороточных концентраций находился в пределах от 4,5 до 15,2 мМЕ/мл. Выбор протокола овариальной стимуляции проводился в зависимости от уровня ФСГ на 2 день менструального цикла. В случае достижения концентрации ФСГ до 10 мМЕ/мл в различные сроки послеоперационного периода нами использовался короткий протокол с ант-ГнРг, при этом значение ФСГ в диапазоне от 4,5 до 7 мМЕ/мл давало основание применения протокола "flare-up" с использованием минимальных доз агонистов ГнРг в первые 3-4 дня стимуляции функции яичников.

При концентрации ФСГ на начало стимуляции суперовуляции более 10 мМЕ/мл использовался короткий протокол с агонистами ГнРг, что обеспечивало удержание оптимальных уровней ФСГ и ЛГ в течение периода стимуляции. Таким образом, короткий протокол с антагонистами ГнРг был применен у 27 из 60 пациенток (45%), при этом у 9 из них он был фиксированным с назначением препаратов антагонистов ГнРг на 6-й день

стимуляции функции яичников. Короткий протокол с агонистами ГнРг с применением «дейли-форм» агонистов гонадолиберина был использован у 20 пациенток (33%) из 60 с попытками стимуляции функции яичников в послеоперационном периоде. В рамках овариальной стимуляции 13 пациенток (22%) использован «flare-up» протокол.

При отсутствии динамики фолликулярного роста на фоне овариальной стимуляции в течение 10-12 дней, проводилась отмена цикла ЭКО с последующей индукцией заместительной менструалоподобной реакции, опосредуемой назначением лекарственных препаратов из группы гестагенов (дидрогестерон 10 мг х 2 раза в день) при толщине эндометрия более 5 мм, либо при использовании ЗГТ при линейной структуре М-эхо.

При достижении одного из фолликулов диаметра 18 мм с целью обеспечения финального дозревания ооцитов вводился триггер овуляции-хорионический гонадотропин человека в дозе 5000 МЕ при росте 1 фолликула и 10000 МЕ при визуализации 2 и более фолликулов. Далее через 35 часов проводилась трансвагинальная пункция фолликулов.

Обращают на себя внимание особенности эмбриологического этапа ЭКО. После идентификации степени зрелости получаемых ооцитов проводилось их оплодотворение методом ИКСИ. Культивирование эмбрионов проводилось с использованием одноэтапных сред, таким образом оценивалось количество и морфологическое качество эмбрионов на стадии бластоцисты с решением вопроса о переносе/криоконсервации эмбриона либо проведении ПГТ-А по показаниям.

По опубликованным к сегодняшнему дню данным о стимуляции функции яичников после хирургической активации ни один из авторов не освещает вопрос культивирования эмбрионов до 5-х суток, перенос эмбрионов во всех случаях выполняется на 2-3-е сутки развития [62]. Само по себе получение эмбрионов 5-х суток в ходе нашего исследования дает основание свидетельствовать о высокой эффективности проводимого

комплексного лечения у пациенток с крайне низким овариальным резервом с точки зрения качества получаемого клеточного материала.

Во всех случаях нами проводился селективный перенос одного эмбриона в полость матки в цикле стимуляции либо в рамках программы криопереноса. Перенос эмбриона в полость матки и ведение посттрансферного периода не отличались от таковых при стандартной программе ЭКО у пациенток независимо от овариального резерва.

При проведении контролируемого клинического исследования с контролем по принципу до и после определено, что количество получаемых ооцитов из расчета на цикл стимуляции увеличилось в 2,3 раза, число полученных эмбрионов хорошего и отличного качества, пригодных для переноса составила 63% от количества полученных ооцитов.

В группе пациентов с отсутствием эмбрионов пригодных для переноса в предшествующих попытках ЭКО отмечено улучшение исходов стимуляции функции яичников: увеличение частоты оплодотворения и бластуляции с получением эмбрионов хорошего и отличного качества, пригодных для переноса.

Все проведенные циклы ЭКО у пациенток, включенных в исследование, прошли без осложнений при отсутствии значимого влияния на общее самочувствие.

Таким образом, 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 ( $n=23$ ) отмечено у 22 пациенток, у 16 из которых при использовании собственных ооцитов, у 3-х из них беременность наступила спонтанно (в том числе у одной пациентки дважды). 14 беременностей (из них 8 при достижении с использованием собственного генетического материала) завершились живорождением 15-ю здоровыми детьми. Частота ранних репродуктивных потерь беременности от числа наступивших - 18,75% ( $n=3$ ). 2 беременности, достигнутые в результате проведения программы ЭКО с использованием собственных ооцитов и 2 беременности, наступившие в результате использования программ донации ооцитов развиваются, находясь на различных этапах гестации (показано на рисунках 18,19,20).

Все пациентки были родоразрешены в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 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 18 - Количество получаемых ооцитов из расчета на цикл стимуляции до и после проведенного комплексного лечения



Рисунок 19 - Фолликулярный рост на стимуляции функции яичников до и после проведенного комплексного лечения

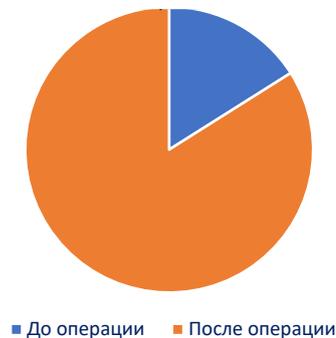


Рисунок 20 - Частота бластуляции из расчета на число получаемых ооцитов до и после проводимого комплексного лечения

На основании ретроспективного сравнительного анализа разработаны собственные критерии отбора пациенток для проведения данного вмешательства (на основании клинико-лабораторных показателей, данных интраоперационной морфометрической визуализации, верифицированные при гистологическом и иммуногистохимическом исследованиях), определены сроки и подходы к стимуляции функции яичников в послеоперационном периоде (представлено в таблицах 6,7).

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

Клинико-лабораторные критерии	Корреляция	
	Ответ на стимуляцию функции яичников после операции	Наступление беременности
ФСГ не более 25 мМЕ/мл	0,589286	0,437969
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 <sup>3</sup>	0,552291	0,445195
возраст менее 42 лет	0,613608	0,362466
единичные антральные фолликулы (по данным УЗИ)	0,729542	0,425604

Таблица 7 - 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	

Таким образом, определены интраоперационные, гистологические и гормональные предикторы ответа на стимуляцию функции яичников. Показано, что благоприятными факторами являются: возраст до 42 лет; нарушение менструального цикла по типу олиго-аменореи длительностью не более 2-х лет; ФСГ на фоне приема заместительной гормональной терапии не более 25 мМЕ/мл, соотношение ФСГ/ЛГ 2/1 и более.

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, показывают эффективность одноэтапного хирургического метода активации функции яичников как с позиции улучшения общего самочувствия, изменения психоэмоционального фона, динамики гормонального статуса, увеличения количества антральных фолликулов, получения собственного клеточного материала (ооцитов, эмбрионов) в циклах ЭКО, так и достижения беременности у ряда пациенток.

## **Глава 8. Гистологическое исследование образцов биоптатов яичниковой ткани и эндометрия, полученных в ходе выполнения хирургического этапа лечения**

### **8.1 Результаты патоморфологического исследования яичниковой ткани у пациенток со сниженным овариальным резервом**

С целью определения характерологических особенностей овариальной ткани у пациенток со сниженным овариальным резервом было изучено 178 образцов биоптатов яичников. С целью точного морфометрического анализа характеристик яичниковой ткани в каждом случае гистологическому анализу подвергался участок размерами 5 x 1 мм. Во всех случаях оценивались от 1 до 11 фрагментов ткани яичников общими размерами от 2 x 4 мм до 15 x 15 мм.

Все образцы ткани подвергались обработке согласно стандартному гистологическому протоколу. Выполнялась фиксация биоптатов объемом 3 мм<sup>3</sup> в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов, после стандартного протокола гистологической проводки материал заливали в парафин. Далее серийные срезы (до 30 шт) толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Исследование гистологических препаратов проводили на световом микроскопе при увеличении от x50 до x400. Подсчет числа примордиальных и растущих, полостных фолликулов, оценку состояния структур ооцитов проводили по методу, разработанному для парафиновых срезов яичников при увеличении микроскопа в 100 и 400 раз [101]. Подсчет числа растущих фолликулов производился согласно международной гистологической номенклатуре [5].

Показано, что в 38 образцах ткани яичников определялись первичные или примордиальные фолликулы. Их количество при оценке всего объема доступного для гистологического исследования материала разнилось - от 1 до 10. Для унификации их число оценивалось в объеме биоптата - 1 мм<sup>3</sup> и

было равным от 1 до 6 шт [24]. В 25 случаях были выявлены кистозно-атрезирующиеся фолликулы на разных стадиях развития, а также фиброзные тела (визуализировались в 106 образцах). В ряде случаев перечисленные патоморфологические признаки функциональной активности яичников определялись единовременно, в части образцов выявлялись изолированно фиброзные тела (в 68 шт) (продемонстрировано на рисунках 21-24). В данном исследовании только в 47 из 178 (26,2%) образцах не было детектировано никаких признаков функциональной активности яичников, о чем свидетельствует отсутствие соответствующих стигм. В 21,42% визуализировались примордиальные/первичные фолликулы, в 15,28% - кистозно атрезирующиеся фолликулы на разной стадии развития и в 59,52% - фиброзные тела.

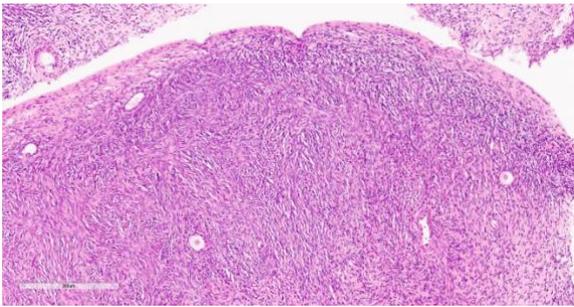


Рисунок 21 - Первичные и примордиальные фолликулы, окраска г/э, х 100

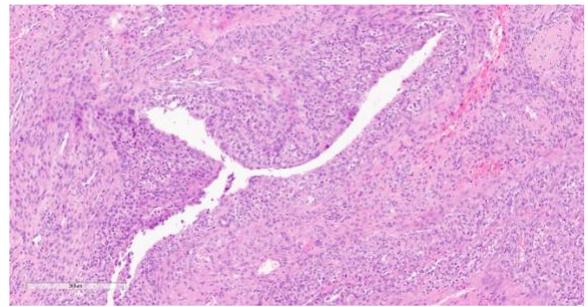


Рисунок 22 - Кистозно атрезирующийся фолликул, окраска г/э, х 100

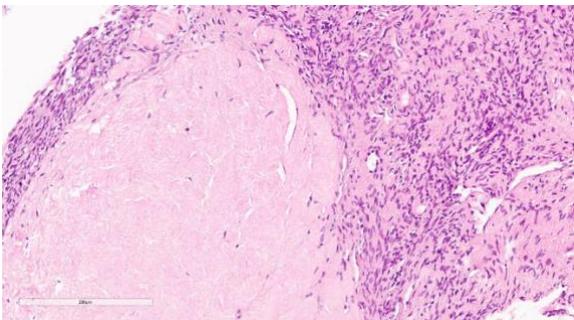


Рисунок 23 - Фиброзное тело, окраска г/э, х 100

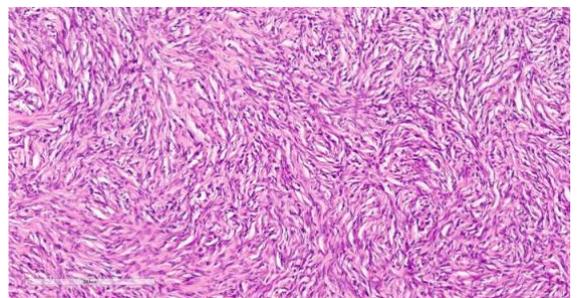


Рисунок 24- Гиперклеточная строма без фолликулов, окраска г/э, х100.

Вместе с тем, наряду с отсутствием стигм функциональной активности яичников, корковый слой представлял собой гиперклеточную строму, состоящую из удлинённых веретеновидных клеток (показано на рисунке 22). Эти параметры морфологического исследования значимо коррелировали с отсутствием эффекта от последующих стимуляций функции яичников. ( $p < 0.05$ ). Из 24 пациенток, в образцах овариальной ткани которых отсутствовали какие-либо стигмы функциональной активности хотя бы в одном из яичников, у 20 не отмечен ответ на последующую стимуляцию функции яичников. У 9 пациенток с наличием ответа на овариальную стимуляцию фолликулярный рост определялся в том яичнике, в образце которого при гистологическом исследовании определялись стигмы функциональной активности.

В ряде образцов отмечалось сохранение поверхностного эпителия яичника (ПЭЯ) (в 110 образцах), в части случаев в сочетании с наличием серозной поверхностной пролиферации (в 17 образцах), что показано на рисунках 25, 26. Площадь поверхности, покрытой поверхностным эпителием варьировала от 1 до 30%. Отмечена положительная корреляционная связь между морфометрической визуализацией ПЭЯ и длительностью течения заболевания и, соответственно, предшествующего лечения. ( $p < 0.05$ ). У 55 пациенток с сохранением поверхностного эпителия на площади от 1% до 30% отмечалось нарушение ритма менструаций продолжительностью как минимум 4 месяца до проведения хирургического этапа лечения. У 30 из 34 пациенток (88%) с отсутствием ПЭЯ в структуре овариальной ткани не было выявлено менструальных нарушений. В двух случаях длительность аменореи составила 3 года, в 1- 9 месяцев, в 1- 7 месяцев.

Следует подчеркнуть, что поверхностный эпителий яичников является весьма тонкой морфологической структурой, легко повреждающейся при малейшем искусственном воздействии. Факт визуального определения данного эпителия в гистологических препаратах в 61,8% случаев может быть обусловлено с одной стороны особой техникой оперативного вмешательства,

с другой- особенностями архитектоники поверхностного эпителия яичников и подлежащей стромы у пациенток с крайне низким овариальным резервом.

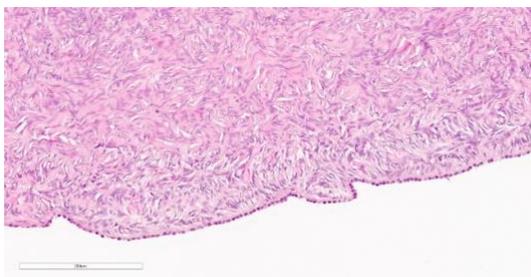


Рисунок 25- Поверхностный эпителий яичника, окраска г/э, х 200

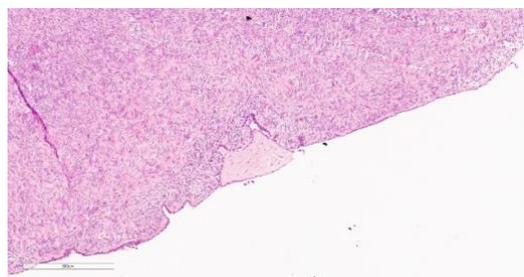


Рисунок 26- Серозная поверхностная пролиферация, окраска г/э, х 100

Еще одной часто определяемой гистологической структурой, косвенно свидетельствующей об овуляторной активности яичников, были инклюзионные кисты коркового слоя яичников. Они были отмечены в 38 образцах, при этом инклюзионные кисты, выстланные эпителием мезотелиального типа, были обнаружены в 12 образцах, а выстланные высоким цилиндрическим эпителием типа слизистой оболочки маточной трубы – в 21 образце, в 5 образцах определялись инклюзионные кисты обоих типов (представлено на рисунках 27,28). Известно, что инклюзионные кисты образуются при инвагинации поверхностного эпителия яичника в корковый слой при заполнении участка овуляторного разрыва поверхностным эпителием яичника или слущенным эпителием слизистой оболочки маточной трубы. В одном образце так же было определено скопление текалютеиновых клеток (показано на рисунке 29).

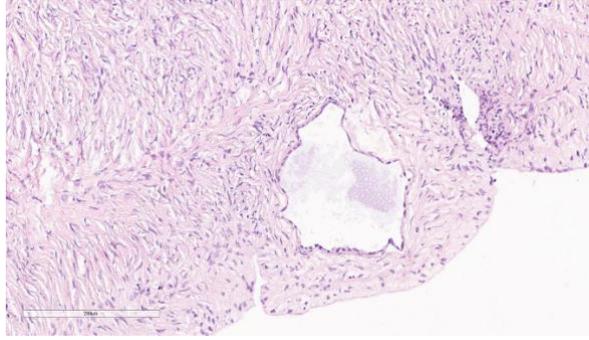


Рисунок 27 - Инклюзионная киста, выстланная эпителием мезотелиального типа, окраска г/э, х 100

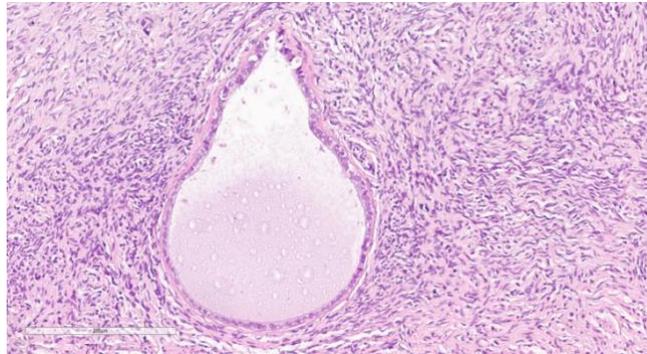


Рисунок 28 - Инклюзионная киста коркового вещества, выстланная эпителием типа слизистой оболочки маточной трубы, окраска г/э, х 200

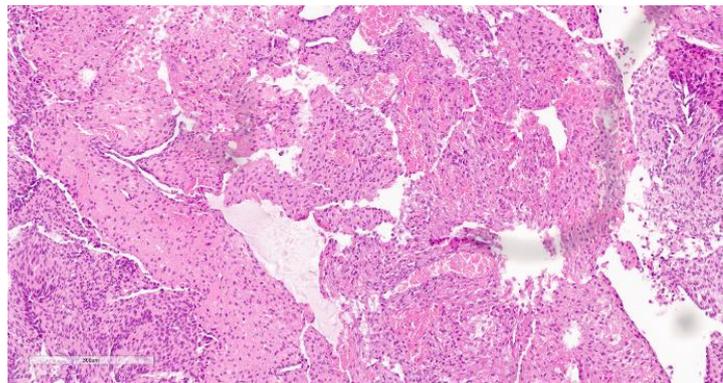


Рисунок 29- Фрагмент коркового слоя яичника с участком лютеинизации, окраска г/э, х 100

Выполненное исследование морфофункциональных характеристик овариальной ткани у пациенток со сниженным овариальным резервом позволило определить ряд закономерностей:

Имеются морфометрические особенности яичниковой ткани у пациенток с бесплодием, ассоциированным со сниженным овариальным резервом.

Выявлены клиничко-морфологические параллели между гистологической структурой ткани яичников и эффективностью гонадотропной овариальной стимуляции у пациенток со сниженным овариальным резервом (представлено таблице 7).

Визуальное определение в ходе проведения гистологического исследования фолликулярного аппарата в сочетании со стигмами функциональной активности значимо коррелирует с результативностью стимуляции функции яичников;

При наличии ответа на овариальную стимуляцию фолликулярный рост определяется в том яичнике, в образце которого гистологически обнаруживают стигмы функциональной активности;

Возможность морфометрического определения поверхностного эпителия яичников является свидетельством более глубоких изменений в яичниковой ткани. Сохранение поверхностного эпителия яичников в гистологических образцах может быть следствием изменений самого ПЭЯ и подлежащей стромы коркового вещества яичника, а также косвенно характеризовать технику оперативного вмешательства.

Обнаружение поверхностного эпителия яичников на большей площади поверхности исследуемого образца ткани яичника указывают на более длительное течение заболевания и/или ассоциированы с продолжительностью предшествующей терапии.

Сосудистый компонент стромы коркового вещества яичников у пациенток со сниженным овариальным резервом представлен гиалинизированными микрососудами. Степень выраженности сосудистого компонента коркового слоя яичников имеют обратную связь с ответом на овариальную стимуляцию, что косвенно демонстрирует механизмы компенсации с позиции восстановления

трофики тканей за счет выраженной васкуляризации и свидетельствует о необходимости более раннего консультативного решения вопроса совместно с репродуктологами о возможности оперативного лечения.

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	<b>0,602333</b>
Кистозно-атрезирующие фолликулы	0,137984
Фиброзные тела	<b>0,390683</b>
Наличие поверхностного эпителия яичников	<b>-0,214333</b>
Выраженность сосудистого компонента	<b>-0,519431</b>

Визуальная оценка ткани яичников во время лапароскопии (размеры, форма яичников, их поверхность, характеристика разреза) позволяет сформировать представление относительно возможной ее функциональной активности, а гистологическая оценка яичниковой ткани косвенно отражает потенциал для активации с использованием хирургических технологий.

На основании данных литературы произведен выбор кандидатных белков для изучения ИГХ-экспрессии тканевых маркеров. У пациенток со сниженным овариальным резервом существует субстрат для последующего влияния механизмов активации в части дефектов сигнальных путей PI3K / Akt / mTOR и Hippo, в связи с чем нами были выбраны ключевые компоненты данных сигнальных путей – белки LATS1, MST1, YAP и PTEN.

## **8.2 Результаты патоморфологического исследования эндометрия у пациенток со сниженным овариальным резервом**

У 52 из 89 пациенток (58%) морфологическая картина эндометрия соответствовала дню менструального цикла и не противоречила его гистологической структуре, характерной для приема заместительной гормональной терапии. Соскоб эндометрия был представлен слизистой с наличием прямых желез, имеющих узкий просвет выстланных высоким цилиндрическим многорядным эпителием, с определением незначительного количества митозов. Строма характеризовалась наличием мелких клеток с вариабельностью формы, с незначительной лимфоцитарной инфильтрацией. Определялось слабое развитие спиральных артерий, что соответствовало фазе ранней-средней пролиферации.

У 18 пациенток (20%) при патоморфологическом исследовании слизистой тела матки выявлялись признаки хронического эндометрита, определяемые в виде рассеянной лимфоцитарной инфильтрацией стромы, наличием лимфоидных инфильтратов вокруг желез и периваскулярно, единичными эозинофилами, фиброзом стромы и атрофическими изменениями желез, при этом выраженность фиброза была различной от очаговых до диффузных форм.

У 5 пациенток (6%) отмечалось наличие стромального отека эндометрия, у четверых (4%) были определены склеротические изменения стромы слизистой полости матки. У 3 пациенток по данным патоморфологического исследования верифицирован полип эндометрия без признаков атипии, псаммомные тельца выявлены у 1 женщины, фиброз стромы, в сочетании с нарушениями кровообращения и атрофией желез эндометрия, изолированно выявлен у 7 пациенток (8%).

20 пациенткам, включенным в исследование, была выполнена иммуногистохимическая оценка состояния эндометрия, полученного в ходе хирургического этапа лечения.

Определяли уровень экспрессии белков сигнального пути Hippo (YAP, MST-1, LATS-1) и PTEN, являющегося ингибитором фосфоинозитол-3 – киназного сигнального пути в стромальном и железистом компонентах эндометрия. Отмечен следующий уровень экспрессии: YAP от 19,42 до 24,48 УЕ (1-2 балла) в строме и от 26,63 до 40,43 условных единиц (1-2 балла) в железах эндометрия; MST-1 от 14,64 до 29,68 УЕ в строме (1-2 балла), 18,13-41,28 УЕ (1-2 балла) в железистом компоненте; LATS-1 18,27-35,94 УЕ (1-2 балла) и от 40,73 до 71,41 условных единиц (2-3 балла) в строме и железах эндометрия соответственно. Экспрессия PTEN оказалась равной 25,53-52,67 (2 балла) УЕ в строме и 18,02-38,71 УЕ (1-2 балла) в железах слизистой тела матки.

Так, экспрессия в железистом компоненте эндометрия имела статистически значимо более высокий уровень по всем вышеперечисленным маркерам, кроме PTEN, степень экспрессии которого был достоверно выше в строме эндометрия.  $p < 0.05$ .

У 3-х пациенток при морфологическом исследовании эндометрия которых определены признаки хронического эндометрита степень экспрессии указанных белков характеризовались следующими показателями YAP – 21,94; 19,85; 23,3 УЕ (1-2 балла) в строме, 35,41; 35,53; 34,21 УЕ (2 балла) в железах, MST-1 -29,68; 29,07; 19,2 УЕ (1-2 балла) в строме 41,28; 36,32; 20,63 УЕ (2 балла) в железах, LATS-1 25,37; 35,94; 20,33 УЕ (2 балла) в строме 57,87; 57,5; 57,09 УЕ (2 балла) в железах, PTEN 36,66; 26,8; 37,34 УЕ (2 балла) в строме и 27,13; 21,77; 21,37 УЕ (2 балла) в железах слизистой тела матки.

У пациентки в соскобе из полости матки которой выявлены псаммомные тельца определен уровень экспрессии в стромальном/железистом компонентах эндометрия: YAP 23,42/32,36 УЕ (2 балла); MST-1 27.34/34.62 УЕ (2 балла); LATS-1 34.41/49.41 УЕ (2 балла); PTEN 52.67/33.8 условных единиц (2 балла).

У 15 пациенток, с наличием нормальной морфологической структуры эндометрия, степень экспрессии тканевых маркеров варьировал в следующих пределах: YAP от 19,42 до 24,48 УЕ (1-2 балла) в строме и 29,57- 40,43 УЕ (2 балла) в железах; MST-1- 16,1-26,53 УЕ (1-2 балла) в строме 18,13- 38,39 УЕ (1-2

балла) в железах; LATS-1 -18.27-28.76 УЕ (1-2 балла) в строме и 40,73- 71,41(2-3 балла) УЕ в железистом компоненте соответственно. Уровень экспрессии PTEN определялся в диапазоне от 24,02 до 46,47 условных единиц (1-2 балла) в стромальном и 18,02-38,71 УЕ (1-2 балла) в железистом компонентах эндометрия соответственно.

### **8.3 Клинико-морфологические параллели между структурой тканей яичников и эндометрия у пациенток с крайне низким овариальным резервом (данные гистологического и иммуногистохимического исследований)**

С целью проведения прицельной оценки морфологического строения овариальной ткани при сниженном овариальном резерве, а также для определения клинико-морфологических параллелей между результативностью лечения бесплодия, и гистологической структурой яичниковой ткани и эндометрия и уровнем экспрессии белков PTEN, YAP, MST-1 и LATS-1 в них были исследованы образы тканей обоих яичников у 14 пациенток, включенных в исследование.

Изучен уровень экспрессии белков Нирро сигнального пути (YAP, MST-1, LATS-1) и ингибитора фосфоинозитол-3 – киназного сигнального пути- PTEN в ткани яичников. Отмечен следующий уровень экспрессии: YAP от 6,11 до 42,06 УЕ (0-2 балла); MST-1 от 8,18 до 45,85 УЕ в строме (0-2 балла); LATS-1 24-75,44 УЕ (2-3 балла). Экспрессия PTEN составила 14,79-58,09 (1-2 балла) УЕ. Примечательна неравная экспрессия в парных образцах ткани яичников в пользу одного из них. При этом разница в экспрессии всех изучаемых иммуногистохимических маркеров явилась статистически достоверной ( $p < 0.05$ ) (показано на Рисунке 30 -А,Б,В,Г).

При соотнесении уровня экспрессии тканевых маркеров с данными представленными в Human Protein Atlas установлены статистически значимые отличия по белкам Нирро- сигнального пути. Средние значения уровней

экспрессии в исследуемой группе (среднее значение, приведенное в атласе экспрессии белков, уровень значимости, p): LATS-1  $45,51 \pm 13,35$  ( $9,3 \pm 1,7$  p=0,0001); MST-1  $23,61 \pm 7,94$  ( $12,5 \pm 9,1$  p=0,0001); YAP  $23,60 \pm 6,44$  ( $53,1 \pm 12,7$  p=0,0001); PTEN  $24,9 \pm 8,26$  ( $28,0 \pm 9,7$  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 31 А,Б,В,Г).

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

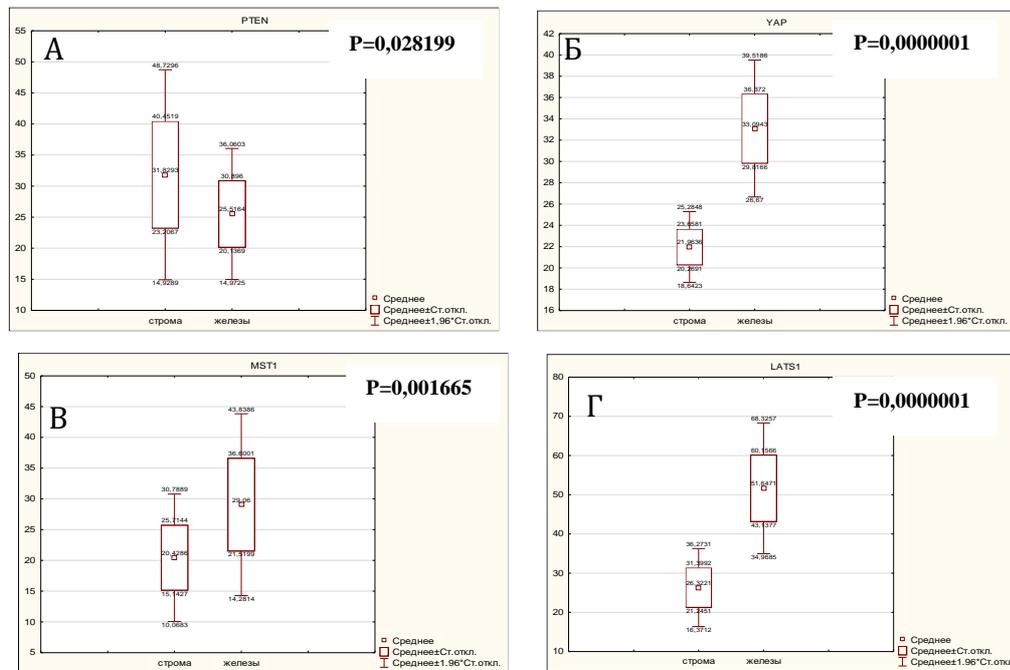


Рисунок 30 -А,Б,В,Г. Уровни экспрессии PTEN, YAP, MST-1, LATS-1 в строме и железистом компонентах эндометрия пациенток, включенных в исследование

При проведении морфологической оценки овариальной ткани у пациенток с наступлением беременности в постоперационном периоде выявлены стигмы фолликулогенеза различной степени давности: скопление текалютеинизированных клеток и наличие фиброзных тел в образцах коркового

слоя обоих яичников в сочетании с морфометрической визуализацией поверхностного эпителия яичников, определяемого на площади от 5 до 10%, и числа сосудов на единицу объема коркового слоя яичников от 0 до 3. Уровень экспрессии тканевых маркеров при этом составлял 1-2 балла.

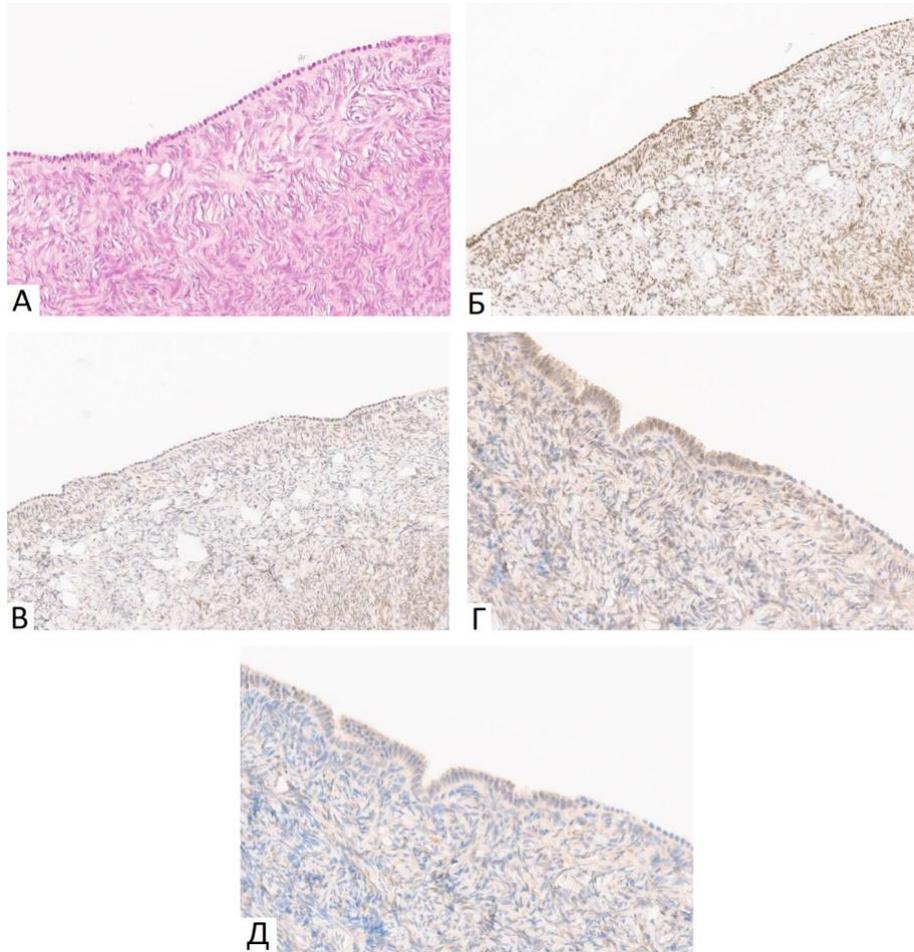


Рисунок 31- Экспрессия маркеров PI3K / Akt / mTOR и Hippo-сигнальных путей в корковом слое яичника с сохраненным поверхностным эпителием и отсутствием стигм фолликулогенеза, А. Окраска гематоксилином и эозином, х 200. Б. Экспрессия LATS1, х 200, В. Экспрессия PTEN, х 200, Г. Экспрессия MST1, х 200, Д. Экспрессия YAP, х 200

Важно отметить, что состояние эндометрия у пациенток при наступлении беременности характеризовалось соответствием его гистологической структуры дню менструального цикла во всех случаях.

В результате комплексного лечения бесплодия с использованием одноэтапного хирургического метода активации функции яичников к настоящему моменту наступило 23 беременности у 22 пациенток из 89, включенных в исследование, период послеоперационного наблюдения которых составляет от 14 дней до 1,5 лет.

При сопоставлении полученных данных иммуногистохимического исследования с морфологической характеристикой яичниковой ткани выявлены следующие закономерности: при визуализации поверхностного эпителия яичников на площади поверхности исследуемого образца равной более 20% отмечается статистически значимо более высокие значения экспрессии ранее описанных белков Hippo сигнального пути, приближаясь к минимально отмеченным значениям при отсутствии морфометрической визуализации поверхностного эпителия яичников.

При соотнесении данных степени выраженности сосудистого компонента в строме коркового слоя яичников с уровнем экспрессии тканевых маркеров корреляционной взаимосвязи выявлено не было.

Наличие стигм функциональной активности характеризуется обратной корреляцией со степенью экспрессии белков YAP, PTEN, LATS-1, MST-1. При этом данная корреляция статистически достоверна ( $p < 0.05$ ) В образцах коркового слоя яичников без визуализации стигм фолликулогенеза (фолликулярного аппарата, белых и фиброзных тел, инклюзионных кист и др.) выявлен наибольший уровень экспрессии, достигающий 3-х баллов.

Отмечены отличия в степени экспрессии протеинов в зависимости от исходов лечения бесплодия.

При отсутствии ответа на овариальную стимуляцию экспрессия тканевых маркеров характеризуется статистически значимо более высоким уровнем, при этом ответ на стимуляцию отмечается в том яичнике, в образце которого при иммуногистохимическом исследовании степень экспрессии ниже.

У 22 пациенток, у которых отмечено наступление беременности в результате комплексного лечения бесплодия с использованием хирургического

метода активации функции яичников, уровень экспрессии вышеотмеченных белков был статистически значимо ниже, чем у пациенток без наступления беременности в исходе лечения бесплодия ( $p < 0.05$ ) и характеризовался следующими показателями YAP от 16,46 до 30,45 UE (1 балл), MST-1 -15,74-29,18 UE (1 балл), LATS-1 24-53,67 UE (1-2 балла), PTEN 14,79-32,65 UE (1-2 балла). При этом наибольшие различия в показателях отмечены в экспрессии PTEN.

При специальном сравнительном анализе показателей, определяющих гистологическое строение ткани яичников у пациенток со сниженным овариальным резервом, нами были установлены морфометрические особенности овариальной ткани, коррелирующие с таковыми в эндометрии. Однако отсутствует статистически значимая корреляционная связь между экспрессией тканевых маркеров, определяемых методом иммуногистохимии в тканях яичников и эндометрия.

## Глава 9. Обсуждение полученных результатов

В контексте изучения этиологии и патогенеза снижения овариального резерва рассматриваются различные аспекты генетических нарушений, аутоиммунных заболеваний, ятрогенных факторов и др. Значимая доля опубликованных исследований посвящена фундаментальным механизмам возникновения и прогрессирования различных форм преждевременной недостаточности яичников.

В ходе настоящего исследования для исключения генетически детерминированной ПНЯ было проведена оценка статуса гена FMR1. У 6 из 89 (6,74%) пациенток частота CGG повторов в указанном гене равнялась 26 и менее, что описывается как неизученная область с позиции возможного влияния на овариальный резерв. Нами определены морфометрические особенности яичниковой ткани и эндометрия у данных больных с выявлением параллелей

между последними и результативностью лечения бесплодия в данной группе пациенток.

Таким образом, вопрос о клинической значимости частоты повторов в указанном гене остается открытым и требует дальнейшего изучения и выявления клинико-морфологических ассоциаций между частотой повторов CGG, вариантами клинической манифестации ПНЯ и гистологической структурой яичниковой ткани, в частности характерологических особенностей коркового слоя яичников [135].

Следует подчеркнуть статистически значимую корреляцию заболеваний щитовидной железы аутоиммунного генеза, ассоциированных со снижением ее функции с крайне низким овариальным резервом. Полученные нами результаты оценки анамнестических данных не противоречат данным профессора, д.м.н. **Перминовой С.Г.**, изучившей вклад аутоиммунных заболеваний в развитие снижения овариального резерва [4].

Пациенты с ПНЯ и сопутствующими аутоиммунными заболеваниями неотличимы от пациентов с отрицательным аутоиммунным статусом с позиции возраста манифестации заболевания, распространенности первичной аменореи или гормонального профиля. Специфическая неинвазивная достоверная диагностика аутоиммунной этиологии процесса отсутствует; поэтому целесообразно определение наиболее распространенных аутоантител, таких как антитела к стероидпродуцирующим клеткам надпочечников и яичников и анти тиреоидных антител.

Овариальный резерв является важной детерминантой репродуктивного потенциала женщины. Этиология сниженного овариального резерва остается не до конца изученной, но известно, что концентрации цитокинов в фолликулярной жидкости играют роль в развитии и созревании фолликулов.

Изменения профиля цитокинов, характеризующиеся повышенным содержанием хемокинов и факторов воспаления могут способствовать прогрессированию заболевания или даже играют решающую роль в генезе недостаточности яичников [63].

Результаты, полученные в ходе выполнения ультразвуковой сонографии на дооперационном этапе, согласуются с данными, полученными ранее G.S. Conway и соавторами, которыми было установлено, что при ПНЯ фолликулярный тип патологии выявляется в 60% случаев.

Выборка больных, включенных в настоящее исследование, отличается в контексте исходного снижения овариального резерва и включением в исследование ряда пациенток с сохраненным ритмом менструаций.

Сигнальный путь Hippo, играющий роль в регуляции размеров всех органов, представлен в организмах различных видов от насекомых до млекопитающих. Нарушение функционирования сигнального пути Hippo приводит к усилению ядерной транслокации эффекторного Yes-ассоциированного белка (YAP), что опосредует экспрессию богатого цистеином 61 фактора роста соединительной ткани, сверхэкспрессированных факторов роста нефробластомы (CCN) и бакуловирусных ингибиторов апоптоза (BIRC), что приводит к увеличению размеров органов.

Кроме того, полногеномный «нокдаун генов» в клетках насекомых продемонстрировал, что полимеризация актина способствует ядерной транслокации YAP. В яичниках млекопитающих изучена экспрессия генов сигнального пути Hippo и показано, что фрагментация овариальной ткани увеличивает полимеризацию актина, что приводит к ядерной транслокации YAP и усилению экспрессии богатого цистеином 61, фактора роста CCN и ингибиторов апоптоза BIRC с последующей активацией роста фолликулов.

Суммированы данные, свидетельствующие о роли механического воздействия (повреждения) в процессе фолликулярного роста. Фрагментация ткани яичников в сочетании с инкубацией *in vitro* с Akt-стимулирующими препаратами легла в основу терапии активации *in vitro* (*in vitro* activation-IVA) для лечения пациенток с преждевременной недостаточностью яичников, в то время как изолированно фрагментация коркового слоя яичников (IVA без фармакологического воздействия) оказалась эффективной при лечении пациенток с преждевременной недостаточностью яичников с небольшим периодом

предшествующей аменорее. Для женщин среднего возраста с бедным ответом на стимуляцию функции яичников и сниженным овариальным резервом немедикаментозная активация также была эффективна в индукции роста фолликулов при лечении бесплодия.

Учитывая результативность лечения с использованием подходов к механическому воздействию на овариальную ткань будущие исследования помогут оценить возможности усовершенствования методик, подразумевающих механическое воздействие и локального введения лекарственных препаратов, усиливающих полимеризацию актина, для лечения бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом [93].

Известно, что фолликулогенез – это сложный биологический процесс, участие в котором принимают сразу несколько независимо регулируемых сигнальных путей [106]. Среди многих регуляторов определена критическая роль PI3K / Akt / mTOR сигнального пути. Его функционирование ингибируется фосфатазой PTEN и комплексом туберозного склероза (TSC1 / 2). Делеция PTEN или TSC1 / 2 у мышей вызывает сверхэкспрессию Akt и / или mTOR и, следовательно, фосфорилирование нижележащего рибосомного белка S6 (rpS6) в ооците, что приводит к массивной и преждевременной активации пула примордиальных фолликулов [139, 181, 53, 96, 16].

Ряд экспериментальных исследований показал, что передача сигналов по Hippo- пути также играет решающую роль в активации фолликулярного роста [97]. Путь Hippo был идентифицирован как главный супрессор чрезмерного роста тканей [201].

Передача сигналов по нему происходит через каскад серин / треониновых протеинкиназ, включающий в себя киназу-супрессор опухолей (LATS1 / 2), Ste-20-подобную киназу млекопитающих (MST1 / 2), адаптер Salvador (Sav) и связывающие белки Mps one (Mob), которые препятствуют доступу к ядру ключевых эффекторов белка YAP (Yes-associated protein) посредством фосфорилирования и цитоплазматического удержания.

При фрагментации овариальной ткани нарушается функционирование сигнального пути Hippo, что приводит к транслокации нефосфорилированного YAP в ядро для взаимодействия с транскрипционными факторами, в том числе регулирующими процессы апоптоза [147]. Культивирование ткани яичников в присутствии ингибитора PTEN и/или активатора PI3K вызывает массивную инициацию роста примордиальных фолликулов [18,33].

Также продемонстрирована критическая роль Lats1 / 2 в реализации функционирования клеток гранулезы, в том числе под влиянием данных ключевых факторов [87].

Таким образом, хирургическая активация приводит к реализации эффектов сигнальных путей PI3K / Akt / mTOR и Hippo на рекрутинг и рост фолликулов у пациенток со сниженным овариальным резервом [176].

Наше исследование демонстрирует, что у пациенток со сниженным овариальным резервом действительно существует субстрат для последующего влияния механизмов активации в части дефектов сигнальных путей PI3K / Akt / mTOR и Hippo, в связи с чем нами были выбраны ключевые компоненты данных сигнальных путей – белки LATS1, MST1, YAP и PTEN. Принимая во внимание вышеописанные закономерности, ожидаемым был результат обратной пропорциональности между наличием стигм функциональной активности и уровнем экспрессии белков YAP, PTEN, LATS-1, MST-1.

Факт повышенной экспрессии всех выбранных компонентов говорит о тотальном нарушении обоих сигнальных путей у пациенток с отсутствием стигм фолликулогенеза и необходимостью снижения уровня всех компонентов для успешной хирургической активации.

С этой же точки зрения можно объяснить взаимосвязь между сохранением поверхностного эпителия яичников, стигмами фолликулогенеза и экспрессией белков YAP, PTEN, LATS-1, MST-1. Первостепенным, на наш взгляд, является невозможность рекрутинга и роста фолликулов в отсутствии нормального функционирования PI3K / Akt / mTOR и Hippo-сигнальных путей. Ановуляция не

позволяет поверхностному эпителию яичника сохранять физиологическую пластичность, не потенцирует его репаративное восстановление с обретением эпителиальных или мезенхимальных фенотипических свойств, что присуще данному типу ткани в овуляторном менструальном цикле.

Таким образом, нарушение экспрессии путей PI3K / Akt / mTOR и Hippo ведет к изменению процесса созревания фолликулов, циклических изменений поверхностного эпителия яичников и образования стигм фолликулогенеза.

Спектр тканевых маркеров, уровень экспрессии которых изучался в рамках настоящего исследования, обусловлен принципиальным влиянием Hippo, фосфоинозитол-3-киназного сигнальных путей на различные этапы фолликулогенеза: от рекрутинга примордиальных фолликулов до селекции доминантного фолликула. Ключевым компонентом пути Hippo является киназа - Yap (Yes-activated protein), которая в активном состоянии способна связывать ряд факторов транскрипции, таких как p73, p53-binding protein-2 (p53BP2), RUNX2, SMAD7, ERBB4, REBP2a и TEAD/TEF.

Таким образом, для реализации всех этапов фолликулогенеза с позиции индукции фолликулярного роста необходима активация фосфоинозитол-3-киназного сигнального пути, при одновременной инактивации PTEN, а также прекращение передачи сигнала по Hippo-пути [147].

Несмотря на то, что гормональная регуляция фолликулярного роста широко исследована, большинство работ сосредоточено на изучении развития ранних антральных фолликулов до преовуляторной стадии, что привело к успешному использованию экзогенного ФСГ в лечении бесплодия.

Накопленные данные свидетельствуют о том, что преантральные фолликулы находятся под регуляцией со стороны ФСГ и местных внутрияичниковых факторов, что дает возможность разрабатывать новые подходы к лечению бесплодия.

Натрийуретический фактор С-типа, полученный из клеток гранулезы, не только подавляет окончательное созревание ооцитов для разрушения

зародышевых пузырьков перед овуляцией, но также способствует росту преантральных и антральных фолликулов. Кроме того, некоторые факторы, обнаруженные в ооцитах и клетках гранулезы, стимулируют рост преантральных фолликулов, действуя через рецепторы тирозинкиназы, серинкиназы и другие сигнальные пути. Напротив, овариальный сигнальный путь Hippo ограничивает рост фолликулов, а нарушение передачи сигналов по нему способствует росту фолликулов.

Несмотря на то, что точные гормональные факторы, участвующие в активации примордиальных фолликулов, еще предстоит выяснить, протеинкиназа В (АКТ) и мишень сигнальных путей рапамицина у млекопитающих важны для активации dormantных примордиальных фолликулов. Нарушение передачи сигналов по пути Hippo после фрагментации ткани яичников в сочетании с обработкой ингибиторами фосфатазы и гомолога тензина (PTEN) и стимуляторами фосфоинозитид-3-киназы для усиления передачи сигналов АКТ способствует росту преантральных фолликулов у пациентов с преждевременной недостаточностью яичников, что обосновывает применение новой стратегии в лечении бесплодия у этой группы пациентов.

Изучение интраовариальных механизмов, лежащих в основе раннего фолликулогенеза, может явиться базисом в разработке новых подходов к лечению пациенток с ПНЯ, СПКЯ и бедным ответом на стимуляцию функции яичников, а также для пациенток с бесплодием позднего репродуктивного возраста [106].

### **9.1 Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников для лечения преждевременной недостаточности яичников и восстановления овариальной функции**

Вопрос активации функции яичников при ПНЯ и «бедном» ответе на овариальную стимуляцию остается открытым и требует дальнейшего изучения и

совершенствования как подходов и разработки тактики ведения в целом, так и обеспечения эффективности и безопасности оперативного вмешательства.

Разработанная нами методика активации функции яичников при ПНЯ и «бедном» ответе на стимуляцию функции яичников представляет комплекс различных этапов подготовки и хирургического лечения, впервые описанных 6 марта 2019 года.

## 9.2 Описание метода

Производится лапароскопия по стандартной методике, выполняется визуальная ревизия внутренних половых органов и оценка состояния овариального резерва. Критериями оценки овариального резерва являются: размеры яичников, количество фолликулов и стадия их развития (по диаметру фолликулов), толщина и особенности строения коркового слоя, наличие стигм функциональной активности яичников. Для оценки проходимости маточных труб проводится хромогидротубация.

Производится иссечение участка коркового слоя обоих яичников (размером до 1 см) максимально вдоль к поверхности органа. В условиях операционной с использованием стерильного гаметного буфера врачом-патоморфологом выполняется фрагментация иссеченного участка коркового слоя яичника до размеров 1 мм x 1 мм. В это же время осуществляется формирование пространства между остаточной корой и мозговым веществом ипсилатерального яичника и образование углубления в мозговом веществе, в область которого проводится одноэтапная реимплантация фрагментированной ткани. Далее производится ушивание ложа с использованием ареактивного шовного материала. Затягивание швов выполняется до сопоставления краев раны, что исключает перетягивание и ишемизацию ткани. Одновременно выполняется этап гистероскопии, ревизии полости матки, биопсия эндометрия. При проведении описанного оперативного вмешательства не допускается использование каких-

либо хирургических энергий. Биоптат эндометрия и 10% объема каждого фрагмента яичниковой ткани направляются на гистологическое исследование.

Впервые, метод активации фолликулярного роста, подразумевающий хирургическое воздействие, был предложен К. Kawamura, который описал активацию *in vitro* остаточных фолликулов при помощи индуцированных изменений в системе сигнальных путей создавая, таким образом, альтернативу донорским программам в лечении бесплодия у пациентов с ПНЯ. В настоящее время различные модификации данной операции используются в 8 странах мира. Ни один из авторов, опубликовавших свои данные о различных модификациях IVA, не проводит гистероскопию, которая с нашей точки зрения является важным этапом в комплексном лечении бесплодия, в особенности у пациентов со сниженным овариальным резервом.

На основании изучения международного опыта, а также оценивая крайне актуальную клиническую необходимость Академиком Л.В. Адамян в 2019 году разработан новый одноэтапный хирургический метод активации функции яичников, подразумевающий реимплантацию фрагментированных участков коркового слоя яичника при преждевременной недостаточности яичников и «бедном» ответе на овариальную стимуляцию.

Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников подразумевает под собой: Углубленное изучение структур яичников с использованием методов визуализации (Ультразвуковое исследование). Лапароскопия, иссечение участка коркового слоя по собственной методике, создание ложа для реимплантации, фрагментация биопсированной части яичника, унилатеральная реимплантация фрагментированных участков с обязательным гистологическим контролем 10-20% каждого «стрипа». Операция проводится с использованием только механической энергии. Операция не предполагает использования гемостатических и инородных материалов. Одновременно для исключения других факторов бесплодия и повышения эффективности лечения проводится гистероскопия, биопсия эндометрия, хромогидротубация.

В результате проведения ряда подобных операций получены положительные результаты в отношении восстановления овуляторной функции, оптимизации ответа на стимуляцию функции яичников и наступления беременности.

У 5 из 13 пациенток, объем проведенной операции у которых заключался в ревизионной лапаро-гистероскопии наступила спонтанная беременность в сроки от 2 до 8 месяцев после операции, что подчеркивает целесообразность исключения сопутствующих анатомических факторов бесплодия при проведении планового оперативного вмешательства, несмотря на уже установленный фактор снижения репродуктивного потенциала в виде крайне низкого овариального резерва.

Полученные в динамике результаты хирургического этапа лечения, определяемые в ходе послеоперационного наблюдения связаны с ростом уровня эстрадиола, отмеченным уже на 3-5-е сутки послеоперационного периода (в среднем в 3,56 раз), а также улучшением показателей кровотока в ткани яичников.

При обсуждении факторов влияющих на результативность комплексного лечения бесплодия в рамках данной диссертационной работы следует подчеркнуть безусловное влияние периоперационного стресса на различные звенья репродуктивной системы от изменения частоты синтеза рилизинг-факторов, включая гонадолиберины и их активирующее влияние на стероидпродуцирующую функцию яичников, до активации клеточного звена иммунной системы в результате хирургического воздействия на яичниковую ткань, брюшину малого таза, маточные трубы, слизистую тела матки и пр.

Известно, что активность коры надпочечников регулируется преимущественно гуморальным звеном иммунной системой. В ответ на хирургическое вмешательство уровень кортизола в сыворотке крови повышается. При этом степень повышения может зависеть от тяжести стрессового воздействия (Bidet M и соавт, 2011).

Этот процесс связан с регуляцией гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы посредством изменения цитокинового баланса. Такие цитокины как ИЛ-

1, ИЛ-6, ФНО-альфа, влияют на выделение релизинг-факторов, а также напрямую на гипофиз и надпочечники (Nicolas C и др., 2017).

Установлено, что гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система преимущественно активируется после экстубации, что сопровождается повышением уровня адренокортикотропного гормона (АКТГ) и кортизола. При этом уровень АКТГ быстро возвращается к исходным значениям, а уровень кортизола остается повышенным в течение 48-72 часов (Badawy A и соавт, 2007).

ФНО-альфа снижает активность синтеза кортизола посредством уменьшения чувствительности адреналовых рецепторов к АКТГ. Макрофаги и нейтрофилы, активно пролиферирующие при системном воспалительном ответе, синтезируют кортикостатины и дефензины. Последние, в свою очередь, ингибируют стероидную активность АКТГ. Возможно выделение активированными макрофагами ряда факторов, стимулирующих стероидогенез. К таким факторам, в частности, относится трансформирующий фактор роста бета (van Kasteren YM, Schoemaker J и др., 2003).

В ходе нашего исследования не была проведена динамическая оценка доплерометрических показателей кровотока у обследуемых больных. Однако согласно результатам исследования Н.А. Ран, выявившим с использованием энергетического доплеровского картирования значимую интенсификацию яичникового кровотока у женщин в постменопаузе после 3 месяцев назначения ЗГТ.

Полученные результаты могут быть объяснены, влиянием эстрогенов, как эндогенных регуляторов ангиогенеза. Определено, что ангиогенез не является характерным процессом при наличии физиологических условий в неповрежденных тканях и активируется при патологическом росте тканей в ходе опухолевого процесса, остром или хроническом воспалении и пр. Слизистая тела матки и овариальная ткань представляют собой исключение, в связи с тем, что процессы ангиогенеза в них происходят циклично в каждом менструальном периоде. Эстрадиол, потенцирует синтез оксида азота, являющегося

вазодилататором, а также сосудисто-эндотелиального фактора роста, который активирует неоангиогенез в овариальной ткани, обеспечивая адекватный своевременный рост капиллярной сети в процессе фолликулогенеза.

Результаты описанного и внедренного в реальную клиническую практику метода лечения бесплодия заключается в обеспечении безопасности и эффективности, за счёт минимизации объема иссекаемого участка коркового слоя яичника, что позволяет увеличить потенциал для индукции фолликулярного роста, происходящего в остаточном объеме коркового слоя и уменьшает травматическое воздействие на овариальную ткань. Исключение каких-либо хирургических энергий, кроме механической, использование ареактивного шовного материала в ходе реимплантации, предотвращает ишемизацию ткани яичника. Особая техника формирования ниши для ипсилатеральной реимплантации фрагментированных участков коркового слоя яичников является наиболее безопасным с позиции возникновения возможных онкологических рисков за счет максимального сохранения архетиктоники яичника. Двусторонняя реимплантация позволяет повысить вероятность активации фолликулярного роста в послеоперационном периоде. Таким образом, именно совокупность перечисленных признаков позволяет достигнуть желаемого результата.

1. В методе К. Kawamura допускается расширение объема операции от биопсии коркового слоя яичников до овариэктомии («Part of the cortex from one or both ovaries or one whole ovary (in the case of patients with shrunken ovaries), was removed under general anaesthesia by laparoscopy»). В результате проведения описанного нами метода происходит достижение аналогичного технического результата при меньшем объеме оперативного вмешательства.

2. Реимплантация при использовании метода К. Kawamura происходит в пространство между остаточной корой и мозговым слоем контрлатерального яичника («returning to the contralateral ovary by making a tunnel between cortex and medulla from an incision of the cortex»). В ходе выполнения описанного нами метода происходит формирование ниши (углубления) именно в мозговом слое

ипсилатерального яичника, что, по нашему мнению, является наиболее безопасным с позиции возникновения возможных онкологических рисков.

3. Также соавторы используют рассасывающийся противоспаечный барьер по окончании реимплантации («absorbable adhesion barrier to avoid adhesion of ovary with surrounding tissues and cube loss from grafted sites»). С целью оптимизации этапа реимплантации, производимой в ходе представленного нами метода, производится наложение провизорных швов с использованием ареактивного шовного материала.

4. Использование стерильного гаметного буфера не является основной отличительной чертой нашего метода, в связи с рутинным его использованием в ходе операций по сохранению репродуктивного материала, также описанного в работе Enrique Perez de la Blanca et al. Однако в ходе описания нашего метода данный факт подчеркнут с целью обращения внимания на отсутствие использования фармакологических активаторов при механической обработке яичниковой ткани.

5. В работе NAO Suzuki и соавторов описан метод активации фолликулярного роста, подразумевающий овариэктомию с последующей фармакологической активацией ткани. Необходимость использования электрокаутерия гемостаза в случае овариэктомии не является обязательной в связи с минимальной кровопотерей, обусловленной пересечением воронко-тазовой и собственной связок в ходе операции. В случае выполнения биопсии ткани яичника необходимость в гемостазе с использованием энергий является более очевидной, однако в ходе нашего метода ее применение не производится.

6. Использование ареактивного шовного материала предпочтительно в ходе операций на яичниках, как описано в том числе в работе Chang- Zhong Li и соавторов, однако в рамках операций, направленных на хирургическую активацию фолликулярного аппарата, данный материал ранее не использовался.

Примечательно, что в ходе проведенного нами исследования был выявлен ряд сопутствующих гинекологических заболеваний, с доказанным влиянием в

этиологической структуре эстрогенной зависимости. Наружный генитальный эндометриоз I-II ст. был выявлен у 36% пациенток со сниженным овариальным резервом, в том числе в сочетании с аденомиозом в 18% случаев. При этом эндометриозидные гетеротопии были отмечены у 82% пациенток при длительности нарушений менструального цикла по типу аменореи более 2-х лет, сопровождающихся приемом циклической заместительной гормональной терапии.

Связь между бесплодием и эндометриозом известна. Несмотря на то, что эндометриоз обычно регрессирует с наступлением естественной или индуцированной менопаузы из-за снижения уровня эстрогенов, в редких случаях эндометриоз может возникнуть впервые либо прогрессировать после менопаузы. Так, исследование **Lotz L и соавторов** было направлено на изучение женщин с преждевременной менопаузой, у которых был диагностирован эндометриоз во время лапароскопии по поводу трансплантации ткани яичника. В исследование были включены 17 пациенток, перенесших трансплантацию ткани яичников с целью восстановления фертильности, у которых во время операции был диагностирован эндометриоз. Очаги эндометриоза были полностью удалены, ткань яичника трансплантирована забрюшинно.

Средний возраст пациенток составил  $29,5 \pm 6,3$  года (от 14 до 39 лет) на момент забора ткани яичника и  $34,6 \pm 4,3$  года (от 28 до 40 лет) на момент трансплантации. До трансплантации 4 пациентки принимали заместительную гормональную терапию, 4 женщины принимали комбинированные оральные контрацептивы и двое получали тамоксифен. У 12 женщин был выявлен эндометриоз I стадии и у 5 эндометриоз II стадии по классификации rASRM. 4 пациентки отмечали наличие менструальных болей. Ни одна из женщин не предъявляла жалобы на тазовые боли или диспареунию. Частота наступления беременности в исследуемой группе составила 41,2%, а коэффициент живорождения – 35,3%. Беременность наступила в 3 случаях путем спонтанного зачатия, у 4 женщин в результате проведения программы ЭКО/ИКСИ в естественном цикле.

Данное исследование подчеркивает малоизученную связь между эндометриозом у женщин, с преждевременной или ранней менопаузой либо в связи с гонадотоксическим лечением, или как результат преждевременной недостаточности яичников [66]. Цель проводимого нами исследования не состояла в поиске механизмов прогрессирования эндометриоидного процесса несмотря на выраженный дефицит женских половых гормонов. По-видимому, существует множество иных механизмов патогенетического развития эндометриоза, такие как иммунологический фактор, генетическая детерминированность, процессы в рамках метапластической теории и пр действующие изолированно или синергично.

В рамках данной диссертационной работы проведено детальное изучение морфометрических особенностей яичниковой ткани у пациенток с крайне низким овариальным резервом, определяемых интраоперационно, а также дополненных данными гистологического и иммуногистохимического методов исследований. Полученные результаты не противоречат опубликованным к сегодняшнему дню данным литературы. В зависимости от данных гистологического исследования, определяется два типа морфологических особенностей яичниковой ткани при ПНЯ: наличие небольшого объема ткани без фолликулярного аппарата, и нормальный объем яичников в сочетании с определением остаточного фолликулярного аппарата.

Даже при отсутствии атретичных и примордиальных фолликулов существуют специфические морфологические особенности яичников при ПНЯ в отличие от таковых при дисгенезии гонад. Фолликулярный пул при дисгенезии гонад истощается во время эмбриогенеза или в первые несколько лет постнатального онтогенеза, яичники при этом не имеют фолликулярного аппарата, и представлены лишь стромой, в виде фиброзных полос [180].

При фолликулярном типе ПНЯ яичники имеют строму коркового слоя и белые тела, которые состоят из эозинофильной массы, окруженной богатой коллагеном соединительнотканной капсулой. Нередко вокруг примордиальных фолликулов наблюдается лимфоплазмоцитарная инфильтрация.

С помощью световой и электронной микроскопии в яичниках женщин с ПНЯ можно наблюдать плотную соединительную ткань и некоторое количество белых тел [167].

При световой микроскопии отмечаются следующие особенности: мозговое вещество, и внешняя кортикальная область представлены единой массой без четкой границы. Распределение фибриллярных и клеточных элементов неоднородно.

Электронная микроскопия показывает высокую концентрацию фибробластов и коллагеновых волокон в строме яичника. Кроме того, в строме клеточные элементы распределены неравномерно, в некоторых областях наблюдается большее отложение коллагена, а в других – большее количество клеточных элементов [167]. Внутри белых тел, а также на их периферии фибробласты содержат высокую концентрацию цитоплазматических миофиламентов. [51, 118, 158].

Несмотря на имеющийся международный опыт в плане стимуляции функции яичников у пациенток с крайне низким овариальным резервом, в том числе после хирургической активации функции яичников нами в ходе гонадотропной стимуляции функции яичников были использованы дозы не превышающие 225 МЕ в сутки с продолжительностью стимуляции функции яичников не более 10-12 дней.

Использование высоких доз ФСГ в протоколах стимуляции функции яичников в рамках вспомогательных репродуктивных технологий приводят к нарушению потенции фолликулов к овуляторному разрыву и к снижению качества получаемых ооцитов. На животных моделях у особей со сниженным овариальным резервом применение чрезмерных доз ФСГ приводит к фенотипической неоднородности преовуляторных фолликулов, при этом большинство из них подвергаются преждевременной лютеинизации. При выполнении глубокого анализа транскриптома клеток гранулезы, кумулюсных клеток и ооцитов из фолликулов животных, получавших стандартные или высокие дозы ФСГ, выявлены прогрессивные изменения на уровне экспрессии

генов в трех типах клеток с увеличением тяжести фолликулярных дисморфизмов при использовании чрезмерных доз гонадотропинов. Гранулезные и кумулюсные клетки постепенно отклонялись от нормального клеточного строения и становились фенотипически идентичны.

Анализ сигнальных путей указывает на возможную дисрегуляцию финальных стадий фолликулогенеза, при этом процессы овуляции и лютеинизации происходят одновременно, а не последовательно в наиболее сильно измененных фолликулах. Эти нарушения связаны с изменениями функционирования ключевых сигнальных путей в гранулезных и кумулюсных клетках, что может объяснить ранее отмеченное снижение концентрации эстрадиола, увеличение уровней прогестерона и окситоцина в сочетании со снижением количества овуляторных циклов (Clark ZL и др. 2022).

Эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) во многом определяется полноценной имплантацией эмбриона в стенку матки, что в свою очередь зависит напрямую от функционального состояния эндометрия [182]. В настоящее время для исследования структуры и функционального состояния эндометрия применим целый ряд лабораторных и инструментальных исследований, со значительным вкладом гистероскопической оценки состояния полости матки, наряду с ультразвуковым исследованием [98].

На сегодняшний день гистероскопия является верифицирующим методом изучения состояния полости матки и используется как для первичной диагностики, так и для одномоментного лечения внутриматочной патологии [98].

В ходе настоящего исследования определены особенности состояния эндометрия и полости матки у женщин со сниженным овариальным резервом путем проведения гистероскопии, биопсии эндометрия с последующим патоморфологическим исследованием: изменение длины и формы полости матки у большинства пациенток, усиление сосудистого рисунка у трети из них, сохранение железистого компонента у 100%. Выявление внутриматочной патологии и аденомиоза у ряда пациенток отражает необходимость исключения ее при отсутствии эффекта от проводимого ранее лечения бесплодия, в

особенности при отсутствии иных его факторов. Наличие гистологически подтвержденного хронического эндометрита у 20% женщин указывает на значимую роль маточного фактора бесплодия, сочетанного со снижением овариального резерва.

При гистероскопической оценке полости матки и эндометрия выявлены следующие особенности: длина полости матки была уменьшена по сравнению со средними значениями женщин репродуктивного возраста и составила  $6,34 \pm 0,50$  см, что косвенно может отражать определенные гормональные изменения, возникшие в процессе формирования основного заболевания до начала заместительной терапии. При этом длительность нарушений менструального цикла была ассоциирована с меньшей длиной полости матки ( $p < 0.05$ ).

Полость матки у 58% пациенток имела седловидную форму что может являться следствием индивидуальных анатомических особенностей, а также отражать относительное снижение концентрации биодоступного эстрадиола, оказывающего эффекты в периферических тканях. У 28% пациенток, полость матки которых имела нормальную форму, ритм менструаций до оперативного лечения не был изменен, что является косвенным подтверждением этого суждения.

Усиление сосудистого рисунка у 36% пациенток, включенных в исследование, отражает наличие хронического эндометрита, далее подтвержденного патоморфологически более чем у половины из них. Данный факт показывает сочетанную природу бесплодия у пациенток со сниженным овариальным резервом и диктует необходимость комплексного подхода к ведению этой группы больных.

Акцентируем внимание на том, что железистый рисунок был сохранен у всех пациенток независимо от наличия и длительности нарушений менструального цикла, что свидетельствует о возможности имплантации эмбриона в полость матки и наступления беременности самопроизвольно или на фоне дальнейшего лечения с использованием методов ВРТ.

Обнаружение внутриматочной патологии, впервые верифицированной во в ходе данного исследования у 14% пациенток и аденомиоза у 18%, свидетельствует о необходимости исключения их, в особенности при отсутствии иных факторов бесплодия.

Наличие фиброза и склероза стромы с расстройствами кровообращения и атрофией желез эндометрия у 12% пациенток указывает на наличие более глубоких изменений в слизистой тела матки, прямо коррелирующих с длительностью нарушений менструального цикла по типу аменореи, гормональная коррекция которых характеризовалась отложенным началом (от 6 месяцев до 1,5 лет). Обратимость указанных изменений является спорной и требует дальнейшего изучения.

Примечательно, что более чем у половины больных (75%) эндометрий имел нормальное строение и соответствовал фазе менструального цикла, что свидетельствует о возможности имплантации эмбриона в полость матки и наступления беременности самопроизвольно или на фоне дальнейшего лечения с использованием методов ВРТ.

Необходимо отметить, что при выявлении признаков воспалительных изменений в эндометрии при морфологическом исследовании в отдельных образцах отмечается более высокий уровень экспрессии вышеуказанных тканевых маркеров, однако при совокупной оценке образцов ткани эндометрия всех пациенток, включенных в исследование статистически значимых различий как в железистом, так и в стромальном компоненте эндометрия с позиции экспрессии иммуногистохимических маркеров выявлено не было.

При сравнении полученных результатов с данными, приведенными в атласе экспрессии белков «The Human Protein Atlas» были отмечены статистически значимые различия по всем изучаемым маркерам: уровень экспрессии YAP, PTEN, LATS-1 и MST-1 в ткани эндометрия у пациенток со сниженным овариальным резервом характеризуется достоверно более высоким уровнем (слабая- сильная экспрессия- 1-3 балла) по сравнению с таковым в образцах

эндометрия у женщин, имеющих регулярный менструальный цикл (отсутствие экспрессии- слабая экспрессия- 0-1 балл).  $p < 0.05$

Имеются морфометрические особенности яичниковой ткани у пациенток с бесплодием, ассоциированным со сниженным овариальным резервом. Определяются клиничко-морфологические параллели между гистологической структурой яичниковой ткани и результативностью стимуляции функции яичников у пациенток со сниженным овариальным резервом.

Выявлены клиничко-морфологические параллели между гистологической структурой яичниковой ткани и эндометрия, иммуногистохимической экспрессией тканевых маркеров в них и результативностью стимуляции функции яичников у пациенток со сниженным овариальным резервом.

Наличие фолликулярного аппарата и/или стигм функциональной активности при морфологическом исследовании значимо коррелирует с результативностью стимуляции функции яичников и уровнем экспрессии изучаемых белков при иммуногистохимическом исследовании;

При наличии ответа на овариальную стимуляцию фолликулярный рост определяется в том яичнике, в образце которого гистологически выявляют стигмы функциональной активности, а иммуногистохимическая экспрессия белков *Nippo* сигнального пути характеризуется как низкая;

Наличие поверхностного эпителия яичников на большей площади поверхности (более 20%) исследуемого образца ткани яичника положительно коррелирует с уровнем экспрессии кандидатных белков.

При сравнительном анализе показателей состояния эндометрия с патоморфологической оценкой строения яичника выявлены значимые параллели, что свидетельствует о функциональной взаимосвязи овариальной ткани и слизистой тела матки у пациенток с бесплодием при сниженном овариальном резерве. Однако отсутствует статистически значимая корреляционная связь между экспрессией тканевых маркеров, определяемых методом

иммуногистохимии в тканях яичников и эндометрия, что может быть связано с объемом выборки пациентов, включенных в исследование.

Необходимо подчеркнуть нормальную морфологическую характеристику состояния эндометрия, соответствующего фазе менструального цикла у всех пациенток, достигших беременности в ходе комплексного лечения бесплодия, включающего одноэтапный хирургический метод активации функции яичников.

В ходе исследования определены особенности состояния эндометрия у женщин со сниженным овариальным резервом путем проведения гистероскопии, биопсии эндометрия с последующим патоморфологическим исследованием в рамках выполнения одноэтапного хирургического метода активации функции яичников. Хронический эндометрит установлен у 25% женщин, при этом у ряда пациенток определены изолированные воспалительные изменения в виде отека стромы эндометрия, очагового фиброза и признаки неполноценной функциональной активности железистого компонента слизистой тела матки. Данные изменения указывают на значимую роль маточного фактора бесплодия, сочетанного со снижением овариального резерва.

Более высокий уровень экспрессии тканевых маркеров- LATS-1, MST-1, YAP и сниженный уровень экспрессии PTEN в железах эндометрия свидетельствует о нарушении регуляции Hippo- сигнального пути и отсутствии компенсаторного влияния со стороны Akt- сигнального пути, главным регулятором которого является PTEN.

Таким образом, у пациенток со сниженным овариальным резервом нарушено функционирование внутриклеточных сигнальных путей (прежде всего YAP и PTEN- зависимых), которое происходит, как в овариальной ткани, так и в эндометрии.

Морфологическая картина слизистой тела матки не отличалась у пациенток репродуктивного возраста с регулярным менструальным циклом и у пациенток со сниженным овариальным резервом, которым в рамках лечения бесплодия проводится заместительная гормональная терапия для восстановления циклических морфологических изменений эндометрия.

В то же время, 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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение овариального резерва от начальных проявлений в виде бесплодия неясного генеза в сочетании с базальным уровнем ФСГ, не выходящим за пределы референсных значений до развернутой клинической симптоматики, связанной с дефицитом женских половых гормонов, происходящей при манифестной ПНЯ имеет многофакторную полиэтиологичную природу, различные аспекты которой являются предметом многочисленных исследований.

Существует целый ряд изученных генетических факторов со значимым вкладом мутаций в генах FMR1 и AR, однако клиническая интерпретация результатов молекулярно-генетических исследований остается дискуссионной. Так, например вызывает вопросы значимость частоты CGG- повторов в гене FMR1, равная 26 и менее.

Не в полной мере освещены вопросы аутоиммунной опосредованности снижения овариального резерва и реальной вовлеченности механизмов, задействованных в патогенезе аутоиммунных заболеваний в фолликулогенез. Также представляет интерес потенциальная обратимость изменений в органах репродуктивной системы, возникших в ходе течения основного аутоиммунного процесса.

Показательные фундаментальные исследования в контексте изучения этиологии и патогенеза ПНЯ требуют поиска морфологического субстрата заболевания, что невозможно без использования методов репродуктивной хирургии. Только в результате оперативного вмешательства возможно получение уникального биологического материала, такого как перитонеальная жидкость, фолликулярная жидкость, биоптат яичника, биоптат париетальной брюшины органов малого таза, очаги эндометриоза различной локализации и др., что в значительной степени расширяет имеющиеся представления о данной нозологии.

В ходе настоящего исследования выявлены некоторые сопутствующие пролиферативные гинекологические заболевания, что является основой для

дальнейшего изучения различных аспектов эндометриоза, миомы матки и др. Рассматриваются и обосновываются подходы к стимуляции функции яичников при крайне низком овариальном резерве и ПНЯ, что является собой крайне актуальную проблему современной репродуктологии.

Дискутируется вопрос о назначении высоких доз гонадотропинов с точки зрения их клинической эффективности и безопасности. Так в настоящее время использование избыточных доз гонадотропинов, несопоставимых с ультразвуковой картиной яичников считается необоснованным и может иметь отрицательное влияние на остаточный фолликулярный пул посредством различных механизмов.

Сегодня, в том числе благодаря проведенному диссертационному исследованию расширены границы сывороточных концентраций ФСГ и ЛГ, допустимых для начала овариальной стимуляции. Так, стимуляция функции яичников может быть эффективна в ряде случаев при уровне ФСГ 25-40 мМЕ/мл, при визуализации антральных фолликулов.

Изучается эффективность и безопасность использования различных видов адъювантной терапии с применением нутрицевтиков, метаболитов андрогенов и пр. На сегодняшний день накоплен значительный мировой опыт, основанный на клинических исследованиях с высоким уровнем доказательности, демонстрирующих необоснованность рутинного использования андрогенового прайминга, несмотря на патогенетическую его обоснованность с позиции влияния на рекрутинг примордиальных фолликулов.

В данном исследовании получены данные, не представленные ранее в литературе о характерологических особенностях яичниковой ткани и эндометрия по результатам гистологического и иммуногистохимического методов исследований у пациенток с крайне низким овариальным резервом с выявлением значимой роли нарушений в системе внутриклеточных сигнальных путей (прежде всего PTEN-зависимых) на основании анализа уровня экспрессии их тканевых маркеров.

Продемонстрирована и обоснована принципиальная роль гистероскопической оценки состояния полости матки с одноэтапной коррекцией выявленных нарушений у пациенток со сниженным овариальным резервом, что повышает результативность комплексного лечения бесплодия в данной группе больных.

Изучен международный опыт, разработан и внедрен в клиническую практику собственный метод хирургической активации функции яичников, в значительной степени отличающийся от имеющихся на сегодняшний день модификаций оригинальной методики активации фолликулярного роста, предложенной К. Kawamura и соавт.

Различия представлены собственными критериями отбора пациенток для оперативного лечения, методами предоперационной подготовки, оптимизирующими хирургический этап, непосредственно техникой операции, а также взглядом на проблему послеоперационного ведения пациенток, включая персонифицированный подход к стимуляции функции яичников. В результате комплексного лечения бесплодия у пациенток с крайне низким овариальным резервом, проводимого в рамках данной диссертационной работы отмечено наступление 23 беременностей у 22 пациенток, при этом у 16 из них с собственными ооцитами.

Следует отметить, что даже в тех случаях, когда объем оперативного лечения ограничивался проведением ревизионной лапаро- и гистероскопии также удалось достичь беременностей, наступивших самопроизвольно в различные сроки послеоперационного периода, что показывает необходимость верификации и исключения анатомических факторов бесплодия даже при установленном клинико-лабораторно сниженном овариальном резерве.

Определена необходимость своевременной диагностики и верификации причин отсутствия наступления беременности у пациенток со сниженным овариальным резервом, с целью подбора обоснованной гормональной коррекции, использования вспомогательных репродуктивных и хирургических технологий,

включая одноэтапный метод активации функции яичников, что позволит предотвратить развитие необратимых изменений в различных структурах репродуктивного тракта, включая яичниковую ткань и эндометрий, и приведет к наступлению беременности у ряда больных.

## 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 пациентов, 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 см<sup>3</sup>.
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 СОКРАЩЕНИЙ

аГнРГ	-	агонист гонадотропин-рилизинг гормона
IVA	-	in vitro activation (активация ин витро)
АМГ	-	антимюллеров гормон
антГнРГ	-	антагонист гонадотропин-рилизинг гормона
ВОЗ	-	Всемирная организация здравоохранения
ВРТ	-	вспомогательные репродуктивные технологии
ГнРГ	-	гонадотропин-рилизинг гормон
ДНК	-	дезоксирибонуклеиновая кислота
E2	-	эстрадиол
ИКСИ	-	инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита
ИМТ	-	индекс массы тела
ЛГ	-	лютеинизирующий гормон
РНК	-	рибонуклеиновая кислота
рекФСГ	-	рекомбинантный ФСГ
УЗИ	-	ультразвуковое исследование
ФСГ	-	фолликулостимулирующий гормон
ХГ	-	хорионический гонадотропин
ЧМГ	-	человеческий менопаузальный гонадотропин
ЭКО и ПЭ	-	экстракорпоральное оплодотворение и перенос эмбрионов в полость матки
ВАХ	-	регулятор апоптоза ВАХ (Vcl-2-подобный протеин-4)
VCL-2	-	белок В-клеточной лимфомы-2
BIRC-5	-	сурвивин, ингибитор апоптоза бакуловирусов-5
BMP-15	-	костный морфогенетический протеин-15
EGF	-	(epidermal growth factor) эпидермальный фактор роста
EGFR	-	рецептор эпидермального фактора роста
GDF-9	-	ростовой фактор дифференцировки-9
HLA	-	(human leucocyte antigen) человеческий лейкоцитарный антиген
LIF	-	лейкемия-ингибирующий фактор
МАРК	-	митоген-активируемая протеинкиназа
PI3K-Akt- Foxo3	-	фосфоинозитид-3-киназный сигнальный путь
НАСНТ	-	антинейтрофильные цитоплазматические антитела
CGG	-	повторы цитозин-гуанин-гуанин
NOBOX	-	гены гомеобокса (гены, определяющие процессы роста и дифференцировки в организме) яичников новорожденного
FIGLA	-	гены фактора зародышевой линии альфа
WT1	-	белок опухоли Вильмса 1
NR5A1	-	ген, кодирующий белок стероидогенного фактора 1
GDF-9	-	фактор роста и дифференцировки 9
StAR	-	стероидогенный острый регуляторный белок
INHA	-	ген альфа-субъединицы ингибина

SOHLH 1,2	- спираль-петля-спираль ДНК-связывающие факторы 1 и 2
GWAS	- полногеномное секвенирование
STAG3	- стромальный антиген 3
HFM1	- АТФ-зависимый гомолог ДНК-геликазы
MSH4 и MSH5	- гомолог белков, участвующих в репарации ДНК- MutS 4 и 5
NUP107	- нуклеопорин 107 кДа
eIF4ENIF1	- мРНК- эукариотические факторы инициации трансляции 4E
ядерного фактора 1	
KHDRBS	- KH-домен, акцептирующий РНК-связывающий белок 1
POF1B	- premature ovarian failure protein 1B (белок преждевременной недостаточности яичников 1B)
IL1RL1	- подобный рецептору -1 интерлейкин- 1
SFRP4	- секретлируемый скрученный белок 4
S1PR1	- сфингозин-1-фосфатный рецептор 1
lncRNA HCP5	- длинная некодирующая РНК лейкоцитарного антигенного комплекса гистосовместимости P5- Histocompatibility leukocyte antigen complex P5
ALDH1A1	- альдегиддегидрогеназа-1A1
SBP1	- селен связывающий белок 1
HSP90β	- белок теплового шока 90-β
3β-HSD	- 3β-гидроксистероид-дегидрогеназа
CCL5	- лиганд- 5 хемокина
CCR5	- C-C-рецептор хемокина 5
MIP-1α	- макрофагальный воспалительный белок 1-альфа
IP-10	- индуцируемый интерфероном гамма-белок- 10
VEGF-D	- сосудистый эндотелиальный фактор роста- D
BDNF	- нейротрофический мозговой фактор
ESC-sEV	- внеклеточные везикулы, полученные из эмбриональных стволовых клеток
НисMSC	- микровезикулы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток пуповины
YAP	- «yes»- ассоциированный белок
CCN2	- фактор роста соединительной ткани-2
ASCOT	- мобилизованные из костного мозга аутологичные стволовые клетки

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамян, Л.В. Фолликулогенез яичников женщин с некоторыми формами эндометриоза / Л. В. Адамян, Л. Ф. Курило, И. Ю. Шуляк // Проблемы репродукции. – 2009 Ю – Т.15, N 1. – С. 78-85. [Adamyan LV, Kurilo LF, Shulyak IYu. Ovarian Folliculogenesis in women with some forms of endometriosis. Problems of reproduction. 2009;15(1):78-85. (In Russ.)]
2. Адамян, Л.В. Новое в репродуктивной хирургии: одноэтапный хирургический метод активации функции яичников /Л. В. Адамян, В. О. Дементьева, А. В. Асатурова // Акушерство и гинекология. – 2019. – N 3. – С.147-151.
3. Бесплодие в браке частота и структура: [Электронный ресурс]. URL: [http:// infopedia.su/15x80d.html](http://infopedia.su/15x80d.html)
4. Перминова С .Г. Бесплодие у женщин с патологией щитовидной железы: принципы диагностики, тактика ведения: докт. мед. наук.-М.,2010.-300 С.
5. Курило Л.Ф. Способ диагностики генеративной потенции яичников (патент на изобретение № 2367949 от 03.04.2008). [Kurilo L.F. Method of diagnostic of generative potency of ovaries (patent for invention No. 2367949 dated 03.04.2008). (In Russ.)]
6. Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников для лечения преждевременной недостаточности яичников и восстановления овариальной функции. Патент на изобретение № 2020133911. *Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников для лечения преждевременной недостаточности яичников и восстановления овариальной функции. Патент на изобретение № 2020133911.* (In Russ.)
7. A biallelic mutation in the homologous recombination repair gene SPIDR is associated with human gonadal dysgenesis / P. Smirin -Yosef, N. Zuckerman-Levin, S. Tzur [et al.] //J. Clinical Endocrinology Metabolism. -2017. –Vol. 102. – P. 681–688.

8. A diagnosis of diminished ovarian reserve does not impact embryo aneuploidy or live birth rates compared to patients with normal ovarian reserve / Y. Fouks, A. Penzias, W. Neuhausser [et al.] // *Fertility Sterility*. - 2022 Jul 9: S0015-0282(22)00386-7.
9. A Case-Control Study of Follicular Fluid Cytokine Profiles in Women with Diminished Ovarian Reserve / S. Abhar, J. Lu, HS. Hipp [ et al.] // *Reproduction Sci.* – 2021. - N 4.
10. A clinical research integration special program (CRISP) for young women with primary ovarian insufficiency / A. Falorni, V. Minarelli, C. M. Eads [ et al.] // *Panminerva Medicine*. -2014. – Vol. 56. – P. 245–261.
11. A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency/ C. Carlosama, M. Elzaiat, L.C. Patino [ et al.] // *Hum. Mol. Genet.* -2017. – Vol. 26.- P. 3161–3166.
12. A mutation in the nucleoporin-107 gene causes XX gonadal dysgenesis / A. Weinberg-Shukron, P. Renbaum, R. Kalifa [et al.] // *J. Clinical Invest.* -2015. – Vol.125. – P. 4295–4304.
13. A novel EIF4ENIF1 mutation associated with a diminished ovarian reserve and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing / M. Zhao, F. Feng, C. Chu [ et al.] // *J. Ovarian Res.* -2019. – Vol.12. – P.119.
14. A novel heterozygous splice-altering mutation in HFM1 may be a cause of premature ovarian insufficiency / J. Zhe, S. Chen, X. Chen [ et al.] // *J. Ovarian Res.* 2019. – Vol. 12. – P.61.
15. A novel POF1B variant in a Chinese patient is associated with premature ovarian failure / ZZ. Yuan, CY. Wang, JY. Jin [ et al.] // *Clinical Genetic.* – 2021. - Vol.100, N 6. – P.773-774.
16. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activating / EE. Telfer, M. McLaughlin, C. Ding [ et al.] // *Human Reproduction.* – 2008. – Vol.23, N 5. – P. 1151-1158.

17. Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. FASEB/ Y. Cheng, Y. Feng, L. Jansson [ et al.] // AJ. Journal. – 2015. – Vol.29, N 6. – P.2423-2430.
18. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs / J. Li, K. Kawamura, Y. Cheng [ et al.] // AJ Proc Natl Acad Sci U S A. - 2010 Jun 1;107(22):10280-4. doi: 10.1073/pnas.1001198107. Epub 2010 May 17.
19. Allshouse, A. A. Evidence for prolonged and unique amenorrhea-related symptoms in women with premature ovarian failure/primary ovarian insufficiency / A. A. Allshouse, A. L. Semple, N. F. Santoro // Menopause. – 2015. -N 22. – P. 166–174.
20. Altered T lymphocyte subtypes and cytokine profiles in follicular fluid associated with diminished ovary reserve / N. Zhao, C. Zhang, J. Ding [ et al.] // Am J Reproduction Immunology. – 2022. – Vol.87, N 4. -: e13522.
21. AMH mutations with reduced in vitro bioactivity are related to premature ovarian insufficiency / B. Alvaro Mercadal, R. Imbert, I. Demeestere [et al.] // Human Reproduction. -2015. – Vol. 30. – P. 1196–1202.
22. An initial low response predicts poor outcome in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection despite improved ovarian response in consecutive cycles / Z. Veleva [ et al.] // Fertility Sterility. – 2005. – Vol. 83. – P. 1384– 1390.ol
23. An association among blepharophimosis, resistant ovary syndrome, and true premature menopause / IS. Fraser, RP. Shearman, A. Smith [ et al.] // Fertility Sterility. -1988. – Vol. 50. – P.747– 751.
24. An externally validated age-related model of mean follicle density in the cortex of the human ovary / M. McLaughlin [et al.] // J Assist Reproduction Genet. – 2015. DOI 10.1007/s10815-015-0501-7
25. Antral Follicle Diameter Variance Within Each Ovary May Be A Predictor For Poor Response In Cases With Normal Ovarian Reserve / I. Sanverdi, E. Ozkaya, SK. [ et al.] //Exp Clin Endocrinology Diabetes. – 2018. - Vol.126, N 8. – P. 521-527.

26. Arafah, B. M. Hypothalamic pituitary adrenal function during critical illness: limitations of current assessment methods / B. M. Arafah // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. - 2006. - Vol. 91, № 10. - P. 3725-3745
27. Association of plant-based diet and early onset of natural menopause/ G. Grisotto, CR. Langton, Y. Li [ et al.] // *Menopause*. – 2022. – Jul. 1;29, N 7. – P. 861-867
28. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction / AK. Sullivan, M. Marcus, MP. Epstein, EG. Allen [et al.] // *Human Reproduction*. -2005. – Vol.20. – P. 402– 412.
29. Association between thyroid autoimmunity and the decline of ovarian reserve in euthyroid women / Li Z, Xu S, Luo W. [ et al.] // *Reproduction Biomed Online*. – 2022. - May 30: S1472-6483(22)00356-X.
30. Associations of age at menarche and age at menopause with diabetes among postmenopausal women in Chongqing, China / Y. Yuan, X. Bu, M. Xiao [ et al.] // *J Obstetrics Gynecology Res*. – 2022. – Vol. 48, N 7. – P.1945-1954.
31. Association between premature ovarian insufficiency and gut microbiota / J. Wu, Y. Zhuo, Y. Liu [et al.] // *BMC Pregnancy Childbirth*. – 2021. –Vol. 21. – P. 418
32. Association study of anti-Mullerian hormone and anti-Mullerian hormone type II receptor polymorphisms with idiopathic primary ovarian insufficiency / S. H. Yoon, Y. M. Choi, M. A. Hong [et al.] // *Human Reproduction*. – 2013. – Vol. 28. – P. 3301–3305.
33. Attempted application of bioengineered/biosynthetic supporting matrices with phosphatidylinositol-trisphosphate-enhancing substances to organ culture of human primordial follicles / G. Lerer-Serfaty, N. Samara, B. Fisch [ et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2013. – Vol. 30, N 10. – P.1279-1288.
34. Autoimmune primary ovarian insufficiency / C. A. Silva, L. Y. Yamakami, N. F. Aikawa [ et al.] // *Autoimmun Rev*. -2014. – Vol.13. – P. 427–430. Baber RJ, Panay N, Fenton A; IMS Writing Group. 2016 IMS Recommendations on

women's midlife health and menopause hormone therapy. *Climacteric*. 2016;19(2):109-150.

35. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46, XX spontaneous premature ovarian failure / V. K. Bakalov, J. N. Anasti, K. A. Calis [et al.] // *Fertility Sterility*. -2005.- Vol. 84.- P. 958–965.

36. Autotransplantation of fragmented ovarian cortical tissue: a laparoscopic demonstration / S. A. Lunding, S. F. Pors, S. G. Kristensen [ et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2018. – Vol. 110. – P. 1181-1183.

37. Autoantibodies to steroidogenic enzymes in patients with premature ovarian failure with and without Addison's disease / C. D. Pra, S. Chen, J. Furmaniak [ et al.] // *Eur. J. Endocrinology*. – 2003. – Vol. 148. – P. 565–570.

38. Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders / S Herraiz MR, A Buigues, S Martinez [ et al.] // *Fertility Sterility*. -2018. – Vol.110, N 3. – P.496-505.

39. Badawy, A. Induction of ovulation in idiopathic premature ovarian failure: a randomized double-blind trial / A. Badawy, H. Goda, A. Ragab // *Reproduction Bio Medicine Online*. -2007. –Vol. 15. – P.215– 219.

40. Bacanakgil, BH. Effects of vitamin D supplementation on ovarian reserve markers in infertile women with diminished ovarian reserve / BH. Bacanakgil, G. İlhan, K. Ohanoğlu // *Medicine (Baltimore)*. – 2022. - Feb 11;101(6): e28796.

41. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency reduce expression, activity, or synergy with GDF9 / L. C. Patiño, K. L. Walton, Y. D. Muelle [et al.] // *J. Clinical Endocrinology Metabolism*. -2017b. – Vol. 102. – P. 1009–1019.

42. Circadian rhythm of Cortisol is altered in postsurgical patients / T. K. Mcintosh, D. A. Lothrop, A. Lee et al. // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. -1981.-Vol. 53, № 1.-P. 117-122.; Hormonal responses to graded surgical stress / B. Chernow, H. R. Alexander, R. C. Smallridge et al. // *Archives of Internal Medicine*. - 1987. - Vol. 147, № 7. - P. 1273-1278

43. Circulating auto-antibodies against the zona pellucida and thyroid microsomal antigen in women with premature ovarian failure / RL. Kelkar, PK. Meherji, SS. Kadam [ et al] // J Reproduction Immunology. – 2005. – Vol.66. – P.53– 67.
44. Chon, SJ. Umair Z and Yoon M-S (2021) Premature Ovarian Insufficiency: Past, Present, and Future. Front. Cell Dev. Biol. 9:672890. doi: 10.3389/fcell.2021.672890
45. Chapman, C., Cree, L., and Shelling, A. N. (2015). The genetics of premature ovarian failure: current perspectives. Int. J. Womens Health 7, 799–810. doi: 10.2147/IJWH.S64024;
46. Characterization of idiopathic premature ovarian failure/ GS. Conway, G. Kaltsas, A. Patel [ et al.] // Fertility Sterility. -1996. – Vol. 65. – P. 337– 341
47. Color Doppler analysis of ovarian and uterine arteries in women with hypoestrogenic amenorrhoea / P. Pellizzari, C. Esposito [et al.] / Human Reproduction. - 2002. -Vol. 17. -N12. -P. 3208 – 3212.
48. Comparison of automated and manual follicle monitoring in an unrestricted population of 100 women undergoing controlled ovarian stimulation for IVF/ B. Ata, A. Seyhan, SL. Reinblatt [et al.] // Human Reproduction. -. 2011. – Vol.26. – P. 127 –133.
49. Conception rates following assisted reproduction in poor responder patients: a retrospective study in 300 consecutive cycles / U. Ulug [ et al.] // Reproduction Biomed. Online. – 2003. – Vol. 6. – P. 439-443.
50. CSB-PGBD3 mutations cause premature ovarian failure/ Y. Qin, T. Guo, G. Li [ et al.] // PLoS Genet. -2015a. - N 11. -: e1005419.
51. Cox, L. Primary ovarian insufficiency: an update / L. Cox, J. H. Liu // Int. J. Womens Health. – 2014. - N 6. – P. 235–243.
52. Decreased effector regulatory T cells and increased activated CD4+ T cells in premature ovarian insufficiency / M. Kobayashi, A. Nakashima, O. Yoshino [ et al.] // Am. J. Reproduction Immunology. – 2019. – Vol. 81. - e13125.

53. Deletion of tuberous sclerosis 1 in somatic cells of the murine reproductive tract causes female infertility / Y. Tanaka, JH. Park, PS. Tanwar [ et al.] // *Endocrinology*. – 2012. – Vol.153, N 1. – P.404-416.
54. Determination of Follicular Localization in Human Ovarian Cortex for Vitrification / T. Haino, W. Tarumi, K. Kawamura [ et al.] // *J Adolesc Young Adult Oncology*. – 2018. - Vol.7, N 1. – P. 46-53.
55. Developmental programming: gestational bisphenol- a treatment alters trajectory of fetal ovarian gene expression / A. Veiga-Lopez, L. J. Luense, L. K. Christenson [ et al.] // *Endocrinology*. – 2013. – Vol. 154. – P. 1873–1884.
56. D.J. Hendriks [ et al.] // *J. Reproduction Biomed. Online*. – 2008. – Vol. 17. – P. 727-736., Prediction and Diagnosis of Poor Ovarian Response: The Dilemma. / A. Badawy [ et al.] // *J. Reproduction Infertility*. – 2011. – Vol. 12, N 4. – P. 241-248.
57. di Pasquale, E. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene / E. di Pasquale, P. Beck-Peccoz, L. Persani // *Am. J. Human Genetic*. -2004. – Vol. 75. – P. 106–111.
58. Differential transcriptional profiles of human cumulus granulosa cells in patients with diminished ovarian reserve. / L. Liu, B. Cai, X. Zhang [ et al.] // *Arch Gynecology Obstetrics*. – 2022. - Vol.305, N 6. – P.1605-1614.
59. Distribution and characterization of immunoreactive corticostatin in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis / T. Tominaga, J. Fukata, Y. Hayashi et al. // *Endocrinology*. -1992.-Vol. 130, №3.-P. 1593-1598.
60. Dixit, H. Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian women with ovarian failure /H. Dixit, M. Deendayal, L. Singh // *Human Reproduction*. – 2004. - N 19. – P. 1760–1764.
61. Drug-free In vitro Activation for Primary Ovarian Insufficiency / NH. Patel, HK. Bhadarka, NH. Patel [ et al.] // *J Human Reproduction Sci*. – 2021. - Vol.14, N 4. – P. 443-445.

62. Drug-free in-vitro activation of follicles for infertility treatment in poor ovarian response patients with decreased ovarian reserve Kazuhiro Kawamura, Bunpei Ishizuka, Aaron J.W. Hsueh *RBM Online Journal* 2020: 40(2): 245-253
63. Dysregulated cytokine profile associated with biochemical premature ovarian insufficiency // *Am J Reproduction Immunology*. – 2020. – N 84: e13292.
64. Ebrahimi, M. The role of autoimmunity in premature ovarian failure / M. Ebrahimi, F. Akbari Asbagh // *Iran. J. Reproduction Medicine*. -2015. –Vol. 13. – P. 461–472.
65. Elgar, G. Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes / G. Elgar, T. Vavouri, // *Trends Genet*. -2008. –Vol. 24. –P. 344–352.
66. Endometriosis in women undergoing ovarian tissue transplantation due to premature menopause after gonadotoxic treatment or spontaneous premature ovarian failure/ L. Lotz, A. Dietl, I. Hoffmann [ et al.] // *Acta Obstetrics Gynecology Scand*. – 2022. – Vol.101, N 7. – P.771-778.
67. Effects of pretreatment with estrogens on ovarian stimulation with gonadotropins in women with premature ovarian failure: a randomized, placebo-controlled trial / M. Tartagni, E. Cicinelli, G. De Pergol [ et al.] // *Fertility Sterility*. – 2007. – Vol.87, N 4. – P. 858 -861.
68. Epistasis between CYP19A1 and ESR1 polymorphisms is associated with premature ovarian failure / S. Kim, L. A. Pyun, H. Kang [ et al.] // *Fertility Sterility*. -2011. – Vol. 95. – p. 353–356.
69. Evaluation of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and FOXP3 mRNA in premature ovarian insufficiency / J. Xiong, R. Tan, W. Wang [ et al.] // *J. Climacteric*. – 2020. - N 23. – P. 267–272.
70. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure / N. Massin, G. Méduri, A. Bachelot [et al.] // *Mol Cell Endocrinol*. – 2008. Jan 30;282(1-2). – P.95-100.
71. Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency / L. de Vries, D. M. Behar, P. Smirin-

Yosef // J. Clinical Endocrinology Metabolism. -2014. – Vol. 99. - E2129–E2132.

72. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability / S. AlAsiri, S. Basit, M. A. Wood-Trageser [et al.]// Clinical Invest. -2015. – Vol. 125. – P. 258–262.

73. Exosomal miRNA- 320a is released from hAMSCs and regulates SIRT4 to prevent reactive oxygen species generation in POI / C. Ding, C. Qian, S. Hou [et al.] // Mol. Ther. Nucleic Acids. – 2020A.- Vol. 21. – P. 37–50.

74. Exosomal miRNA-17-5p derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improves ovarian function in premature ovarian insufficiency by regulating SIRT7/ C. Ding, L. Zhu, H. Shen [ et al.] // Stem Cells. – 2020b. –Vol. 38. – P. 1137–1148.

75. Fabregues et al. Pregnancy after drug-free in vitro activation of follicles and fresh tissue autotransplantation in primary ovarian insufficiency patient: a case report and literature review // Journal of Ovarian Research. -2018. - N11. – P.76.

76. Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? / YM. van Kasteren, RD. Hundscheid, AP. Smits [ et al.] // Human Reproduction. -1999. –Vol.14. – P.2455– 2459.

77. Fenton, A. Premature ovarian insufficiency: pathogenesis and management. // J. Midlife Health. – 2015. – Vol. 6. – P. 147–153.

78. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study— preliminary data / D. J. Allingham-Hawkins, R. Babul-Hirji, D. Chitayat [et al.] // Am J Med Genet. -1999. –Vol. 83. – P.322– 325.

79. Follicle Activation in Patients With Poor Ovarian Response Through Fragmentation of the Ovarian Tissue. Cesar Diaz-Garcia, Pellicer Antonio et al. 2016

80. FOXL2 mutations lead to different ovarian phenotypes in BPES patients: Case Report / G. Meduri, A. Bachelot, C. Duflos [et al.] // Human Reproduction. – 2010. – Vol. 25. – P.235– 243.
81. From a circle to a sphere: the ultrasound imaging of ovarian follicle with 2D and 3D technology / Re Claudia, Mario Mignini Renzini, Amelia Rodriguez [et al.] // Gynecological Endocrinology. – 2018. DOI: 10.1080/09513590.2018.1522297
82. Fuhrich DG. Comparison of HSCORE assessment of endometrial beta3 integrin subunit expression with digital HSCORE using computerized image analysis (ImageJ) / DG. Fuhrich, BA. Lessey, RF. Savaris // Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology. – 2013. – Vol.35, N 4. – P. 210 – 216.
83. Genetic polymorphisms influence the ovarian response to rFSH stimulation in patients undergoing in vitro fertilization programs with ICSI / R. Boudjenah [ et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7 (6). – P. e38700
84. Gonadotropin suppression for the treatment of karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure: a controlled trial / L. M. Nelson, LM. Kimzey, BJ. White [ et al.] //Fertility Sterility. -1992. – Vol.57. – P.50– 55.
85. G.S. Conway и соавт УЗИ при ПНЯ
86. Gougeon, A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results / A. Gougeon // Human Reproduction. -1986. – Vol.1. – P.81– 87.
87. Grosbois, J. Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during in vitro human follicle activation / J. Grosbois, I. Demeestere // Human Reproduction. – 2018. – Vol. 33, N 9. – P. 1705-1714.
88. Guzel, Y. Sphingosine-1-phosphate protects human ovarian follicles from apoptosis in vitro / Y. Guzel, G. Bildik, O. Oktem // European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology. – 2018. – Vol. 222. – P.19-24.
89. Hoek, A.Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity / A. Hoek, J. Schoemaker, H. A. Drexhage // Endocrine Rev. -1997. – Vol. 18. – P. 107–134.

90. Hoek, A. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity / A. Hoek, J. Schoemaker, HA. Drexhage // *Endocrine Rev.* -1997. – Vol.18. – P.107–134.
91. Hotta, M. Differential effects of transforming growth factor type beta on the growth and function of adrenocortical cells in vitro / M. Hotta, A. Baird // *PNAS.* -1986. - Vol. 83, № 20. - P. 7795-7799.; Suppression of ACTH-induced steroidogenesis by supernatants from LPS-treated peritoneal exudate macrophages / J. C. Mathison, R. D. Schreiber, A. C. La Forest et al. // *Journal of Immunology.* - 1983.-Vol. 130.-P. 2757-2762
92. How the FMR1 gene became relevant to female fertility and reproductive medicine / N. Gleicher, VA. Kushnir, A. Weghofer [ et al.] // *Front Genet.* – 2014. – Vol.29, N 5. – P.284.
93. Hsueh, AJW. Hippo signaling disruption and ovarian follicle activation in infertile patients/ AJW. Hsueh, K. Kawamura // *Fertility Sterility.* – 2020. - Vol.114, N 3.- P. 458-464.
94. Huang, W. Effects of FSHR polymorphisms on premature ovarian insufficiency in human beings: a meta-analysis / W. Huang, Y. Cao, L. Shi // *Reproduction Biology Endocrinology.* -2019. - N 17. – P.80.
95. HucMSC-derived exosomes mitigate the age-related retardation of fertility in female mice / J. Zhang, B. Xu, Y. He [ et al.] // *Mol. Ther.* -2020. – Vol.28. – P. 1200–1213.
96. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation / O. Hovatta, C. Wright, T. Krausz [ et al.] // *Human Reproduction.* – 1999. –Vol. 14, N 10. – P.2519-2524.
97. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment / K. Kawamura, Y. Cheng, N. Suzuki [ et al.] // *AJ Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. - Oct 22;110(43):17474- 17479.
98. Hysteroscopy for treating subfertility associated with suspected major uterine cavity abnormalities / J. Bosteels, S. van Wessel, S. Weyers [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2018. – Vol.12, N 12. -CD009461. Published 2018 Dec 5. doi:10.1002/14651858. CD009461.pub4

99. Jankowska, K. Premature ovarian failure // *Prz Menopauzalny*. – 2017. - Vol.16, N 2. – P. 51-56.
100. Impact of abnormal karyotype on reproductive outcome in premature ovarian insufficiency / L. Grin, B. Ishizuka, A. Onimaru [ et al.] // *Reproduction Medicine Biol.* – 2022. - Jun 15;21(1): e12471.
101. In Vitro Activation of Follicles and Fresh Tissue Auto-transplantation in Primary Ovarian Insufficiency Patients / Jun Zhai, Guidong Yao, Fangli Dong [ et al.] // *J Clinical Endocrinology Metab.* – 2016. - Nov; 101(11): P. 4405–4412.
102. In vitro activation of ovary / Nalini Mahajan, Jasneet Kaur, Bithika Bhattacharya [ et al.] // *The Onco Fertility Journal*. – 2019. - N 2. – P.35.
103. Insights into the autoimmune aspect of premature ovarian insufficiency / K. Sharif, A. Watad, C. Bridgwood [ et al.] // *Best Pr. Res. Clinical Endocrinology Metabolism*. – 2019. – Vol. 33. – P. 101323.
104. Inheritance in idiopathic premature ovarian failure: analysis of 71 cases / W. Vegetti, M. Grazia Tibiletti, G. Testa [et al.] // *Human Reproduction*. – 1998. – Vol.13. – P.1796–1800.
105. Intracycle variation in number of antral follicles stratified by size and in endocrine markers of ovarian reserve in women with normal ovulatory menstrual cycles / S. Deb, B. K. Campbell, J. S. Clewes [ et al.] // *Ultrasound Obstetrics Gynecology*. – 2013. – Vo. 41. – P. 216–222
106. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis / Aaron J. W. Hsueh, Kazuhiro Kawamura, Yuan Cheng, Bart C. J. M. Fauser // *Endocrine Reviews*. – 2015. – Vol.36, Issue 1, 2. –P. 1–24,
107. Intraovarian Injection of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone for Luteal-Phase Ovarian Stimulation during Oocyte Retrieval Is Effective in Women with Impending Ovarian Failure and Diminished Ovarian Reserve / CC. Hsu, I. Hsu, LH. Lee [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. - Jun 3;10(6):1312.

108. Is premature ovarian insufficiency associated with mortality? A three-decade follow-up cohort / JE. Blümel, E. Mezones-Holguín, P. Chedraui [ et al.] // *Maturitas*. – 2022. – Vol. 13, N 163. – P.82-87.
109. Kawashima, Regulation of follicle growth through hormonal factors and mechanical cues mediated by Hippo signaling pathway // *Syst Biol Reprod Med*. – 2018. – Vol.64, N 1. – P. 3- 11.
110. Kirshenbaum, M. Premature ovarian insufficiency (POI) and autoimmunity-an update appraisal / M. Kirshenbaum, R. Orvieto // *J. Assist. Reprod. Genet.* -2019. – Vol. 36. – P. 2207–2215.
111. Kokcu, A. Premature ovarian failure from current perspective / A. Kokcu // *Gynecology Endocrinology*. -2010. -26:555–62.
112. Landscape of transcription in human cells / S. Djebali, C. A. Davis, A. Merkel [et al.] // *Nature*. – 2012. - Vol. 489. – P. 101–108.
113. Lass, A. Assessment of ovarian reserve: is there still a role for ovarian biopsy in the light of new data? / A. Lass // *Human Reproduction*. – 2004. – Vol. 19, N3. – P.467- 469.
114. Learning curves in 3-dimensional sonographic follicle monitoring during controlled ovarian stimulation / A. Rodriguez, JJ. Guillén, MJ. López [ et al.] // *Ultrasound Med*. – 2014. – Vol.33, N4. – P. 649 - 655.
115. Learning Curve of Surgeons Performing Laparoscopic Ovarian Tissue Transplantation in Women with Premature Ovarian Insufficiency: A Statistical Process Control Analysis / L. Meng, K. Kawamura, N. Yoshioka [ et al.] // *J Minim Invasive Gynecol*. – 2022. – Vol.29, N 4. – P.559-566.
116. Long noncoding RNA HCP5 participates in premature ovarian insufficiency by transcriptionally regulating MSH5 and DNA damage repair via YB1. / X. Wang, X. Zhang, Y. Dang [ et al.] // *Nucleic Acids Res*. -2020.- Vol. 48. – P. 4480–4491.
117. Long-term outcome of ovarian function in women with intermittent premature ovarian insufficiency / A. Bachelot, C. Nicolas, M. Bidet [et al.] // *Clinical Endocrinology (Oxf)*. -2017. – Vol. 86. – P.223– 228.

118. Maclaran, K. Premature ovarian failure / K. Maclaran, N. Panay, N. // J. Fam. Plann. Reprod. Health Care. - 2011.- N 37. – P. 35–42.
119. Majeed, A. Perifollicular vascularity in poor ovarian responders in In vitro fertilization cycles / A. Majeed, PS. Divyashree, KA. Rao // J Human Reproduction Sci. – 2018. - N11. – P. 242- 246.
120. Maturity-onset diabetes of the young type 3 and premature ovarian insufficiency: chance or causality: a case report and literature review / M. Alvarez, O. Rincon, A. Alvarado [et al.] // Endocrinology Diabetes Metab Case Rep. – 2022. - May 1;2022:21-0166.
121. MCM8 and MCM9 nucleotide variants in women with primary ovarian insufficiency / S. Desai, M. Wood-Trageser, J. Matic [et al.]// J. Clin. Endocrinol. Metab. -2017. – Vol. 102. – P. 576–582.
122. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability / M. A. Wood-Trageser, F. Gurbuz, S. Yatsenko [et al.] // Am. J. Hum. Genet. -2014. – Vol. 95. – P. 754–762.
123. Midhun Soman, MS et al. Menopause: The Journal of The North American Menopause Society Vol. 26, No. 1, pp. 78-93 DOI: 10.1097/GME.0000000000001161 Serum androgen profiles in women with premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis
124. MicroRNA transcriptome in the newborn mouse ovaries determined by massive parallel sequencing / H. W. Ahn, R. D. Morin, H. Zhao [et al.] // Molecylar Human Reproduction. -2010. – Vol. 16. – P. 463–471.
125. MiR-21 and Pellino-1 expression profiling in autoimmune premature ovarian insufficiency / X. Li, J. Xie, Q. Wang [ et al.] // J. Immunol. Res. – 2020. – P. 3582648
126. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure / K. Aittomäki, L. D. Lucena, P. Pakarinen [et al.] // Cell. – 1995. – Vol. 82. – P. 959–968.

127. Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure / W. J. Watkins, A. J. Umbers, K. J. Woad [et al.] // *Fertility Sterility*. -2006. – Vol. 86. – P. 1518–1521.
128. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency / D. Lourenço, R. Brauner, L. Lin [et al.] // *N. Engl. J. Med.* -2009. – Vol. 360. – P. 1200–1210.
129. Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency/ T. Guo, S. Zhao, S. Zhao [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* -2017. - N 26. – P. 1452–1457. doi: 10.1093/hmg/ddx044;
130. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure/ K. Aittomki, JL. Lucena, P. Pakarinen [et al.] // *Cell*. -1995. –Vol. 82. – P.959– 968.
131. National Institute for Health and Care Excellence. Fertility problems: assessment and treatment. London: NICE; 2013 pp. 19–20
132. Neves, AR. Androgens and diminished ovarian reserve: the long road from basic science to clinical implementation. A comprehensive and systematic review with meta-analysis / AR. Neves, P. Montoya-Botero, NP. Polyzos // *Am J Obstetrics Gynecology*. – 2022. - Mar 29: S0002-9378(22)00248-4.
133. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression / A. Rajkovic, S. A. Pangas, D. Ballow [ et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 305. – P. 1157–1159.
134. Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency / A. Heddar, P. Dessen, D. Flatters [ et al.] // *Mol. Genet. Genomics*. – 2019. – Vol. 294. – P. 1527–1534.
135. Number of CGG repeats in the FMR1 gene of Japanese patients with primary ovarian insufficiency/ B. Ishizuka, N. Okamoto, N. Hamada [et al.] // *Fertility Sterility*. -2011. – Vol.96. – P.1170– 1174.
136. Nygren, K. G. Assisted reproductive technology in Europe, 1999. Results generated from European registers by ESHRE / K. G. Nygren, A. N. Andersen, L. Gianaroli // *Human Reproduction*. – 2002. – Vol. 17 (12). – P. 3260–3274.

137. Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study / CE. Schwartz, J. Dean, PN. Howard-Peebles [et al.] // *A m. J Med Genet.* -1994. – Vol. 51. – P.400– 402.
138. Occult ovarian failure: a syndrome of infertility, regular menses, and elevated follicle-stimulating hormone concentrations /IT. Cameron, FC. O’Shea, JM. Rolland [et al.] // *J Clinical Endocrinology Metab.* – 1988. – Vol. 6, N 67. – P. 1190 – 1194.
139. Oocyte-specific deletion of PTEN causes premature activation of the primordial follicle pool / P. Reddy, L. Liu, D. Adhikari [ et al.] // *Science.* – 2008. – Vol.319(5863). – P. 611-613.
140. On behalf of the ESHRE working group ESHRE consensus on the definition of ‘poor response’ to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria / A. P. Ferraretti [ et al.] // *Hum. Reproduction.* – 2011. – Vol. 26, N 7. – P. 1616-1624.
141. On behalf of the ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition, ESHRE consensus on the definition of ‘poor response’ to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria / A.P. Ferraretti, A. La Marca, B.C.J.M. Fauser [ et al.] // *Human Reproduction.* – 2011. – Vol.26, Issue 7. – P. 1616–1624.
142. Occult Form of Premature Ovarian Insufficiency in Women with Infertility and Oligomenorrhea as Assessed by Poor Ovarian Response Criteria Rubina Izhar, Samia Husain, Suhaima Tahir, Sonia Husain // *J Reproduction Infertility.* – 2017. – Vol.18, N 4. – P.361-367.
143. Oostra, B. A. FMR1: a gene with three faces/ B. A. Oostra, R. Willemsen // *Biochimie Biophys. Acta.* – 2009. -N 1790. – P. 467–477.
144. Ovarian failure and autoimmunity. Detection of autoantibodies directed against both the unoccupied luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor and the hormone-receptor complex of bovine corpus luteum / H. Moncayo, R. Moncayo, R. Benz [ et al.] // *J Clinical Invest.* -1989. – Vol.84. – P.1857– 1865.

145. Ovarian autoimmune disease: clinical concepts and animal models. / B. D. Warren, W. K. Kinsey, L. K. McGinnis [et al.] // Cell. Mol. Immunology -2014. - N 11. – P. 510–521.
146. Ovarian Follicular Growth through Intermittent Vaginal Gonadotropin Administration in Diminished Ovarian Reserve Women / CC. Hsu, I. Hsu, LH. Lee [ et al.] // Pharmaceuticals. – 2022. - Apr 15;14, N 4. – P. 869.
147. Pan, D. Hippo signaling in organ size control // D. Pan D. // Genes and Development. – 2007.- Vol.21, N 8. – P. 886-897.
148. Panay, N. Management of premature ovarian failure. Best Practice and Research / N. Panay, T. Kalu // Clinical Obstetrics and Gynecology. -2009. – Vol.23, N 1. – P.129-140.
149. Perrault syndrome is caused by recessive mutations in CLPP, encoding a mitochondrial ATP-dependent chambered protease / EM. Jenkinson, AU. Rehman, T. Walsh [ et al.] // Am J Hum Genet c. – 2013. – Vol. 92. – P.605–613.
150. Polycystic ovaries and adrenal insufficiency in a young pubescent female with lipoid congenital adrenal hyperplasia due to splice mutation of the StAR gene: a case report and review of the literature / C. T. Jehaimi, V. C. Araiza, S. D. Batish [ et al.] // Pediatrics Endocrinology Metabolism. -2010. –Vol. 23. – P. 1225–1231.
151. Poor responders to controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization (IVF) / L. Kamble [ et al.] // Human Fertility (Camb). – 2011. – Vol. 14, N 4. – P. 230-245.
152. Positive cross talk between FOXL2 and antimullerian hormone regulates ovarian reserve / M. Park, D. S. Suh, K. Lee [ et al.] // Fertility Sterility. – 2014. - Vol.102. – P. 847–855.
153. Prediction of in vitro fertilization outcome at different antral follicle count thresh-olds in a prospective cohort of 1,012 women / K. Jayaprakasan, Y. Chan, R. Islam, R. [ et al.] // Fertility Sterility. -2012. - – Vol. 98. – P. 657–663.
154. Pregnancy after azathioprine therapy for ulcerative colitis in a woman with autoimmune premature ovarian failure and Addison’s disease: HLA haplotype

characterization / F. Ferrau, S. Gangemi, G. Vita [ et al.] // *Fertility Sterility*. - 2011. – Vol. 95:2430 e2415–2437.

155. Pregnancy following diagnosis of premature ovarian insufficiency: a systematic review / E. Fraison, G. Crawford, G. Casper [ et al.] // *Reproduction Biomed. Online*. – 2019. - N 39. – P. 467–476.

156. Pregnancy outcome is not affected by antiphospholipid antibody status in women referred for in vitro fertilization / I. T. Chilcott [ et al.] // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 73 (3). – P. 526-530

157. Premature menopause and autoimmune primary ovarian insufficiency in two international multi-center cohorts / EC. Vogt, FG. Real, ES. Husebye [et al.] // *Endocr Connect*. – 2022. - May 25;11(5): e220024.

158. Premature ovarian failure: morphological and ultrastructural aspects. / M. A. Haidar, E. C. Baracat, M. J. Simoes [ et al.] // *Sao Paulo Med. J.* – 1994. – Vol.112. – P. 534–538.

159. Premature ovarian failure of autoimmune etiology in 46XX patients: is there a hope? / A. S. Dawood, M. A. El-Sharawy, D. W. Nada, M. El-Sheikh // *J. Complement. Integr. Med.* -2018. -N 15.

160. Premature ovarian insufficiency – aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation / E. Rudnicka, J. Kruszewska, K. Klicka [et al.] // *Prz Menopauzalny*. – 2018. – N 17. – P. 105–108.

161. Premature ovarian insufficiency: phenotypic characterization within different etiologies / X. Jiao, H. Zhang, H. Ke [et al.] // *J. Clinical Endocrinology Metabolism*. – 2017. – Vol.102. – P. 2281–2290.

162. Prevention of Premature Ovulation by Administration of Gonadotropin Releasing Hormone Antagonist the day After Ovulation Triggering in Diminished Ovarian Reserve Patients / BA. Sik, O. Ozolcay, YA. Aba [ et al.] // *Rev Bras Gynecology Obstetrics*. – 2022. – Vol.44, N 3. – P. 245-250.

163. Primary Ovarian Insufficiency: Current Concepts / G. Collins, B. Patel, S. Thakore [ et al.] // *J. South. Med. J.* – 2017. – Vol. 110. – P. 147–153.

164. Protective effects of puerarin on premature ovarian failure via regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and oxidative stress / C. Chen, S. Li, C. Hu [et al.] // *Reprod. Sci.* -2020. – Vol. 28. – P. 982–990.
165. Reproductive and menstrual history of females with fragile X expansions / A. Murray, S. Ennis, F. MacSwiney, J. Webb [ et al.] // *Eur J Hum Genet.* – 2000. - N 8. – P.247–252.
166. Resumption of ovarian function and pregnancies in 358 patients with premature ovarian failure / M. Bidet, A. Bachelot, E. Bissauge [et al.] *J Clinical Endocrinology Metab.* -2011. – Vol. 96. – P.3864–3872.
167. Resumption of Ovarian Function After Ovarian Biopsy/Scratch in Patients With Premature Ovarian Insufficiency /X. Zhang, T. Han, L. Yan Chen ZJ // *Reproduction Sci.* – 2019. –Vol.26, N 2. – P.207-213.
168. Rose, B.I. An explanation of the mechanisms underlying fragile X-associated premature ovarian insufficiency / B. I. Rose, S. E. Brown // *J Assist Reproduction Genet.* – 2020. –Vol. 37. – P. 1313–1322.
169. Ryan, MM. Myasthenia gravis and premature ovarian failure / MM. Ryan, Jones HRJr // *Muscle Nerve.* -2004. – Vol. 30. – P.231– 233.
170. Sequence variation at the human FOXO3 locus: a study of premature ovarian failure and primary amenorrhea / T. D. Gallardo, G. B. John, K. Bradshaw [et al.] // *Human Reproduction.* – 2008. - Vol. 23. – P. 216–221.
171. Serum anti-mullerian hormone expression in women with premature ovarian failure / G. Meduri, N. Massin, J. Guibourdenche [et al.] // *Human Reproduction.* -2007. – Vol. 22. – P. 117–123.
172. Similar phenotype characteristics comparing familial and sporadic premature ovarian failure / F. Janse, EA. Knauff, MF. Niermeijer [ et al.] // *Menopause.* -2010. – Vo. 17. – P.758 – 765
173. Simpson, J. L. Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes / J. L. Simpson // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2008. – Vol.1135. – P. 146–154.

174. Sleep, depression, anxiety and fatigue in women with premature ovarian insufficiency/ S. Ates, S. Aydın, P. Ozcan, RZ. Bakar [ et al.] // J Psychosom Obstetrics Gynecology. – 2022. -N 8. – P.1-6.
175. Small extracellular vesicles derived from embryonic stem cells restore ovarian function of premature ovarian failure through PI3K/AKT signaling pathway / M. Liu, Y. Qiu, Z. Xue [ et al.] // Stem Cell Res. Ther. -2020. - 11:3.
176. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency / N. Suzuki, N. Yoshioka, S. Takae [ et al.] //Human Reproduction. – 2015. – Vol.30, N 3. – P. 608-615.
177. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development / J. C. da Silveira, G. M. Andrade, M. del Collado [et al.] // PLoS One. – 2017. - 12: e0179451.
178. Tanaka, Y. Surgical approaches of drug-free in vitro activation and laparoscopic ovarian incision to treat patients with ovarian infertility / Y. Tanaka, AJ. Hsueh, K. Kawamura // Fertility Sterility. – 2020. - Vol. 114, N 6. – P.1355-1357.
179. Tang, R., Yu, Q. The significance of FMR1 CGG repeats in Chinese women with premature ovarian insufficiency and diminished ovarian reserve / R. Tang, Q. Yu // Reproduction Biology Endocrinology. – 2020. – Vol.118, N 82.
180. Taylor, H. S., Pal, L., and Sell, E. Speroff 's Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. - 2019.
181. Tsc /mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles / D. Adhikari, W. Zheng, Y. Shen [ et al.] //Human Molecular Genetics. – 2010. – Vol.19, N 3. – P. 397-410
182. The, WT. What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? / WT. Teh, J. McBain, P. Rogers // J Assist Reproduction Genet. – 2016. – Vol.33, N 11. – P.1419-1430.

183. The identification of a (CGG) 6AGG insertion within the CGG repeat of the FMR1 gene in Asians/ SH. Chen, JM. Schoof, NF. Buroker [ et al.] // Human Genet. -1997. – Vol.99. – P.793– 795.
184. The influence of body mass index on in vitro fertilization outcome / R. Orvieto [ et al.] // Int. J. Gynecology Obstetrics. – 2009. – Vol. 104. – P. 53-55.
185. The effect of 12-month dehydroepiandrosterone supplementation on the menstrual pattern, ovarian reserve markers, and safety profile in women with premature ovarian insufficiency / Q.H.Y. Wong, T.W.Y. Yeung, S.S..F. Yun [et al.] // J Assist Reproduction Genet. – 2018. – Vol. 35. – P. 857–862.
186. The effect of medication on serum anti-müllerian hormone (AMH) levels in women of reproductive age: a meta-analysis / WW. Yin, CC. Huang, YR. Chen [ et al.] // BMC Endocr Disord. – 2022. - Jun 14;22(1):158.
187. The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome / R. Willemsen, M. Hoogeveen-Westerveld, S. Reis [et al.] // Hum Mol Genet. – 2003. - N 12. – P.949–959.
188. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in lepharophimosi/s/ptosis/ epicanthus inversus syndrome / L. Crisponi, M. Deiana, A. Loi [et al.] Nat Genet. -2001. – Vol. 27. – P.159 – 166.
189. The transaction domain AF-2 but not the DNA-binding domain of the estrogen receptor is required to inhibit differentiation of avian erythroid progenitors / M. von Lindern, L. Boer, O. Wessely [ et al.] // Mol Endocrinology. -1998. -Vol. 12. - P. 263-277.
190. The transcriptional landscape of the mammalian genome / P. Carninci, T. Kasukawa, S. Katayama [et al.] // Science. – 2005.- Vol. 309. – P.1559–1563.
191. The value of LH supplementation in young women with diminished ovarian reserve treated with GnRH Antagonist Protocol for ovarian hyperstimulation in ICSI-cycles / NN. Yenigul, R. Ozelçi, E. Baser [ et al.] // Gynecology Pol. – 2022. - Jan 24.

192. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure / H. Zhao, Z.-J. Chen, Y. Qin [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2008. - Vol.82. – P. 1342–1348.
193. Transcription factor SOHLH1 potentially associated with primary ovarian insufficiency / S. Zhao, G. Li, R. Dalglish [et al.] // *Fertility Sterility.* -2015. - Vol.103. – P. 548–553.e5.
194. Transcriptomic landscape of granulosa cells and peripheral blood mononuclear cells in women with PCOS compared to young poor responders and women with normal response / M. Cozzolino, S. Herraiz, S. Titus [ et al.] // *Human Reproduction.* – 2022. - May 30; Vol.37, N 6. – P.1274-1286.
195. Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin inducedcortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells / M. Jaattela, V. Ilvesmaki, R. Voutilainen [et al.] // *Endocrinology.* - 1991.-Vol. 128, № 1.-P. 623-629.
196. Turnbull, A. V. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action / A. V. Turnbull, C. L. Rivier // *Physiological Reviews.* - 1999. - Vol. 79, № 1. - P. 1-71
197. Two consecutive pregnancies in a patient with premature ovarian insufficiency in the course of classic galactosemia and a review of the literature / J. Kruszewska, H. Laudy-Wiaderny, S. Krzywdzinska [ et al.] // *Endocrinology.* – 2022. - Vol.38, N 2. – P.186-189.
198. van Kasteren, YM. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy / Y. M.van Kasteren, J. Schoemaker // *Human Reproduction Update.* -1999. – Vol.5. – P.483–492.
199. van Kasteren, YM. Ovulation induction in premature ovarian failure: a placebo-controlled randomized trial combining pituitary suppression with gonadotropin stimulation / YM. van Kasteren, A. Hoek, J. Schoemaker // *Fertility Sterility.* -1995. – Vol.64. – P. 273– 278.

200. Variation in antral follicle counts at different times in the menstrual cycle: does it matter? Dimitrios Mavrelou, Ali Al Chami, Vikram Talaulikar, Elizabeth Burt, Lisa Webber, George Ploubidis // *Ephia Yasmin Reproductive Bio Medicine Online*. -2016. – Vo. 33. – P. 174–179.
201. Varelas, X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease / X. Varelas // *Development*. – 2014. – Vol. 141, N 8. – P.1614-1626.
202. Welt, CK. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure // *Clinical Endocrinology*. – 2008. – Vol. 4, N 68. – P. 499–509.
203. Wesevich, V., Kellen, A. N., and Pal, L. (2020). Recent advances in understanding primary ovarian insufficiency. *F1000Res* 9::1101. doi: 10.12688/f1000research. 26423.1
204. XX ovarian dysgenesis is caused by a PSMC3IP/HOP2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription / D. Zangen, Y. Kaufman, S. Zeligson [ et al.] // *Am. J. Hum. Genet*. -2011. – Vol. 89.- P. 572–579.
205. Which Factors Are Associated With Reproductive Outcomes of DOR Patients in ART Cycles: An Eight-Year Retrospective Study/ L. Li, B. Sun, F. Wang [ et al.] // *Front Endocrinology (Lausanne)*. – 2022. - Jun 23; 13.-P.796199.
206. Wierman, ME. Should Dehydroepiandrosterone Be Administered to Women? / ME. Wierman, K. Kiseljak-Vassiliades // *J Clinical Endocrinology Metabolism*. – 2022. - May 17;107(6). – P.1679-1685.
207. Which is more predictive ovarian sensitivity marker if there is discordance between serum anti-Müllerian hormone levels and antral follicle count? A retrospective analysis / K. Aslan, I. Kasapoglu, C. Cakir [ et al.] // *J Obstetrics Gynecology*. – 2022. - N 7. – P. 1 - 6.
208. Whole-Ovary Laparoscopic Incisions Improve Hormonal Response and Fertility in Patients with Extremely Poor Ovarian Response / CL. Chang, TH. Chin, YC. Hsu YC [ et al.] // *J Minim Invasive Gynecology*. – 2022. – Vol. 29, N 7. – P. 905-914.

209. Yu, L. Qing X. Diagnosis of Idiopathic Premature Ovarian Failure by Color Doppler Ultrasound under the Intelligent Segmentation Algorithm / L. Yu, X. Qing // Comput Math Methods Med. – 2022. - May 25;2022: 2645607.