

**ГБОУ ВПО «КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. ПРОФ. В. Ф. ВОЙНО –  
ЯСЕНЕЦКОГО МИНЗДРАВСОЦРАЗВИТИЯ РФ  
КАФЕДРА АКУШЕРСТВА И ГИНЕКОЛОГИИ ИПО**

На правах рукописи

**ГЕРИЛОВИЧ ЛЮДМИЛА АЛЕКСАНДРОВНА**

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРЕДИКТОРОВ АНГИОГЕНЕЗА  
И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ  
ИСХОДОВ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ  
ТЕХНОЛОГИЙ**

14.01.01 - акушерство и гинекология

**ДИ С С Е Р Т А Ц И Я**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,  
профессор А.Т. Егорова

Научный консультант:

доктор медицинских наук,  
профессор А.Б. Салмина

## СОДЕРЖАНИЕ.

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	6
<b>ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИСХОД ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ</b>	11
1.1. Овариальный резерв и его роль в эффективности лечения различных форм бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий.	11
1.2. Современные схемы индукции суперовуляции в программах вспомогательных репродуктивных технологий.	14
1.3. Качество ооцитов и эмбрионов в индуцированных циклах	20
2. Молекулярные и физиологические аспекты эндотелиальной дисфункции	24
2.1. Современные представления о механизмах развития эндотелиальной дисфункции	25
2.2. Маркеры эндотелиальной дисфункции (молекулы повреждения и восстановления эндотелия)	26
3. Роль эндотелиальной дисфункции в программах вспомогательных репродуктивных технологий при различных формах бесплодия	30
3.1. Особенности ведения индуцированного цикла с учетом маркеров эндотелиальной дисфункции	34
<b>ГЛАВА II. ПРОГРАММА, КОНТИНГЕНТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.</b>	39
2.1. Материалы и программа исследования	39
2.2. Методы исследования	42
2.3. Клиническая характеристика обследованных женщин	47
<b>ГЛАВА III. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У ЖЕНЩИН С ТРУБНОЙ И МУЖСКОЙ ФОРМАМИ БЕСПЛОДИЯ.</b>	59
3.1. Значение выбора овариального резерва при прогнозировании исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий	59
3.2. Оценка качества ооцитов и эмбрионов при трубной и мужской формах бесплодия	64
3.3. Влияние ответа яичников на качество ооцитов и эмбрионов, возможность прогнозирования эффективности	71

программ вспомогательных репродуктивных технологий	
<b>ГЛАВА IV. ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ИНДУЦИРОВАННЫХ ЦИКЛАХ.</b>	75
4.1. Роль маркеров СЭФР и sPESAM-1 у пациенток с трубной и мужской формами бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий	75
4.1.1. Клиническое значение СЭФР в прогнозе имплантации эмбрионов у женщин с трубной и мужской формами бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий	76
4.1.2. Роль sPESAM-1 в контексте прогноза имплантации эмбрионов у женщин с трубной и мужской формами бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий	80
4.2. Влияние маркера эндотелиальной дисфункции эндотелина-1 у пациенток с трубной и мужской формами бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий	82
<b>ГЛАВА V. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.</b>	86
<b>ВЫВОДЫ.</b>	94
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.</b>	96
<b>УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ.</b>	99

## СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- аГн-РГ - агонисты Гн-РГ
- ант-РГ - антагонисты Гн-РГ
- БАВ – биологически активные вещества
- ВЗОМТ – воспалительные заболевания органов малого таза
- ВПР – врожденный порок развития
- ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии
- Гн-РГ - гонадотропин-рилизинг гормон
- ГЦ - гомоцистеин
- ИБ - индуцированная беременность
- ИКСИ - интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов
- КЦ - кломифена цитрат
- ЛГ - лютеинизирующий гормон
- МФ - мужской фактор бесплодия
- ОКК - ооцит-кумулюс-комплекс
- ПЭ - перенос эмбрионов
- рЛГ - рекомбинантный ЛГ
- рФСГ- рекомбинантный ФСГ
- СГЯ - синдром гиперстимулированных яичников
- СПЯ - синдром поликистозных яичников
- СПФ - синдром пустых фолликулов
- СЭФР - сосудисто-эндотелиальный фактор роста
- ТФ - трубная форма бесплодия
- ФЖ - фолликулярная жидкость
- ФСГ - фолликулостимулирующий гормон
- ХГЧ - хорионический гонадотропин человеческий
- ЧМГ - человеческие менопаузальные гонадотропины
- ЭД - эндотелиальная дисфункция
- ЭКО - экстракорпоральное оплодотворение

CD34 - Hematopoietic progenitor cell antigen, молекула межклеточной адгезии

EPC - (endothelial progenitor cells) эндovasкулярные прогениторные клетки

ICAM-1 - Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, молекула клеточной адгезии

NO - оксид азота

PECAM-1 - молекула тромбоцитарно-эндотелиоцитарной клеточной адгезии

sPECAM-1 – растворимая форма молекулы тромбоцитарно-эндотелиоцитарной клеточной адгезии

VCAM-1 - Vascular cell adhesion molecule 1, васкулярная молекула клеточной адгезии

VEGFR-2 - Vascular endothelial growth factor receptor 2, рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста.

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

В мире все большее распространение получает метод лечения бесплодия путем экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) преовуляторных ооцитов и переноса эмбрионов (ПЭ) на стадии дробления в полость матки. Использование метода экстракорпорального оплодотворения предоставляет возможность реализовать функцию деторождения при таких формах женского бесплодия, которые раньше считались абсолютно бесперспективными для лечения. Несмотря на совершенствование схем стимуляции яичников, внедрение современных гормональных препаратов и качественно новых сред для культивирования эмбрионов *in vitro*, эффективность лечения бесплодия в мире в расчете частоты наступления беременности на одну попытку с переносом эмбрионов составляет в среднем 25-30%, причем за последние годы этот показатель значительно не меняется. Частота невынашивания беременности после применения программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), по данным разных авторов, колеблется от 11 до 66%, что снижает общую эффективность лечения бесплодия [22, 60].

При проведении программ ВРТ стимуляция суперовуляции проводится с целью получения большого количества ооцитов, что достигается использованием различных гормональных препаратов. Нарушение фолликулярного и системного ангиогенеза в этих условиях способствует развитию дисфункции эндотелия. В настоящее время дисфункция процесса ангиогенеза может рассматриваться как один из ключевых патофизиологических факторов, ограничивающих имплантацию эмбрионов и способствующих развитию сосудистых осложнений во время беременности [37].

Сосудисто-эндотелиальный фактор роста (СЭФР) выступает как ключевой ангиогенный маркер и ему отводится значительная роль в регуляции фолликулярного ангиогенеза, кроме того, он способен

инициировать данный процесс и пролиферацию клеток фолликула. По мнению ряда авторов, СЭФР, оказывая эффект на сосудистую сеть органов репродуктивной системы может ограничивать фертильность в программах ВРТ и оказывать существенное влияние на гестационный процесс [11, 37, 135].

Актуальность работы заключается в поиске оптимальных маркеров прогноза имплантации при лечении различных форм бесплодия методами ВРТ, что может позволить снизить частоту потери беременностей в стимулированных лечебных циклах [2, 20, 28, 31, 32, 52].

Значимость работы определяется тем, что на основании обнаруженных связей между уровнем маркеров эндотелиальной дисфункции и частотой имплантации открываются новые подходы для разработки патогенетически обоснованной терапии, позволяющей повысить эффективность ЭКО и обеспечить благополучное течение ранних сроков беременности.

### **ЦЕЛЬ РАБОТЫ**

Определить клиническое значение маркеров ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции в прогнозировании исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий при трубной и мужской формах бесплодия.

### **ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

1. Выявить влияние различных схем индукции суперовуляции на качество ооцитов, эмбрионов и эффективность программ ВРТ у пациенток с трубной и мужской формами бесплодия.

2. Выявить значимость маркера ангиогенеза СЭФР в прогнозировании имплантации эмбрионов в программах ВРТ.

3. Установить влияние эндотелиальной дисфункции на имплантацию эмбрионов при трубной и мужской формах бесплодия.

4. Обосновать и внедрить рекомендации по коррекции эндотелиальной дисфункции в период проведения программ ВРТ для увеличения частоты имплантации эмбрионов.

### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА**

Приоритетными являются новые сведения о корреляционных взаимосвязях уровней СЭФР и sPECAM-1 в биологических жидкостях, полученных при проведении индукции суперовуляции в программах ВРТ при трубной форме бесплодия. Выявлено стимулирующее действие СЭФР на уровень циркуляции sPECAM-1, ограничивающее частоту имплантации эмбрионов в программах ВРТ при трубной форме бесплодия.

Показаны особенности ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции, возникающие при индукции суперовуляции при трубной и мужской формах бесплодия.

Доказано, что при трубной форме бесплодия содержание СЭФР в сыворотке крови от 456 до 688 пг/мл является фактором, ограничивающим имплантацию эмбрионов. При мужской форме бесплодия при уровне эндотелина-1 от 1,0 до 3,4 фмоль/мл прогноз имплантации неблагоприятный.

### **ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

Доказано, что значимыми прогностическими факторами имплантации эмбрионов в программах ВРТ при трубной и мужской формах бесплодия являются маркеры ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции СЭФР и эндотелин-1.

Впервые представлены нормативные показатели маркеров ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции СЭФР и эндотелина-1 при трубной и мужской формах бесплодия, позволяющие прогнозировать имплантацию в программах ВРТ.



Обоснованы и внедрены в практическую деятельность репродуктивных центров г. Красноярска рекомендации по проведению лечебных мероприятий с целью коррекции эндотелиальной дисфункции, позволяющие повысить эффективность программ ВРТ.

### **АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ, ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИКУ И ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА**

Данная работа проведена в рамках основного направления научной деятельности кафедры акушерства и гинекологии ИПО Красноярского государственного медицинского университета.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы акушерства и гинекологии» г. Красноярск 2013г; международной научно-практической конференции «От эмбриона к человеку» г. Новосибирск 2012 - 2013г.; на заседании кафедры акушерства и гинекологии ИПО 2013г.; на заседании проблемной комиссии «Педиатрия, акушерство и гинекология, детская хирургия, медицинская генетика» ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

Результаты исследования и разработанные на их основе рекомендации внедрены в практическую работу КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 4» (консультативно-диагностическое отделение), ООО «МЦГЭР «Три сердца» г. Красноярска, учебный процесс кафедры акушерства и гинекологии ИПО КрасГМУ в программах обучения врачей, интернов, ординаторов по специальности «акушерство и гинекология» (2014).

Участие автора в сборе первичного материала и его обработке – более 90%, обобщении, анализе и внедрении в практику результатов работы – 100%. Все научные результаты, представленные в работе, получены автором

лично. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 5 - в журналах, рекомендованных ВАК.

Апробация результатов исследования. Основные положения диссертации доложены на заседании проблемной комиссии «Педиатрия, акушерство и гинекология, детская хирургия, медицинская генетика» №1 (2014).

### **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ**

1. При трубной форме бесплодия проведение индукции суперовуляции по протоколу с использованием антагониста гонадотропин-рилизинг гормона позволило получить качественные ооциты и эмбрионы.

2. Предикторы ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции сосудистый эндотелиальный фактор роста (СЭФР) и эндотелин-1 являются значимыми факторами для прогнозирования исходов программ ВРТ при трубной и мужской формах бесплодия.

3. Проведение лечебных мероприятий по коррекции эндотелиальной дисфункции в индуцированных циклах позволило увеличить частоту наступления беременности при трубной и мужской формах бесплодия.

### **ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, пяти глав, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы. Работа изложена на 112 страницах машинописного текста, иллюстрирована 7 рисунками, 25 таблицами. Указатель литературы включает 140 источников, из них – 53 на русском и 87 – на иностранном языках.

## ГЛАВА I

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИСХОД ЭКО

Повышение эффективности методов ВРТ является актуальной задачей современной репродуктологии. В связи с этим усилия многих специалистов, занятых лечением бесплодия методами ВРТ, направлены на разработку мероприятий, способных повысить его эффективность. Это в свою очередь требует оценки влияния различных факторов как на исход каждого из этапов программ ЭКО, так и на его результат в целом. Одним из определяющих факторов эффективности ВРТ является овариальный резерв [8].

#### **1.1. Овариальный резерв и его роль в эффективности лечения различных форм бесплодия методами ВРТ**

Стимуляция суперовуляции является неотъемлемой частью программы ЭКО и ПЭ. Результатом ее является получение достаточного количества зрелых преовуляторных ооцитов, способных к оплодотворению *in vitro*. Основным фактором успешного исхода индукции овуляции является способность яичников отвечать на стимуляцию адекватным ростом нескольких фолликулов, что достигается использованием различных гормональных препаратов. Способность яичника к развитию здорового фолликула с полноценной яйцеклеткой и адекватным ответом на овариальную стимуляцию называется овариальным резервом [41, 46, 119]. Он отражает количество находящихся в яичнике фолликулов (примордиальный пул и растущие фолликулы) и зависит от физиологических и патологических факторов. Понятие овариального резерва следует отличать от фолликулярного запаса, который включает в себя число фолликулов и не отражает их функционального состояния. Большинство исследователей проводят оценку овариального резерва на основании значения уровней фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), эстрадиола, ингибина В, антимюллерова гормона. Ряд ученых считают, что определение базального

уровня ФСГ не является прогностически значимым для прогноза наступления беременности [11, 13, 23, 92, 96]. К предлагаемым методам оценки овариального резерва относят клинические данные, гормональные тесты с нагрузкой, ультразвуковые тесты. В исследовании Н.Н. Шаилова и Л.А. Марченко (2011г.), показана значимость прогнозирования функциональной активности яичников в зависимости от наличия гена fragile X mental retardation (FMR1), находящегося в гомо- или гетерозиготном состоянии. Таким образом, имея такое большое число диагностических тестов, характер ответа яичника на введение индуктора в большинстве случаев возможно предсказать [68].

Для прогнозирования ответа яичников на стимуляцию овуляции возможно выделить основные факторы.

Возраст женщины - важнейший физиологический фактор, определяющий овариальный резерв. С возрастом в яичнике женщины уменьшается число фолликулов и изменяется качество ооцитов. Однако, существуют значительные индивидуальные особенности во время наступления менархе (10-16 лет), времени наступления менопаузы (45-55 лет), которые могут определять индивидуальный биологический возраст женщины. Наличие менструальной функции и овуляции не в полной мере отражает репродуктивный потенциал женщины. Сегодня известно, что в возрасте от 40 до 45 лет женщина чаще теряет способность к зачатию, хотя у нее еще в пределах 10 лет может сохраняться менструальная функция и гормональная активность яичников. Исследования роли яичников и матки в развитии возрастного снижения фертильности показали ведущую роль в развитии последней яичникового фактора, и в первую очередь, за счет уменьшения овариального резерва. Тем не менее, представленные исследования свидетельствуют о недостаточной информативности хронологического возраста женщины как показателя репродуктивного потенциала яичников. Это диктует необходимость разработки тестов,

определяющих индивидуальный биологический возраст женщины [1, 6, 41, 77, 108].

Уровень ФСГ на 2-3-й день менструального цикла является достаточно точным признаком, оценивающим овариальный резерв. Уровень ФСГ в пределах 10-12 МЕ/л свидетельствует о сниженном овариальном резерве, а повышение его более 15 МЕ/л, как правило, о невозможности получения адекватного фолликулогенеза и полноценной яйцеклетки. Установлено, что соотношение ФСГ и лютеинизирующего гормона (ЛГ) дает возможность прогнозировать ответ яичников на стимуляцию их функции. Так, высокое соотношение уровня ФСГ и концентрации ЛГ на 3-й день менструального цикла можно использовать в качестве маркера слабой овариальной реакции [1, 8, 41, 108].

Число антральных фолликулов на 2-3-й день цикла меньше 5 в каждом яичнике указывает на сниженный овариальный резерв. Если в яичнике визуализируется один фолликул или их вообще не видно, то, скорее всего, такой яичник не ответит на экзогенную стимуляцию. Исключение может составить определенная группа больных, страдающих гипогонадотропным гипогонадизмом [6, 19, 41, 92, 130].

Объем яичника на 2-3-й день цикла меньше 5 см<sup>3</sup> указывает на сниженный овариальный резерв, а при объеме 2 см<sup>3</sup> невозможно получить полноценный ооцит. Исключением также может быть гипогонадотропный гипогонадизм. Наличие в анамнезе операций, сопровождающихся вмешательствами на яичниках (резекция, каутеризация, вапоризация, декорткация яичников) приводит к снижению овариального резерва. Это выражается в меньшем количестве антральных и доминантных фолликулов в оперированных яичниках в циклах стимуляции овуляции, что, в конечном счете, снижает эффективность ВРТ [41].

Таким образом, к факторам, снижающим овариальный резерв, относят: старший репродуктивный возраст (старше 36 лет); наличие воспалительных заболеваний органов малого таза, снижающих

рецептивность яичников; хирургические вмешательства на яичниках и органах малого таза, нарушающих анатомию органов репродуктивной системы.

## **1.2. Современные схемы индукции суперовуляции в программах ВРТ**

В настоящее время в клинической практике для лечения различных форм женского и мужского бесплодия используются вспомогательные репродуктивные технологии, базирующиеся на проведении стимуляции функции яичников, получении достаточно большого числа фолликулов, ооцитов и оплодотворения их *in vitro*. Это стало возможным, благодаря синтезу новых лекарственных препаратов, разработке разнообразных схем их применения, что способствует уменьшению частоты отмененных циклов стимуляции суперовуляции в связи с преждевременным пиком ЛГ и позволяет значительно увеличить частоту наступления беременности [46].

Контролируемая овариальная суперовуляция в программах ВРТ осуществляется с помощью введения нескольких групп медикаментозных средств и включает:

- подавление собственной продукции ФСГ и ЛГ для управляемости менструальным циклом женщины, которое осуществляется путем введения агонистов гонадотропин релизинг гормона (а-ГнРГ), либо – антагонистов ГнРГ (ант-ГнРГ);
- собственно стимуляцию одновременного роста нескольких фолликулов с помощью гонадотропных препаратов (мочевых и рекомбинантных ФСГ и ЛГ);
- запуск (триггер) финального созревания яйцеклеток после достижения фолликулами определенных размеров.

Препараты агонистов ГнРГ используют в форме ежедневных инъекций, назального спрея или депо чаще по «длинному» протоколу, начиная с 19-22 дня предыдущего менструального цикла. Одновременно

присоединяют инъекции гонадотропинов, продолжая введение обоих препаратов до назначения триггера овуляции [27].

Длинный протокол с а-ГнРГ является «золотым стандартом» лечения бесплодия, обеспечивая нивелирование преждевременной лютеинизации фолликулов благодаря эффекту десенсибилизации. Это способствует более «гибкому» времени введения триггера овуляции. Достоинствами длинного протокола с а-ГнРГ являются управляемость цикла, возможность получения большого числа ооцитов хорошего качества, высокая эффективность попытки. К недостаткам относятся: увеличение продолжительности стимуляции суперовуляции, увеличение частоты развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ), повышение частоты многоплодной беременности, повышение общей стоимости лечения [21].

У пациенток с эндометриозом, а также с яичниковой гиперандрогенией на фоне гипоталамо-гипофизарной дисфункции иногда агонисты ГнРГ назначают в течение нескольких циклов до стимуляции – по «сверхдлинному» протоколу.

Данная схема используется для более надежного предупреждения «паразитарного» выброса ЛГ и, таким образом, для улучшения качества получаемых ооцитов и эмбрионов и показателей имплантации. Достоинствами длинного протокола с аГн-РГ являются управляемость цикла, высокая эффективность попытки, а к недостаткам – увеличение продолжительности стимуляции овуляции, увеличение частоты развития СГЯ, повышение частоты многоплодной беременности, повышение общей стоимости лечения [24, 41, 98, 106].

Существует и «короткий» протокол назначения агонистов ГнРГ, но в последние годы его используют редко. Этот протокол рекомендуют пациенткам со сниженным овариальным резервом и «бедным» ответом яичников. Смысл этого вида лечения заключается в том, чтобы в первые дни назначения аГн-РГ использовать его свойство стимулировать гипоталамо-гипофизарную систему и улучшить ответ яичников. Недостатком этого

протокола является плохое качество получаемых ооцитов, среди которых много незрелых [41].

Антагонисты ГнРГ используют в виде одноразового и многократного введения. Режим многократного введения является более распространенным вследствие лучшей контролируемости цикла.

Преимуществами использования антГн-РГ являются:

- быстрый эффект (несколько часов), короткий период выведения препаратов;
- снижение риска формирования кист яичников;
- укорочение по времени схемы стимуляции яичников;
- отсутствие выраженной недостаточности лютеиновой фазы;
- возможность проведения «мягких» схем стимуляции суперовуляции;
- возможность использования в качестве триггера овуляции агонистов ГнРГ;
- низкий риск развития средних и тяжелых форм СГЯ;
- легче переносится пациентками [53].

Введение антагонистов ГнРГ начинают обычно с 5-7 дня стимуляции гонадотропинами, в позднюю фолликулярную фазу, т.е. в тот период, когда растущие фолликулы нуждаются в защите от неблагоприятного воздействия возможных «паразитарных» выбросов ЛГ.

Существуют два режима введения – фиксированный – на 5-6 день стимуляции, и гибкий, когда день назначения антГн-РГ зависит от размера лидирующих фолликулов, который должен составлять 14 мм. Большинство клиницистов придерживаются гибкого протокола, хотя есть работы, показывающие, что исход лечения не зависит от режима введения антГн-РГ. Результаты некоторых исследований показывают, что добавление рекомбинантного ЛГ в гибком протоколе с антГн-РГ увеличивает число зрелых ооцитов, в том случае, если пациентка младше 35 лет и имеет хороший овариальный ответ, при «бедном» же ответе, этого не происходит. Ряд авторов указывают на противоположную тенденцию – рекомбинантный



ЛГ в протоколах с антГн-РГ значительно увеличивает уровень имплантации у пациенток в возрасте 36 - 39 лет [82, 83, 97, 139].

Более обоснованно использование антГн-РГ у пациенток молодого возраста, с хорошим овариальным резервом, склонных к гиперстимуляции. Однако, антГн-РГ не менее широко применяются у пациенток со сниженным овариальным резервом и «бедным» ответом, например, у женщин позднего репродуктивного возраста, вероятно потому, что антГн-РГ позволяют сохранить и пролонгировать до преовуляторного периода те фолликулы, которые стали расти на фоне введения гонадотропинов, в то время как при длинном протоколе с аГн-РГ наблюдается выраженная супрессия яичника и, как следствие, нет адекватного ответа яичника, а при коротком протоколе с аГн-РГ страдает качество ооцитов [21, 41, 71, 80, 116, 120].

В последнее десятилетие некоторыми специалистами предлагается использовать ингибиторы ароматазы в репродуктивной медицине с целью стимуляции функции яичников. Предполагается их успешное использование в комбинации с гонадотропинами при «бедном» ответе или при тяжелых формах эндометриоза в рамках «длинного» протокола с аГн-РГ, когда ингибиторы ароматазы назначают ежедневно одновременно с аГн-РГ до начала применения гонадотропинов. Положительными эффектами этой группы препаратов можно считать снижение доз вводимых гонадотропинов, риска СГЯ и стоимости лечения. Тем не менее, роль ингибиторов ароматазы при ВРТ остается неясной ввиду того, что нет четких данных об эффективности и безопасности доз вводимых препаратов. Очевидно, что необходимы более интенсивные и консолидированные исследования, способные определить место ингибиторов ароматазы в репродуктивной медицине [35, 41, 105].

Стимуляция гонадотропинами начинается в течение первых трех дней менструального цикла и длится в среднем 11-13 дней. В течение этого периода в одно и то же время суток осуществляют подкожные (рекомбинантный ФСГ, ЛГ) или внутримышечные (мочевые гонадотропины)

инъекции определенного количества препаратов. В большинстве случаев проводят монотерапию ФСГ, у ряда пациенток необходима сочетанная терапия ФСГ и ЛГ.

Подбор доз гонадотропинов для овариальной стимуляции в большинстве случаев происходит эмпирически. Стартовая доза ФСГ у женщин с нормальной овуляцией, подвергшихся стимуляции яичников для ЭКО, обычно находится между 150 и 250 МЕ в сутки в зависимости от возраста пациентки и овариального резерва яичников. В случае предположения у пациентки высокого овариального резерва, необходимо использовать «малые дозы» вводимых гонадотропинов, так как в этих случаях высок риск развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ). При наличии же низкого овариального резерва не исключен «бедный» ответ, поэтому доза гонадотропинов может быть довольно высокой. Но, тем не менее, при наличии у пациенток такого состояния как синдром поликистозных яичников (СПЯ), высокие параметры овариального резерва зачастую не гарантируют адекватный ответ яичников на экзогенную стимуляцию, что, несомненно, требует индивидуального подхода к лечению и использования модифицированных схем стимуляции овуляции [19, 41, 68].

Существуют различные исследования по изучению стартовых доз ФСГ, в одних показан дозозависимый эффект по числу полученных ооцитов, но с одинаковой частотой имплантации, в других – что при использовании низкой и высокой доз рФСГ, препарат более эффективен в низких (150МЕ) дозах: полученные ооциты характеризуются высокой частотой оплодотворения, частота наступления беременности и исход лечения выше [55, 63, 69, 79].

Во время стимуляции суперовуляции проводится ультразвуковой мониторинг овариального ответа с целью определения количества и размеров фолликулов, толщины эндометрия. Критериями адекватной реакции яичников на введение ФСГ являются:

- диаметр лидирующего фолликула на 6-7 день введения препарата не менее 10-11 мм;

- прирост эндометрия (по данным М-эхо) после 6 дня введения не менее 1 мм в сутки;

- прирост диаметра лидирующего фолликула не менее 2 мм в сутки.

Выбор между мочевыми и рекомбинантными гонадотропинами является дискуссионным вопросом. До настоящего времени нет достоверных данных о преимущественной эффективности той или иной группы препаратов. В настоящее время проводятся исследования, анализирующие роль ЛГ в фолликуло- и оогенезе стимулированного цикла и выделение групп пациенток, нуждающихся в его дополнительном назначении в рекомбинантной либо мочевой форме [41, 93, 100, 103, 111, 121, 128].

Запуск (триггер) финального созревания яйцеклеток осуществляют с помощью препарата хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), который берет на себя роль ЛГ в естественном менструальном цикле. Для ЭКО назначают 10000 МЕ мочевого ХГЧ внутримышечно или 250 мкг (6500 МЕ) рекомбинантного ХГЧ подкожно. В настоящее время известно, что все триггеры, содержащие ХГ (овитрель, прегнил, хорагон) применяющиеся в программах ВРТ, имеют примерно одинаковую и достаточно высокую эффективность [4, 57, 90].

В последние годы в качестве триггера овуляции у пациенток с высоким риском развития синдрома гиперстимуляции яичников или при отсутствии овуляции на введение чХГ применяются агонисты ГнРГ, но в тоже время, некоторые авторы отмечают, что их применение связано с более низкими показателями наступления беременности [4, 30, 70, 88, 89, 102].

Спустя в среднем 36 часов после введения ХГЧ, незадолго до возможной овуляции, проводят процедуру пункции фолликулов для аспирации зрелых ооцитов, после оплодотворения которых *in vitro* и инкубации в питательной среде через 48-72 часа производится перенос эмбрионов на ранней стадии дробления в матку пациентки.

В последние годы ряд клиницистов предлагает вернуться к естественным циклам, то есть к циклам без стимуляции или с минимальной стимуляцией роста фолликулов, считая их более физиологичными. Однако, такой подход сопровождается резким снижением эффективности ЭКО, заставляя пациентку проходить повторные циклы стимуляции, оплачивая расходы на лабораторный этап ЭКО [28, 46, 127].

### **1.3. Качество ооцитов и эмбрионов в индуцированных циклах**

Практически все специалисты, практикующие ЭКО, сходятся во мнении, что ключевым фактором успеха программ экстракорпорального оплодотворения служит качество используемых половых клеток (как сперматозоида, так и ооцита). Первые этапы раннего эмбриогенеза человека в большей степени зависят от состояния ооцита [14, 26, 42].

По мнению многих исследователей, главной причиной неудачных исходов программ ВРТ является недостаточно точная оценка качества эмбрионов, отбираемых для переноса, которая сегодня строится исключительно на морфологических критериях. Учитывая, что этапы созревания яйцеклетки, развитие эмбрионов и имплантация являются цитокинзависимыми процессами и контролируются иммунной системой, оптимальным представляется поиск молекулярно-биологических маркеров, ассоциированных с исходом программ ВРТ. Одним из альтернативных критериев является поиск биохимических показателей фолликулярной жидкости (ФЖ), содержание которых отражало бы качество и имплантационный потенциал переносимых в матку эмбрионов [15, 44].

Фолликулярная жидкость представляет собой фильтрат сыворотки крови и содержит различные протеины, электролиты, цитокины, факторы роста, пептидные и стероидные гормоны, энергетические субстраты, проникающие в ФЖ через межклеточные контакты в гранулезе. Их составом во многом определяется развитие ооцитов в растущем пуле фолликулов. Биологически активные соединения, содержащиеся в антральной полости фолликула и составляют микроокружение, в котором развивается ооцит.

Концентрации этих веществ непостоянны и изменяются как в зависимости от особенностей гормонального профиля фаз менструального цикла, так и независимо от уровня гормонов в сыворотке крови. Как избыток, так и недостаток этих соединений в фолликулярной жидкости может оказывать выраженное негативное действие на развитие ооцита [18, 62, 84, 95].

Вмешательство в естественный ход реализации процесса фолликулогенеза в рамках искусственной стимуляции овуляции может приводить к массовой атрезии фолликулов и неполноценности ооцитов, полученных при пункции. Изменение состава фолликулярной жидкости в этих условиях позволяет прогнозировать качество ооцита и в какой-то мере исход программ ВРТ [16, 124].

В настоящее время интерес многих исследователей сконцентрирован на поиске корреляций между концентрацией содержащихся в ФЖ субстанций, качеством полученных ооцитов и частотой наступления беременности, однако до настоящего времени попытки выделения одного или нескольких «фолликулярных» маркеров не увенчались успехом [84, 123].

Интересно отметить исследование М. Р. Rosen et al. 2008, в котором авторы количественно оценивают влияние размера фолликула на созревание ооцита, оплодотворение и качество эмбриона. Размер фолликула не определял число бластомеров эмбриона, но у эмбрионов от фолликулов меньших размеров была статистически значимая более высокая фрагментация по сравнению с группой фолликулов больших размеров. Таким образом, от наибольших по размеру фолликулов, наиболее вероятно, будет получен зрелый ооцит, который был способен к оплодотворению и развитию в высококачественный эмбрион [14, 56].

В настоящее время в практической эмбриологии существуют лишь субъективные критерии оценки качества клеточного материала (ооцитов и эмбрионов). Морфологическая оценка в лаборатории основана на оценке внешнего вида полученных ооцит-кумулюс-комплексов (ОКК): «прозрачности», размера и «степени разрыхления» клеток кумулюса и

лучистого венца. Зрелые ОКК-комплексы, как правило, крупнее, кумулюс разросшийся, имеет клеточную структуру, клетки лучистого венца расходятся лучами от ооцита. Такие ОКК-комплексы выглядят более «прозрачными», чем незрелые. Авторы отмечают, что оценка зрелости ооцитов по состоянию ОКК-комплексов носит косвенный характер и часто не отвечает истинному состоянию ооцита. Асинхронность в созревании ядра ооцита, ооплазмы и клеток кумулюса достаточно часто встречается при стимуляции суперовуляции. Более точное определение степени зрелости возможно только после ферментативного удаления клеток кумулюса, что делается при подготовке к ИКСИ. Интересно отметить работы, в которых исследуется связь размеров ооцита и результатов оплодотворения. Рядом автором показано, что диаметр ооцита не связан с возникновением оплодотворения и не отражает качества оставшихся в яичнике ооцитов [26, 38, 42, 54, 62, 110, 131].

Недавние исследования позволяют предположить, что представляется возможным отобрать зиготы на перенос уже на стадии пронуклеусов. Для определения оптимального потенциала имплантации пронуклеусы должны располагаться близко друг к другу, адекватно разделены, цитоплазма должна быть гетерогенна, с выраженным венчиком. С учетом проведения методики ИКСИ показан удовлетворительный процент беременностей [48].

Многие исследователи, изучая качество эмбрионов, обращали внимание на морфологию пронуклеусов, наличие раннего начала дробления, количество бластомеров через 48-72 часа после инсеминации, морфологию эмбриона до стадии бластоцисты, отмечая достоверную корреляцию этих характеристик с успешными показателями имплантации [73, 107].

Некоторые авторы считают наиболее рациональным перенос эмбрионов в полость матки не на стадии деления, а на стадии бластоцисты, которая является наиболее поздней стадией развития зародыша человека, доступной для наблюдения врача-репродуктолога [38, 115].

Система оценки бластоцисты основана на ее морфологических характеристиках, по совокупности которых делается заключение о возможностях этой бластоцисты к дальнейшему развитию и принимается решение о пригодности ее к переносу и/или криоконсервации, однако некоторые авторы считают эту систему оценки весьма субъективной и не отвечающей истинному состоянию клеточного материала [62].

В настоящее время наиболее часто используются критерии оценки развития бластоцист по классификации, предложенной Д.К. Гарднером (Dr. D.K. Gardner) - при описании морфологии эмбрионов цифрами обозначается количество бластомеров в эмбрионе, буквами – особенности морфологии.

- Класс А – одинаковые симметричные бластомеры;
- Класс В – бластомеры разного размера с фрагментацией < 10%;
- Класс С – фрагментация от 10% до 50%;
- Класс D – фрагментация > 50% или наличие пронуклеарного одноклеточного эмбриона.

Эмбрионы класса А оцениваются как высокого качества, классов В, С – среднего качества и класса D – низкого качества [33, 38].

В недавнем исследовании S. Goto et al. 2011 показано, что состояние бластоцисты зависит от возраста женщины, и чем она старше, тем качество бластоцисты хуже, и, следовательно, ниже частота наступления беременности [117].

Таким образом, вследствие сложных механизмов, связанных с созреванием ооцита, маловероятно, что единственная особенность (за исключением размера ооцита) может отразить качество клетки. Известно, что характер развития ооцитов в растущем пуле фолликулов в значительной мере определяется составом жидкости антральной полости, следовательно, чтобы получить информацию о компетентности ооцита, морфологическая оценка должна быть объединена с другими подходами (то есть оценка ооцита должна быть объединена с анализом его микроокружения и оценками

развития эмбриона перед переносом (проядерная стадия, стадия деления и стадия бластоцисты) [18, 62].

## **2. Молекулярные и физиологические аспекты эндотелиальной дисфункции**

Многочисленные исследования последних лет существенно расширили классические представления о сосудистой эндотелии как об анатомическом барьере, препятствующем проникновению крови в стенку сосудов. В настоящее время стало очевидным, что эндотелий сосудов - это активная метаболическая система, поддерживающая сосудистый гомеостаз путем осуществления ряда важнейших функций: модулирования тонуса сосудов, регуляции транспорта растворенных веществ в клетки сосудистой стенки, роста этих клеток; формирования внеклеточного матрикса; защиты сосудов от возможного неблагоприятного действия циркулирующих клеток и субстанций; регуляции хемотаксических, воспалительных и репаративных процессов в ответ на локальное повреждение. Все эти функции осуществляются только нормально функционирующим эндотелием. В экстремальных условиях может произойти нарушение функции или даже повреждение эндотелия, что выражается понятием эндотелиальная дисфункция (ЭД). Дисфункция эндотелия проявляется в первую очередь нарушением способности адаптироваться к измененным условиям и выражается в извращении его секреторной функции, в результате чего возникает дисбаланс между медиаторами [13, 29, 49, 50].

### **2.1. Современные представления о механизмах развития эндотелиальной дисфункции**

Согласно многочисленным наблюдениям при ЭД происходят следующие процессы:

- на поверхности эндотелия уменьшается плотность рецепторов, раздражение которых в норме приводит к образованию оксида азота (NO) и других вазодилататоров;



- в поврежденном эндотелии нарушается синтез NO и возрастает активность вазоконстрикторов и антикоагулянтов, увеличивается синтез эндотелинов, поэтому реакция эндотелия на вазодилататоры извращается и вместо дилатации наблюдается констрикция сосудов;

- стимулируются процессы гемокоагуляции;

- повреждение эндотелия может приводить к обнажению внутреннего мышечного слоя сосудов и в этом случае гормоны и биологически активные вещества, находящиеся в крови действуют прямо на мышечную оболочку.

Особенно серьезным нарушением при ЭД является уменьшение биодоступности оксида азота. Это происходит в результате следующих изменений:

- Внутриклеточный окислительный стресс, нейтрализуя активность синтазы оксида азота, выключает тем самым самую мощную вазодилататорную систему, что приводит к уменьшению синтеза NO, одновременно увеличивая синтез ангиотензина-II.

- Изменение состояния калликреин-кининовой системы. Вначале происходит активация калликреин-кининовой системы за счет увеличения предшественника прекалликреина, затем происходит усиленное расщепление прекалликреина и снижение активности ингибиторов, в результате чего возрастает концентрация калликреина.

- В нарушении функции эндотелия большую роль играет неконтролируемый поток ионов кальция в клетку, что может блокировать активность митохондрий, и, следовательно, уменьшать продукцию энергии [29, 51].

Согласно современным представлениям, ЭД – одна из важнейших причин развития сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе артериальной гипертензии, инфаркта миокарда, сахарного диабета второго типа, а также их осложнений - хронической сердечной недостаточности. Для нее характерно повышение активности ренин-ангиотензин - альдостероновой и симпатoadреналовой систем, а также вазопрессина, при одновременном

снижении биодоступности оксида азота. Также имеются данные о повреждении эндотелия вследствие гиперхолестеринемии в совокупности с гиперинсулинемией или с повышенным уровнем эстрогенов, которые, стимулируя ренин-ангиотензин-альдостероновую систему, способствуют развитию оксидативного стресса и вазоконстрикции. Все это приводит к прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний, а также является одним из звеньев патогенеза микро- и макроангиопатий при сахарном диабете [51].

Таким образом, поскольку эндотелий остается активным органом и при дисфункции, он становится обязательным участником, а иногда и инициатором многочисленных заболеваний сердечно-сосудистой системы, воспалительных и аутоиммунных процессов, тромбозов, сепсиса и многих других патологий.

## **2.2. Маркеры эндотелиальной дисфункции (молекулы повреждения и восстановления эндотелия)**

В норме эндотелий обладает способностью согласовывать свои регуляторные процессы, а именно синтез, выделение и разрушение БАВ соответственно потребностям того органа, где находятся данные кровеносные сосуды. Эндотелий способен вырабатывать вещества, обладающие антагонистическими свойствами, а также согласовывать их количество и активность с существующими условиями, и эти процессы обеспечивают механизмы саморегуляции. В норме секреторную активность эндотелия обеспечивают две группы веществ - вазодилататоры и вазоконстрикторы. Одним из самых активных веществ, обладающих вазодилататорными, антикоагулянтными, защитными свойствами является оксид азота. В настоящее время доказана сигнальная роль оксида азота в регуляции сосудистого тонуса. Будучи сигнальной молекулой, NO оказывает влияние на весь организм, принимает участие в функционировании почти всех органов и систем. При стрессорных воздействиях (холод, гипоксия, ишемия и т.д.) вырабатываются стрессорные белки, которые способствуют

увеличению активности антиоксидантных систем, активирующих фермент NO-синтазу, а впоследствии вазодилатацию. Оксид азота также способен регулировать активность факторов роста: стимулирует ангиогенез, увеличивая рост капилляров. Защитная функция оксида азота заключается в предохранении эндотелия от повреждения, сохраняя его физиологическое состояние. При дисфункции эндотелия дефицит оксида азота вызывает нарушение ионного состава клеток, стимулируются коагуляционные механизмы, то есть ускоряются адгезия и агрегация тромбоцитов, повышается тонус и усиливается сокращение гладких мышц сосудов. Избыточное выделение оксида азота делает его токсичным, может стимулировать апоптоз, нейродегенеративные процессы [13, 29, 43, 49, 50].

Так же, как и оксид азота, маркерами эндотелиальной дисфункции являются эндотелины. Это группа полипептидов, представленная как одни из самых сильных вазоконстрикторов. Образуются эндотелины преимущественно в эндотелии сосудов, их количество определяется функциональным состоянием эндотелия. Эндотелин-1 наиболее активный по сравнению с другими эндотелинами. Вследствие связывания эндотелина-1 со специфическими рецепторами на мембранах гладкомышечных клеток происходит усиленное сужение сосудов. Увеличение его количества в крови возникает вследствие различных стрессорных факторов (ишемия, гипоксия, оксидантный стресс, высоких концентраций глюкозы, тромбина и др.) [43, 51, 78].

Процесс восстановления эндотелия (ангиогенез) характерен для различных биологических и патологических процессов. Регуляция ангиогенеза предполагает реализацию этих механизмов через факторы, которые воздействуют на сосудообразование. Они могут изменять рост сосудов, влиять на формирование их стенок. Одним из индукторов ангиогенеза является сосудисто-эндотелиальный фактор роста (СЭФР). С одной стороны, он необходим для физиологического неоангиогенеза, с другой – играет ведущую роль в патологическом ангиогенезе при

опухолевых заболеваниях. Изучением клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе физиологического и патологического ангиогенеза, активно занимаются исследователи в последние годы [7, 59].

Экспрессия СЭФР стимулируется множеством проангиогенных факторов, а его уровни регулируются такими факторами окружающей среды как рН, давление и концентрации кислорода. Важную роль в физиологическом ответе на увеличение концентрации СЭФР играют рецепторы к нему на поверхности различных клеток. Активация этих рецепторов на клетках ведет к включению многочисленных внутриклеточных пострецепторных сигнальных каскадов, запускающих ангиогенез. СЭФР играет важную регуляторную роль, модулируя адгезию лейкоцитов и тромбоцитов. В отношении эндотелия он оказывает антиапоптотический эффект, так снижение уровня СЭФР обуславливает апоптоз эндотелия, ведущий к обструкции просвета сосудов. Ключевым компонентом сосудистой протекции посредством СЭФР-индуцированной продукции NO является способность последнего регулировать экспрессию молекул адгезии ICAM и VCAM, обеспечивая репарацию поврежденного эндотелия [11, 137].

В организме образование новых сосудов может происходить не только путем ангиогенеза, но и васкулогенеза. В связи с этим в последнее десятилетие в процессе васкулогенеза активно изучается роль эндovasкулярных прогениторных клеток (endothelial progenitor cells - EPC). EPC были выделены из костного мозга и периферической крови и характеризовались экспрессией поверхностных маркеров CD34, и/или CD133, и VEGFR-2, которые используются для их идентификации. Однако, периферическая кровь содержит эндотелиальные прогениторные клетки и миелоидного (моноцитарного) происхождения, не экспрессирующие маркер гемопоэтических клеток CD34, которые также могут образовывать сосудистую сеть. В настоящее время не вызывает сомнения, что не только костный мозг может выделять прогениторные клетки, около 70% их не

костномозгового происхождения. К альтернативным ЕРС относятся мезенхимальные стромальные клетки, тканевые резидентные клетки. На сегодняшний день неизвестно, как прогениторные клетки не костномозгового происхождения мигрируют в кровь. Более известно о механизмах выделения ЕРС из костного мозга. Выход клеток и поступление в циркуляцию происходит под влиянием различных стимулов, основным из которых является гипоксия. СЭФР является эффективным мобилизатором ЕРС и, как известно, потенциальным индуктором ангиогенеза. При повреждении тканей СЭФР опосредует пролиферацию, дифференцировку и хемотаксис эндотелиальных клеток, что приводит к рекрутизации клеток к месту повреждения и стимуляции тем самым неоваскуляризации. Адгезии к поврежденному эндотелиальному монослою способствуют в том числе и молекулы адгезии (ICAM-1 и VCAM-1)[34, 115].

Таким образом, васкулогенез эндотелиальными прогениторными клетками может являться фактором для начала каскада тканевой регенерации. Однако вопрос о том, как ЕРС способствуют неоваскуляризации остается открытым и является предметом активного исследования.

Одним из маркеров, отражающих состояние эндотелия является фактор Виллебранда. Уровень этого фактора в крови свидетельствует о состоянии ее реологических свойств, поскольку он стимулирует адгезию тромбоцитов и эритроцитов. В физиологических условиях он участвует в укреплении стенок сосудов, при уменьшении его содержания наблюдается кровоточивость. Изменение количества фактора Виллебранда в плазме крови рассматривается как проявление дисфункции эндотелия и имеет прогностическое значение, также, как и sPECAM-1. Это растворимая форма молекулы межклеточной адгезии PECAM-1 – продукт протеолитического отщепления PECAM-1/CD31 с поверхностных клеток эндотелия. Будучи экспрессированным на клетках эндотелиальной, тромбоцитарной или лейкоцитарной природы, PECAM-1 участвует в регуляции

трансэндотелиальной миграции лейкоцитов при воспалении, а также регуляции ангиогенеза. Однако при протеолитическом его отщеплении и появлении в растворимой форме в экстрацеллюлярном пространстве, sPECAM-1 маркирует собой повреждение клеток, в частности, эндотелия. В настоящее время PECAM-1, также как и СЭФР, рассматривается как участник ангиогенеза, а sPECAM-1 - как маркер дисфункции и повреждения эндотелия. [43, 51, 122].

### **3. Роль эндотелиальной дисфункции в программах ВРТ при различных формах бесплодия**

Циклический рост и развитие новых сосудов – физиологический ангиогенез, является основой различных процессов, происходящих в женской репродуктивной системе. Это развитие фолликула, динамические изменения эндометрия и др. Для развития полноценного ооцита необходимо формирование стабильного кровотока в сосудах яичника. Яичниковый ангиогенез обеспечивает основные функции половой железы женщины – фолликулогенез и стероидогенез, определяющие формирование, селекцию и развитие полноценного доминантного фолликула [5].

СЭФР выступает как ключевой ангиогенный маркер и ему отводится значительная роль в регуляции фолликулярного ангиогенеза, кроме того, он способен инициировать данный процесс и пролиферацию клеток фолликула. В физиологическом менструальном цикле уровень СЭФР постепенно увеличивается и достигает пика к моменту менструации, что связано с воздействием гонадотропинов [7, 11, 37, 87, 135, 136].

При проведении программ ВРТ стимуляция суперовуляции проводится с целью получения большого количества ооцитов. Яичник способен отвечать на стимуляцию адекватным ростом нескольких фолликулов, что достигается использованием различных гормональных препаратов. Нарушение ангиогенеза в этих условиях способствует развитию дисфункции эндотелия, что связано с высокими уровнями СЭФР в сыворотке крови и фолликулярной жидкости. В литературе имеются работы,

свидетельствующие о неблагоприятном влиянии высоких концентраций СЭФР на качество ооцитов и эмбрионов в индуцированном цикле, и, следовательно, на имплантацию. По мнению других авторов, у пациенток младше 35 лет с первичным бесплодием, обусловленным трубным или мужским фактором, высокие уровни СЭФР связаны с высоким уровнем васкуляризации фолликулов, что позволяет получить ооциты и эмбрионы более высокого качества. О нарушении ангиогенеза, приводящего к неполноценности женских гамет, свидетельствует снижение содержания СЭФР в фолликулярной жидкости при некоторых видах эндокринного бесплодия - гиперандрогении и гиперпролактинемии [10, 16, 58, 85, 86, 136].

Не менее важным моментом, чем ангиогенез, является формирование межклеточных контактов - адгезия клеток, которая играет важную роль на всех этапах репродуктивного цикла (оплодотворение, имплантация, плацентация и др.). Она осуществляется с участием молекул клеточной адгезии. В настоящее время они активно изучаются, в том числе в качестве возможных маркеров для прогноза и диагностики развития преэклампсии. Изменение содержания адгезивных молекул: sE-селектина, sVCAM, sICAM, sPECAM в сыворотке крови может являться дополнительным маркером эндотелиальной дисфункции, так как они отражают процесс активации эндотелиоцитов. Имеются единичные данные об изменении растворимых форм молекул адгезии (sICAM-1 и sVCAM-1) в сыворотке крови в соответствии с фазами физиологического менструального цикла. Наибольшие их концентрации наблюдаются перед менструацией и во время ее, а наименьшие - в лютеиновую фазу. Причем, если наступила имплантация, то уровни молекул адгезии были максимальны. F. Fornaro et al. 2007 показали, что в индуцированном цикле внутрифолликулярное содержание sICAM-1 может предсказать яичниковый ответ, а sVCAM-1 может являться индикатором степени фолликулярной лютеинизации. Ряд авторов указывают на участие данных маркеров в процессе имплантации трофобласта. В литературе имеются данные о содержании sPECAM-1 в

фолликулярной жидкости в индуцированном цикле при различных формах бесплодия. Авторы получили практически идентичные результаты в группах с трубной и мужской формами бесплодия, также в группе пациенток с эндометриозом. Нами получены аналогичные результаты, однако, влияние sPESAM-1 на частоту наступления беременности в индуцированных циклах в сыворотке крови и фолликулярной жидкости изучено недостаточно, поэтому необходимы дальнейшие исследования для изучения роли этого маркера в исходах программ ВРТ [17, 64, 74, 99, 113, 125, 136, 140].

Характер ангиогенеза, определяемый синтезом ангиогенных факторов роста и их рецепторов, является не единственным параметром, определяющим состояние кровоснабжения фолликула, поскольку во многом этот процесс зависит также от свойств эндотелия и баланса эндотелиальных факторов, контролирующих тонус сосудов. Эндотелины плазмы крови оказывают влияние на различные физиологические и патологические процессы в органах и тканях, а увеличение их концентрации можно использовать в качестве маркеров патологических процессов в организме человека. В физиологическом менструальном цикле наиболее высокие концентрации эндотелина-2 наблюдаются в период овуляции в гранулезных клетках фолликула. При этом наблюдается экспрессия эндотелина-1 в гранулезных клетках яичников человека и проявление данного фактора в фолликулярной жидкости, полученной от женщин при индукции суперовуляции в программах ВРТ. В полученной фолликулярной жидкости уровень эндотелина-1 выше в гонадотропинстимулированных циклах по сравнению со спонтанными циклами. В недавнем исследовании M. Zhao et al. 2010 изучалось влияние концентраций СЭФР, оксида азота, эндотелина-1 фолликулярной жидкости на исход ЭКО. В результате исследования было показано, что содержание СЭФР и оксида азота в фолликулярной жидкости антральных фолликулов значительно увеличивалось у женщин с наступившей беременностью, по сравнению с теми, у кого беременность не наступила. Концентрация же эндотелина-1 была ниже у забеременевших и



выше при отрицательном результате имплантации. Следовательно, исследуемые маркеры дают возможность прогнозировать исход программ ВРТ [37, 75, 76, 129].

Таким образом, присутствие рассматриваемых факторов в фолликулярной жидкости у женщин, включенных в цикл ЭКО и подвергшихся индукции суперовуляции, показывает степень вовлечения эндотелиновой системы в процесс фолликулогенеза человека. Возрастающее число исследований в области ангиогенеза, подтверждает, что физиологический ангиогенез является одним из ключевых процессов в репродукции человека. В настоящее время можно считать доказанным, что дисфункция процесса ангиогенеза может рассматриваться как один из ключевых патофизиологических факторов, обуславливающих развитие заболеваний репродуктивной системы человека.

### **3.1. Особенности ведения индуцированного цикла с учетом маркеров эндотелиальной дисфункции**

Известно, что на протяжении всего процесса индукции суперовуляции происходит нарушение функциональной активности сосудистого эндотелия. Причиной является высокая эстроген-гестагеновая нагрузка, сопровождающая весь индуцированный цикл. Развивающаяся при этом эндотелиальная дисфункция – это патологическое состояние эндотелия, в основе которого лежит нарушение продукции эндотелиальных факторов, при котором он не в состоянии обеспечить гемореологический баланс крови. Основными проявлениями ЭД наряду с нарушением вазодилатации, дисрегуляцией факторов роста, повышением сосудистой проницаемости являются гиперкоагуляция и тромбообразование. По мнению многих авторов с изменением коагуляционных параметров свертывающей системы крови связано от 40 до 60% случаев невынашивания беременности. Взаимосвязь между тромбофилическими состояниями и неудачными исходами программ ВРТ активно обсуждаются в литературе, однако возможные механизмы влияния тромбофилии на исходы программ ВРТ до сих пор неясны.

Обсуждается возможная связь гиперкоагуляции с повторными имплантационными потерями в программах ЭКО. Одной из методик, направленных на снижение тромбогенности и повышение эффективности ЭКО, может быть применение гепаринов. Не менее целесообразным и важным представляется обследование на скрытые тромбофилии еще на этапе подготовки и планирования программ ВРТ [12, 20, 25, 47, 109, 133].

Повышение сосудистой проницаемости лежит в патогенезе синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ), который является грозным осложнением индуцированного цикла. Синдром гиперстимуляции яичников (СГЯ) – ятрогенное состояние, в основе которого лежит ответ яичников на экзогенное введение препаратов-индукторов овуляции. Клинические проявления СГЯ обычно возникают в середине лютеиновой фазы цикла и являются следствием введения овуляторной дозы ХГ. Также они характерны для ранних сроков беременности после применения циклов ВРТ как следствие повышения эндогенного ХГ. В литературе описаны ранняя и поздняя формы появления СГЯ. Клинические проявления синдрома почти всегда похожи, независимо от времени его развития, однако тяжесть и прогноз течения СГЯ четко зависят от наступления или ненаступления беременности. Когда в лютеиновую фазу имплантации не происходит, синдром исчезает резко и спонтанно, редко достигая тяжелой формы. Если же имплантация происходит, почти всегда наблюдается утяжеление состояния, длящееся до 8-12 недель беременности. Поздний СГЯ, вызванный значительным подъемом ХГ в плазме крови, обычно ассоциируется с имплантацией и развитием беременности. В литературе также описываются случаи спонтанно возникшего СГЯ при физиологической беременности без применения методов ВРТ [91].

Механизмы развития СГЯ заложены в самих принципах стимуляции яичников, когда целенаправленно изменяются физиологические параметры фолликулогенеза. Патогенез СГЯ до конца неясен. В основе развития этого состояния лежит синдром избыточной сосудистой проницаемости с

массивным выходом жидкости в «третье пространство». Несомненно, что сверхвысокие уровни эстрадиола, наблюдаемые в преовуляторном периоде индуцированного цикла, являются плацдармом для формирования повышенной сосудистой проницаемости, а введение овуляторной дозы чХГ – пусковым моментом для развития этого синдрома. В настоящее время интерес исследователей сосредоточен на изучении биологически активных веществ, напрямую инициирующих повышение сосудистой проницаемости – ведущего патофизиологического феномена СГЯ, с целью выявления маркеров ранней диагностики осложнений беременности, а также факторов, позволяющих прогнозировать ее течение и исходы [39, 41, 112].

В настоящее время имеется ряд направлений для предотвращения развития СГЯ, предложенный Т.А. Назаренко, 2008:

- Использование «мягких», низкодозовых схем стимуляции
- Отмена цикла лечения при угрозе развития СГЯ
- Криоконсервация эмбрионов и их отсроченный перенос
- Замена триггера овуляции
- Отсроченное введение триггера овуляции – «coasting»
- Предварительная (до введения чХГ) пункция части фолликулов
- Проведение программ ЭКО в естественном (без стимуляции)

цикле

- Проведение программ IVM (in vitro maturation) – когда пунктируют незрелые фолликулы в нестимулированном цикле, проводят их дозревание in vitro, оплодотворяют и переносят эмбрионы в полость матки.

Из всех перечисленных пунктов наиболее действенным в клинической практике могут быть использование «мягких» протоколов стимуляции и отмена переноса с криоконсервацией эмбрионов. Другие меры либо малоэффективны (замена и отсроченное введение триггера овуляции), либо небезопасны - предварительная пункция части фолликулов. Вопрос о влиянии используемой схемы индукции является спорным. Известно, что

схема с использованием препаратов агонистов Гн-РГ, особенно у женщин с СПКЯ, является определенным фактором риска развития СГЯ [41, 66].

Меры ранней комплексной профилактики для пациенток с высоким риском развития СГЯ включают: снижение дозировки стимулирующего препарата, *coasting*, полная аспирация всех фолликулов, внутривенное введение раствора гидроксипроксиэтилкрахмала в день пункции фолликулов [41].

Однако, несмотря на предложенные меры и клинические исследования, на сегодняшний день нет абсолютных критериев, которые бы позволили предотвратить СГЯ у каждой пациентки. Необходимы масштабные исследования, направленные на понимание прежде всего патофизиологических механизмов этого синдрома.

Причиной бесплодия, ранних преембрионических и эмбрионических потерь беременности может быть состояние гипергомоцистеинемии, также способствующее развитию дисфункции эндотелия и гиперкоагуляции. По разным источникам, 12-18 % пациенток, имеющих эту проблему, прибегают к методам вспомогательных репродуктивных технологий. Многими авторами получены данные о том, что высокий уровень гомоцистеина (ГЦ) в сыворотке крови и фолликулярной жидкости негативно влияет на результаты ЭКО и наступление беременности и чем ниже уровень ГЦ, тем лучше качество эмбриона, а, следовательно, и исход программ ВРТ. В связи с этими данными, всем пациенткам с репродуктивными потерями в анамнезе и беременным групп высокого риска по невынашиванию, вступающим в программу ЭКО, следует проводить скрининговое обследование на наличие повышенного уровня гомоцистеина в крови, а также исследование системы гемостаза в период подготовки к беременности, в каждом триместре беременности и в послеродовом периоде. При умеренной и высокой гипергомоцистеинемии показано молекулярно-генетическое тестирование на выявление мутаций генов фолатного цикла [44, 94, 101, 126, 132].

Для коррекции гипергомоцистеинемии и профилактики ВПР плода при планировании беременности препараты фолиевой кислоты должны

приниматься оптимально за 2-3 месяца до зачатия обоими супругами, и в I триместре беременности до 12 недель. При выявлении состояния гиперкоагуляции используют низкомолекулярные гепарины (клексан, фраксин и др.) курсами по 10-14 дней, дозировка зависит от уровня гипергомоцистеинемии и состояния тромбогенной готовности [3, 9, 36, 47, 50].

Таким образом, взаимосвязь между тромбофилическими состояниями и неудачными исходами программ ВРТ возможна, как и связь гиперкоагуляции с повторными имплантационными потерями в программах ЭКО. Исследования, существующие на сегодняшний день, свидетельствуют о том, что существуют возможности прогресса в улучшении результатов ЭКО на основе выявления и коррекции патологии гемостаза. Для этого необходима тщательная предгравидарная подготовка, а также выработка новых рекомендаций и стандартов, позволяющих улучшить эффективность современных репродуктивных технологий.

### **РЕЗЮМЕ**

Анализ литературных данных подтверждает, что несмотря на наличие различных препаратов и схем их использования для стимуляции суперовуляции в настоящее время идеальной, подходящего всем категориям пациенток не существует. Очевидно, что необходим поиск новых, более совершенных для определенной категории пациенток протоколов лечения, направленных на снижение риска СГЯ, частоты многоплодной беременности, снижение финансового бремени супружеской пары.

До настоящего времени не определены биохимические показатели фолликулярной жидкости, содержание которых отражало бы качество и имплантационный материал переносимых в матку эмбрионов.

В практической эмбриологии отсутствуют объективные критерии оценки качества клеточного материала. Оценка зрелости ооцитов по состоянию ОКК-комплексов часто не отвечает истинному состоянию ооцита. Система оценки качества бластоцисты также весьма субъективна.

Существует достаточное количество научных работ, представляющих механизмы развития эндотелиальной дисфункции, однако сведения о маркерах эндотелиальной дисфункции разобщены и не систематизированы. Фрагментарны сообщения о воздействии гонадотропинов на эндотелий сосудов яичников.

Итак, изучение комплексного влияния маркеров ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции на женскую репродуктивную систему необходимо для прогнозирования исходов программ ВРТ с целью увеличения эффективности лечения бесплодия.

## **ГЛАВА II**

### **ПРОГРАММА, КОНТИНГЕНТ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе с людьми соблюдались этические принципы, предъявляемые статьей 24 Конституции РФ и Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2000 ред.).

#### **2.1. Материалы и программа исследования**

Данная исследовательская работа выполнена за 2009-2013г.г. на кафедре акушерства и гинекологии института последипломного образования (заведующий кафедрой, д.м.н., проф. А.Т. Егорова), кафедре биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии (заведующий кафедрой д.м.н., проф. А.Б. Салмина) ГБОУ ВПО «Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого министерства здравоохранения РФ».

Набор клинического материала проводился в ООО «Медицинский Центр гинекологической эндокринологии и репродукции «Три сердца» (директор – С.А. Сыромятникова). Клинико-лабораторные, гормональные исследования проводились на базе лаборатории ИХМИ (руководитель – д.м.н., проф. М.В. Екимова).

Исследование методом иммуноферментного анализа маркеров ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции (СЭФР, sPECAM-1 и эндотелина-1) проводилось на базе центральной научно – исследовательской лаборатории КрасГМУ (руководитель – д.м.н., проф. Ю.В. Котловский). Данное исследование выполнено в рамках проекта «Изучение особенностей эндотелиальной дисфункции в программах вспомогательных репродуктивных технологий», поддержанного в результате реализации государственного задания на выполнение фундаментальных научных исследований в 2012 году.

Критерии включения в исследование: трубная форма бесплодия; бесплодие, обусловленное мужским фактором – идеопатической олигозооспермией, идеопатической астенозооспермией.

Критерии исключения из исследования: бесплодие в сочетании с миомой матки; бесплодием, обусловленное эндометриозом, мужской фактор бесплодия - тератозооспермия и тяжелые нарушения эректильной дисфункции.

Проведено когортное исследование 158 супружеских пар, получивших лечение методами вспомогательных репродуктивных технологий. В зависимости от этиологической формы бесплодия пациентки были разделены на две группы: с трубной формой бесплодия (ТФ) – 122 пациентки и с мужским фактором бесплодия (МФ) - 36 супружеских пар. Пациентки с ТФ составили основную группу исследования, а пациентки с бесплодием, обусловленным мужским фактором - контрольную группу. Исследуемые группы были дополнительно разделены на подгруппы с учетом наступления беременности (наступившая беременность – Б+, отсутствие беременности – Б-).

Программа исследования представлена на рисунке 1.

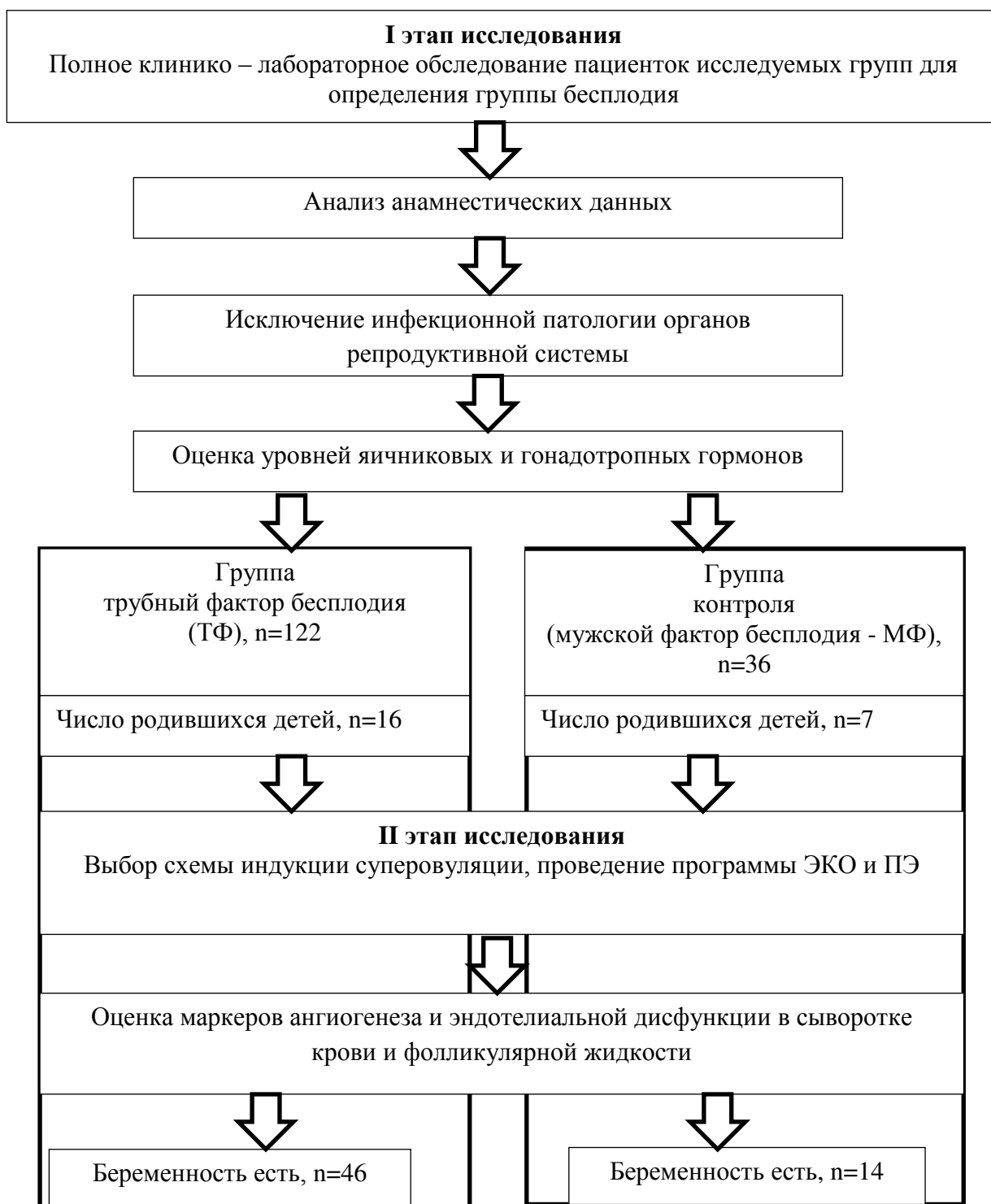


Рис. 1. Программа исследования.

В ходе проведения методов ВРТ осуществлялась аспирация преовуляторных фолликулов для исследования в фолликулярной жидкости



маркеров ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции, параллельно толстой иглой проводился забор крови из локтевой вены пациентки в количестве 15 мл и исследовалась сыворотка крови. Это исследование проведено 77 супружеским парам. Из них с трубной формой бесплодия было 60 пациенток, с мужским фактором бесплодия - 17 супружеских пар. Пациентки с ТФ отнесены нами в основную группу исследования, а пациентки с бесплодием, обусловленным мужским фактором, составили контрольную группу. Данные исследуемые группы были также дополнительно разделены на подгруппы с учетом наступления беременности (наступившая беременность – Б+, отсутствие беременности – Б-).

При сборе клинико-anamnestических данных использована медицинская документация: индивидуальная карта пациента при применении методов вспомогательных репродуктивных технологий (форма №111-1/у-03); медицинская карта амбулаторного больного (форма №025/у); протоколы иммуноферментного анализа сыворотки крови и фолликулярной жидкости.

## **2.2. Методы исследования.**

Клиническую оценку состояния здоровья обследованных пациенток проводили с помощью разработанной нами статистической карты. При сборе анамнеза обращали внимание на:

- время появления первой менструации, характер менструальной функции, регулярность и продолжительность менструальных циклов;
- особенности половой жизни: возраст начала половой жизни, какой брак по счету;
- детородную функцию: паритет, сведения о каждой беременности;
- количество самопроизвольных выкидышей и неразвивающихся беременностей;
- количество медицинских абортов;
- наличие своевременных и преждевременных родов в анамнезе;
- перенесенные гинекологические заболевания;
- экстрагенитальные заболевания;

- перенесенные оперативные вмешательства;

Для выявления причин бесплодия пациентки подвергались комплексу стандартных клинико-лабораторных методов обследования, включающих общеклиническое, гинекологическое исследования, УЗИ органов малого таза, эндоскопические методы исследования (лапароскопия и гистероскопия) при наличии показаний.

Определение уровней гормонов плазмы крови (ФСГ, ЛГ, пролактин, эстрадиол) проводилось при помощи метода радиоиммунного и радиоферментного анализа наборами фирмы «Immunotech» (Чехия) на базе лаборатории ИХМИ Красноярского государственного медицинского университета на 5-7 и 20-22 дни менструального цикла. Уровень ФСГ менее 10 ЕД/л указывал на нормальную резервность яичников и являлся основанием для выбора схемы индукции овуляции.

Обследование на инфекции включало взятие мазков на флору содержимого цервикального канала, влагалища и уретры, исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) отделяемого цервикального канала и влагалища и исследования крови методом ИФА на определение Ig A, M, G к комплексу TORCH. Бактериологический метод использовался при проведении световой микроскопии для исследования мазков на флору после окраски по Граму.

Серологический метод исследования (ИФА) основанный на выявлении взаимодействия антигена с антителом, выявляемых с помощью специальных высокочувствительных приборов, позволяющих количественно выявить меченый субстрат и, следовательно, искомый антиген или антитело. Во всех случаях были исключены ВИЧ-инфекция и сифилис.

Перед началом стимуляции суперовуляции с каждой пациенткой была проведена беседа о планируемом протоколе стимуляции и получено информированное согласие. Все исследования выполнены с разрешения локального этического комитета КрасГМУ (протокол № 21/2009 от 22.01.2010 года).

Программы ВРТ проводились на базе ООО «Медицинский Центр гинекологической эндокринологии и репродукции «Три сердца» и включали:

1. Индукцию суперовуляции.
2. Аспирацию фолликулов.
3. Эмбриологический этап.
4. Перенос эмбрионов (ПЭ) с посттрансферной поддержкой и диагностикой ХГЧ.

Стимуляцию суперовуляции осуществляли с применением трех протоколов. Длинный протокол с агонистом гонадотропин-рилизинг-гормона трипторелином использовался для 3 пациенток с трубной формой бесплодия и 4 пациенток с мужским фактором бесплодия. Короткий протокол с агонистом гонадотропин-рилизинг-гормона трипторелином использовался для 46 пациенток с ТФ и 12 пациенток с МФ. Протокол с антагонистом гонадотропин-рилизинг-гормона цетрореликсом применялся у 73 пациенток с ТФ и у 20 женщин с МФ. Рекомбинантный ФСГ - гонадотропин альфа использовался во всех применяемых схемах индукции суперовуляции.

В качестве триггера овуляции использовали хориогонадотропин альфа – в дозе 6500 МЕ. Оценка эффективности индукции овуляции осуществлялась в период с 3 по 14 день менструального цикла с применением трансвагинальной эхографии.

Образцы фолликулярной жидкости получали во время аспирации доминантных фолликулов, достигших диаметра 18-20 мм трансвагинальным доступом под контролем ультразвука с применением аппарата «Profocus – 2202». Параллельно проводился забор крови из вены. Образцы помещали в стерильные пластиковые пробирки и замораживали для последующего исследования.

Морфологическую оценку ооцитов в лаборатории осуществляли по состоянию внешнего вида полученных ооцит-кумулюс-комплексов: «прозрачности», размера и «степени разрыхления» клеток кумулюса и лучистого венца [14, 38, 62].

На эмбриологическом этапе ВРТ культивирование эмбрионов осуществлялось на средах COOK Medical (Австралия, США) в пластиковых планшетах фирмы Nunc (Дания), в специализированных инкубаторах Termoforma (США) и Sanyo (Япония) при концентрации CO<sub>2</sub> – 6%, температуре 37°C. Качество и морфологическое развитие эмбрионов осуществлялась ежедневно. Использовались критерии оценки развития бластоцист по классификации, предложенной Д.К. Гарднером (dr. D.K. Gardner) - при описании морфологии эмбрионов цифрами обозначалось количество бластомеров в эмбрионе, буквами – особенности морфологии.

- Класс А – одинаковые симметричные бластомеры;
- Класс В – бластомеры разного размера с фрагментацией < 10%;
- Класс С – фрагментация от 10% до 50%;
- Класс D – фрагментация > 50% или наличие пронуклеарного одноклеточного эмбриона.

Эмбрионы класса А оценивались как высокого качества, классов В, С – среднего качества и класса D – низкого качества [38].

Критерии отбора эмбрионов для переноса: если на 3 сутки развития более 60% эмбрионов высокого качества, то их культивируют до 5 суток. К 5 суткам остаются около 30 % эмбрионов, 70% в результате естественного отбора погибают. При переносе эмбрионов используются катетеры Wallace производства компании Smiths Medical International (США), которые считаются золотым стандартом катетеров для эмбриопереноса [33].

Посттрансферная поддержка проводилась с момента аспирации фолликулов и продолжалась в течение 12 дней после ПЭ микронизированным прогестероном в дозе 600 мг в сутки трансвагинально [40, 104].

Для определения содержания сосудистого эндотелиального фактора роста (СЭФР), растворимой формы молекулы PECAM-1 (sPECAM-1), эндотелина-1 использовали наборы для иммуноферментного анализа фирмы «BCM Diagnostics» (Германия), «Bender MedSystems» (Австрия) и «Biomedica

Gruppe» (Австрия) соответственно. Методика выполнялась согласно протоколу фирмы-производителя. Интерпретация результатов проводилась с учетом следующих параметров: содержание СЭФР в сыворотке крови и фолликулярной жидкости рассматривалось как нормальное при концентрации в среднем 270 пг/мл; sPESAM-1 - в среднем 62,3 нг/мл и для эндотелина-1 нормальное значение медианы составило 0,26 фмоль/мл.

Использовалась описательная статистика: частота в процентах, средняя арифметическая (M), стандартное отклонение (s). Методы непараметрической статистики: Манна-Уитни,  $\chi^2$ . Для оценки связи признаков применен корреляционный анализ с расчетом корреляции по методу Спирмена. Проводились расчеты множественной и логистической регрессий. При значении коэффициента корреляции  $|r| \geq 0,75$  связь между признаками оценивалась как сильная, при коэффициенте  $0,25 < |r| < 0,75$  – зависимость средней силы, при  $|r| \leq 0,25$  – слабая степень корреляции. Различия считали статистически значимым при  $p < 0,05$ .

### **2.3. Клиническая характеристика обследованных женщин**

Нами обследовано 158 пациенток с трубной и мужской формами бесплодия, которым проведено лечение методами вспомогательных репродуктивных технологий.

В основную группу вошли 122 пациентки с нарушениями проходимости и функциональной несостоятельностью маточных труб. Контрольную группу с мужским фактором бесплодия составили 36 супружеских пар. У мужчин из этих пар установлена различная патология сперматозоидов – идиопатическая патозооспермия в виде астенозооспермии и олигозооспермии.

При изучении возрастных характеристик пациенток исследуемых групп нами установлено, что средний возраст женщин в группе с ТФ составил  $34,3 \pm 0,4$  года, а в контрольной группе с МФ -  $32,8 \pm 0,8$  лет и не имел достоверных различий (табл.1). В группе ТФ 44,3% (54) находились в

старшем репродуктивного возрасте, в то время как в контрольной группе МФ – 25% (9).

Таблица 1.

Распределение по возрасту пациенток исследуемых групп, абс./%.

Возраст	Клинические группы				Статистическая значимость различий
	ТФ n-122		МФ (группа контроля) n-36		
	Абс	%	Абс	%	
20-24 г	2	1,6	0	0	
25-29 лет	12	9,8	12	33,3	p<0,05
30-34 г	54	44,3	15	12,3	
35-39 лет	36	29,5	4	11,1	p<0,05
40-45 лет	18	14,8	5	13,9	

Исследуя брачный и социальный статус женщин нами выявлено, что большинство пациенток во всех группах находились в зарегистрированном браке. Большинство пациенток в группе с ТФ находились в первом браке, в то время как в контрольной группе – во втором (табл.2).

Таблица 2.

Брачный статус исследуемых групп, абс./%.

Брак	Клинические группы				Статистическая значимость различий
	ТФ n-122		МФ (группа контроля) n-36		
	абс	%	абс	%	
Первый брак	73	63,5	16	45,7	
Повторный брак	42	36,5	9	54,3	
Брак зарегистрирован	88	76,5	18	51,4	p<0,05
Брак не зарегистрирован	7	3,5		8,6	p<0,05

Одинокая	7	5,7	1	2,8	
----------	---	-----	---	-----	--

Подавляющее количество женщин во всех группах имели высшее образование, что составило в группе с ТФ - 63,9% (78), а в контрольной группе с МФ - 69,4% (25), и принадлежали к категории служащих (табл.3).

Таблица 3.

Социальный статус исследуемых групп, абс/‰.

Признак	Клинические группы				Статистическая значимость различий
	ТФ n-122		МФ (группа контроля) n-36		
	абс	%	абс	%	
Служащая	82	67,2	18	50	
Рабочая	24	19,7	7	19,4	
Домохозяйка	13	10,7	7	19,4	
Учащаяся	3	2,5	4	11,1	p<0,05

В ходе исследования нами изучен ряд показателей, характеризующих репродуктивное здоровье пациенток, а именно характер менструальной функции. Средний возраст наступления менархе был сопоставим между группами и составил в группе с ТФ -  $13,3 \pm 0,1$  года, а в группе с МФ -  $12,9 \pm 0,2$  года. Средняя длительность менструального цикла составила для группы с ТФ -  $28,9 \pm 0,4$  дня, с МФ -  $28,4 \pm 0,3$  дня, что также не имело достоверных различий. Средняя длительность менструальной кровопотери также была сопоставима между группами и составила для ТФ -  $5 \pm 0,1$  дня, а для контрольной группы с МФ -  $4,9 \pm 0,2$  дня. Данные показатели позволяют говорить о нормальных параметрах менструального цикла у данных пациенток. У большинства пациенток во всех исследуемых группах менструация протекала безболезненно. В группе с трубной формой бесплодия наблюдались межменструальные кровянистые выделения – 8,2%

(10), альгоменорея - 25,4% (31) и диспареуния – 5,7% (7). Данные нарушения у пациенток этой группы могут свидетельствовать о наличии воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ), которые занимают ведущее место среди факторов формирования трубного бесплодия [31].

При изучении форм и длительности бесплодия было выявлено, что в группе с ТФ превалировало вторичное бесплодие, что составило 74,6% (91) в то время как в контрольной группе большинство пациенток имели первичное бесплодие – 52,8% (19) (табл.4). Длительность бесплодия в исследуемых группах варьировала от 2 до 20 лет. Для женщин с трубной формой бесплодия она составила  $7,3 \pm 0,4$  года, тогда как среди пациенток с мужской формой длительность бесплодия составила  $6,1 \pm 0,7$  лет ( $p < 0,05$ ), что указывает на более раннее обращение за специализированной медицинской помощью данной категории супружеских пар.

Таблица 4.

Распределение пациенток исследуемых групп с учетом формы и длительности бесплодия, абс/%,  $M \pm s$ .

Форма бесплодия и длительность	Клинические группы				Статистическая значимость различий
	ТФ n-122		МФ (группа контроля) n-36		
	абс	%	абс	%	
Первичное бесплодие	31	25,4	19	52,8	$p < 0,05$
Вторичное бесплодие	91	74,6	17	47,2	$p < 0,05$
Средняя длительность бесплодия	$7,3 \pm 0,4$		$6,1 \pm 0,7$		$p < 0,05$



В группе с трубной формой бесплодия пациентки с соматическими заболеваниями встречались в 41% (50) случаев, а в контрольной группе с мужским фактором бесплодия – в 38,9% (14). Структура соматической патологии у пациенток исследуемых групп представлена в табл. 5.

Таблица 5.

Структура соматической патологии у женщин исследуемых групп,  
абс./%,  $M \pm s$ .

Нозологические группы	Клиническая группа		МФ (группа контроля)		Статистическая значимость различий
	ТФ n-50		n-14		
	Абс	%	Абс	%	
Заболевания дыхательной системы	2	4	0	0	
Заболевания органов кровообращения	18	36	3	21,4	
Заболевания гепатобилиарной системы	24	48	3	21,4	
Заболевания почек и мочевых путей	9	18	0	0	
Заболевания органов эндокринной системы	12	24	1	7,1	
Другие заболевания	4	8	3	21,4	
Средняя частота встречаемости соматических заболеваний на одну пациентку	$1,4 \pm 0,03$		$0,7 \pm 0,05$		$p < 0,05$

В группах с трубной и мужской формами бесплодия наиболее часто встречались заболевания гепато-билиарной системы (хронический гастрит, хронический холецистит), которые составили 48% (24) и 21,4% (3) соответственно. Данные соматические заболевания находились в состоянии стойкой ремиссии и не являлись противопоказанием к проведению ЭКО.

Женщины контрольной группы имели самую низкую среднюю частоту встречаемости экстрагенитальной патологии, которая составила  $0,7 \pm 0,05$  из расчета на одну пациентку.

При изучении репродуктивных характеристик пациенток исследуемых групп мы оценивали: средний возраст сексуального дебюта, первой беременности, первых родов, среднее число беременностей на одну пациентку. Нами было выявлено, что между группами по данным признакам не было выявлено достоверных различий (табл. 6).

Таблица 6.

Репродуктивные характеристики женщин исследуемых групп,  $M \pm s$ .

Параметры	Клинические группы		Статистическая значимость различий
	ТФ n-122	МФ (группа контроля) n-36	
Средний возраст сексуального дебюта	$18,3 \pm 0,2$	$18,4 \pm 0,4$	$p > 0,05$
Средний возраст первой беременности	$22,8 \pm 0,6$	$22,9 \pm 1,3$	
Средний возраст первых родов	$23,1 \pm 0,3$	$23,5 \pm 1,4$	
Среднее число беременностей на 1 пациентку	$2,4 \pm 0,02$	$2,4 \pm 0,1$	

Изучение гинекологического анамнеза исследуемых групп показало, что в группе с ТФ достоверно чаще в 30,3% (37) случаев у пациенток имелись эктопические беременности, послужившие основанием для удаления маточных труб ( $p < 0,05$ ). Доля женщин этой группы, у которых первая беременность закончилась искусственным прерыванием до 12 недель, составила 33% (30), спонтанным самопроизвольным выкидышем – 11% (10) и в 15,4% (14) случаев наблюдалась замершая беременность. Срочными

родами первая беременность закончилась у 36,3% (33) пациенток из этой группы, что достоверно меньше, чем в группе с МФ ( $p < 0,05$ ).

Анализ гинекологического анамнеза проводился у пациенток с вторичным бесплодием, и в контрольной группе с МФ позволил установить, что в 64,7% (11) случаев первая беременность у пациенток данной группы закончилась срочными родами. Частота искусственных абортов составила 47,1% (8). Доля пациенток в группе с МФ бесплодия с неразвивающейся беременностью в анамнезе составила 11,8% (2). Самопроизвольных выкидышей у них не наблюдалось (табл.7).

Таблица 7.

Гинекологический анамнез пациенток исследуемых групп, абс./%.

Исход беременности	Клинические группы				Статистическая значимость различий
	ГФ n-91		МФ (группа контроля) n-17		
	абс	%	абс	%	
Срочные роды	33	36,3	11	64,7	$p < 0,05$
Преждевременные Роды	1	1,1	0	0	
Медицинский аборт	30	33,0	8	47,1	
Замершая беременность, в том числе анэмбриония	14	15,4	2	11,8	
Самопроизвольный выкидыш	10	11,0	0	0	
Внематочная беременность	37	40,7	0	0	$p < 0,05$

При изучении структуры гинекологических заболеваний нами была выявлена высокая частота нарушений со стороны репродуктивной системы среди пациенток с трубной формой бесплодия. Воспалительные заболевания органов малого таза с локализацией в придатках наблюдались в 41,8% (51) случаев, хронический эндометрит выявлен и морфологически подтвержден у 55 женщин, что составило 45,1% случаев (табл. 8). Данный факт являлся

одним из специфических факторов в развитии трубного бесплодия. На момент вступления пациенток в программы ВРТ хронический эндометрит был пролечен и излеченность гистологически подтверждена. В структуре прочих гинекологических заболеваний встречались: гиперпластические процессы эндометрия - в 19,7% (24) случаев, патология шейки матки (эктопия, эндоцервицит, эндоцервикоз) – в 16,4% (20) случаев.

Таким образом, частота встречаемости заболеваний репродуктивной системы у женщин с трубной формой бесплодия составила 1,5 на одну пациентку.

Таблица 8.

Структура гинекологических заболеваний у пациенток исследуемых групп, абс./%,  $M \pm s$ .

Нозологические группы	Клинические группы				Статистическая значимость различий
	ТФ n-122		МФ (группа контроля) n-36		
	абс	%	абс	%	
Доброкачественные заболевания шейки матки	20	16,4	15	41,7	$p < 0,05$
Доброкачественные новообразования яичников	25	20,5	3	8,3	$p < 0,05$
Воспаление придатков (аднексит)	51	41,8	2	5,6	$p < 0,05$
- Острый эндометрит	2	1,6	0	0	
-Хронический эндометрит	55	45,1	1	2,8	$p < 0,05$
Гиперпластические процессы эндометрия	24	19,7	0	0	$p < 0,05$
Среднее число нозологических форм на 1 женщину	$1,5 \pm 0,01$		$0,7 \pm 0,02$		$p < 0,05$

Частота гинекологических заболеваний в группе пациенток с мужским фактором бесплодия была низкой. Лишь в 5,6 % (2) случаев отмечались воспалительные заболевания половых органов, но проведенные диагностические мероприятия позволили исключить возможную непроходимость маточных труб.

При изучении инфекционных заболеваний в анамнезе у пациенток исследуемых групп нами было выявлено преобладание хламидийной 15,6% (19) и уреаплазменной 14,8% (18) инфекций в группе с ТФ бесплодия. Доля бактериального вагиноза составила 14,8% (18).

В контрольной группе с МФ бесплодия преобладали бактериальный вагиноз - 27,8% (10) и грибковая инфекция - 16,7% (6). Заболевания, передающиеся половым путем, диагностировались у них с общепопуляционной частотой и были пролечены до вступления в программу ЭКО (табл.9).

Таблица 9.

Инфекционные заболевания в анамнезе женщин исследуемых групп, абс./%, M±s.

Нозологические группы	Клинические группы				Статистическая значимость различий
	ТФ n-122		МФ (группа контроля) n-36		
	абс	%	абс	%	
Хламидии	19	15,6	4	11,1	
Уреаплазмы	18	14,8	3	8,3	
Микоплазмы	3	2,5	0	0	
Гонококки	3	2,5	0	0	
Сифилис	5	4,1	0	0	
ВПЧ	14	11,5	1	2,8	
Герпес	2	1,6	0	0	
Трихомонады	12	9,8	0	0	
ЦМВИ	1	0,8	0	0	
Грибы	10	8,2	6	16,7	

Бактериальный вагиноз	18	14,8	10	27,8	
Среднее число назологических форм на 1 женщину	0,9±0,007		0,7±0,02		p<0,05

Структура оперативных вмешательств в исследуемых группах представлена в таблице 10.

Таблица 10.

Структура оперативных вмешательств в группах с трубной и мужской формами бесплодия, абс./%.

Вид оперативного вмешательства	ТФ n-122		МФ n-36		Статистическая значимость различий
	Абс	%	Абс	%	
Лапароскопия (впервые)	98	80,3	5	13,9	p<0,05
Лапароскопия (повторно)	19	15,6	0	0	p<0,05
Лапаротомия (впервые)	28	22,9	0	0	p<0,05
Лапаротомия (повторно)	11	9,0	0	0	
Деструкция шейки матки, конизация шейки матки (впервые)	22	18,0	7	19,4	
Деструкция шейки матки, конизация шейки матки (повторно)	5	4,1	0	0	
Аппендэктомия	13	10,7	2	5,6	
Перитонит	1	0,8	0	0	
Холецистэктомия	3	2,5	0	0	
Тубэктомия (впервые)	37	30,3	0	0	p<0,05
Тубэктомия (повторно)	19	15,6	0	0	p<0,05
Аднексэктомия	8	6,6	0	0	
Операции на яичниках(ушивание, резекция, энуклеация)	15	12,3	0	0	p<0,02
Удаление плодного яйца с пластикой трубы	5	4,1	0	0	
Диагностическое вмешательство (Сальпингоовариолизис, сальпингостомия, адгезиолизис) (впервые)	32	26,2	0	0	p<0,05
Диагностическое вмешательство (Сальпингоовариолизис,	3	2,5	0	0	

сальпингостомия, адгезиолизис) (повторно)					
Гистероскопия	91	75,0	11	30,6	
Кесарево сечение	4	3,3	0	0	

В группе с трубной формой бесплодия изучение структуры оперативных вмешательств позволило выявить основные причины поражения маточных труб, сопровождающегося спаечным процессом в малом тазу и являющегося причиной формирования трубного бесплодия наряду с перенесенными ранее воспалительными заболеваниями органов малого таза. Треть пациенток имели в анамнезе тубэктомии. С целью лечения трубного бесплодия в 80,3% (98) случаях пациенткам проводилась диагностическая и лечебная лапароскопия, позволяющая частично восстановить репродуктивную функцию. Кроме того, в 26,2% (32) случаях пациентки имели в анамнезе реконструктивно-пластические операции на маточных трубах (сальпингоовариолизис, сальпингостомия, адгезиолизис) и у 2,5% (3) проводились повторные операции. У 22,9% (28) пациенток перенесенная по разным причинам лапаротомия вероятно явилась фактором окклюзии маточных труб вследствие перенесенного послеоперационного спаечного процесса. Количество оперативных вмешательств на каждую женщину составляло 2,6. В контрольной группе с мужским фактором бесплодия у трети пациенток в 30,6% (11) случаях проводилась гистероскопия, и в 13,9% (5) лапароскопия. Данные вмешательства проводились с диагностической целью для установления причины и характера бесплодия.

## РЕЗЮМЕ

Таким образом, при исследовании клинической характеристики пациенток с трубной и мужской формами бесплодия, нами выявлена высокая доля женщин старшего репродуктивного возраста в группе с трубной формой бесплодия. Это говорит с одной стороны о поздней

обращаемости пациенток за специализированной медицинской помощью по поводу бесплодия, с другой - о длительном неэффективном лечении существующей проблемы. Женщины имеют высокий социальный статус и стабильный доход. Параметры менструального цикла нормальные, но у пациенток с трубной формой бесплодия имеются нарушения, свидетельствующие о наличии воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ), которые и являются специфическим фактором формирования данной формы бесплодия. Вторичное бесплодие превалирует в группе с трубной формой бесплодия, в то время как первичное - в группе с бесплодием, обусловленным мужским фактором. Доля распространенности соматических заболеваний довольно велика в группе с трубной формой бесплодия, однако данные заболевания не влияли на репродуктивную функцию. Пациентки с трубной формой бесплодия имели отягощенный акушерский и гинекологический анамнез. У женщин в группе с трубной формой бесплодия отмечена высокая частота оперативных вмешательств на органах малого таза. Частота выявления гинекологической патологии у пациенток с трубной формой бесплодия была достаточно высока. У этих женщин чаще наблюдались воспалительные заболевания органов малого таза с превалированием хламидийной и уреоплазменной инфекции. Изучение клинической характеристики женщин с трубной формой бесплодия показало низкий уровень как репродуктивного, так и соматического здоровья, однако имеющиеся экстрагенитальные заболевания на момент вступления женщины в программу ЭКО были пролечены и находились в стадии ремиссии.



## ГЛАВА III

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У ЖЕНЩИН С ТРУБНОЙ И МУЖСКОЙ ФОРМАМИ БЕСПЛОДИЯ

#### 3.1. Значение выбора овариального резерва при прогнозировании исходов программ ВРТ.

Нами была проведена оценка овариального резерва у пациенток исследуемых групп. Поскольку одним из важных факторов прогнозирования ответа на стимуляцию функции яичников являются гормональные тесты, мы оценивали уровень гонадотропных и стероидных гормонов в нашем исследовании на 2-3 день менструального цикла и, как видно из табл. 11, при анализе результатов статистически значимых различий между группами не было ( $p > 0,05$ ). Уровень ФСГ у всех пациенток находился в пределах до 8 МЕ/л, что является нормой и предполагает наличие хорошего ответа на стимуляцию суперовуляции. Уровень эстрадиола у всех пациенток находился в пределах 80 пг/мл. Таким образом, мы выявили, что у 100% женщин исследуемых групп овариальные резервы были сохранены [41].

Таблица 11.

Уровни стероидных и гонадотропных гормонов в крови женщин  
исследуемых групп,  $M \pm s$ .

Гормоны	ФСГ (МЕ/л)	ЛГ (МЕ/л)	Пролактин (мМЕ/л)	Эстрадиол (пг/мл)	Статистическая значимость различий
Группа бесплодия					
ТФ (n=122)	7,7±0,3	5,9±0,3	317,6±10,4	69,7±6,5	$p > 0,05$
МФ (n=36)	7,0±0,5	5,5±0,4	345,8±22,4	56,4±7	$p > 0,05$

При прогнозировании ответа на стимуляцию функции яичников специалист ориентируется на число антральных фолликулов до 10 мм в диаметре на 2-3 день цикла. Если число антральных фолликулов на 2-3-й день цикла меньше 5 в каждом яичнике, то это указывает на сниженный овариальный резерв. Если в яичнике визуализируется один фолликул или их вообще не видно, то, скорее всего, такой яичник не ответит на экзогенную стимуляцию [6, 19, 41, 92, 130].

В нашем исследовании число антральных фолликулов на 2-3-й день цикла составило для группы с трубной формой бесплодия  $8,0 \pm 1,1$  и для группы с мужским фактором бесплодия  $8,5 \pm 1,3$ . Полученные результаты также свидетельствуют о наличии хороших овариальных резервов у пациенток исследуемых групп.

При проведении стимуляции суперовуляции выделяют несколько вариантов ответа яичника: низкий ответ (до 3 фолликулов), умеренный ответ (4-10 фолликулов) и выраженный ответ (более 10 фолликулов).

Овариальный ответ яичников на проводимую индукцию суперовуляции в группах с трубной формой и в контрольной группе нами оценивался как умеренный и выраженный, что, однако, не имело статистически значимых различий (табл.12).

Таблица 12.

Овариальный ответ на индукцию овуляции в исследуемых группах,  
абс./%.

Параметр	ТФ n=122		МФ n=36	
	Абс	%	Абс	%
Низкий ответ яичников (до 3 фолликулов)	27	$22,1 \pm 3,8$	5	$13,9 \pm 5,8$
Умеренный ответ яичников (4-10 фолликулов)	57	$46,7 \pm 4,5$	15	$41,7 \pm 8,2$
Выраженный ответ яичников	38	$31,7 \pm 4,2$	16	$44,4 \pm 8,3$

(более 10 фолликулов)				
Статистическая значимость различий	p>0,05		p>0,05	

Таким образом, данные исследования свидетельствуют о необходимости индивидуального подхода к оценке овариального резерва и выбора схемы индукции суперовуляции во избежание специфических осложнений.

Нами были изучены варианты ответа яичников у пациенток с различными формами бесплодия при применении различных протоколов стимуляции суперовуляции. В группе с трубной формой бесплодия наиболее часто применялся протокол с ант-ГнРГ. Оценка длинного протокола с а-ГнРГ не производилась в связи с небольшим числом пациенток (3). При применении короткого протокола с а-ГнРГ чаще наблюдался выраженный ответ яичников 44% (20), тогда как при применении протокола с ант-ГнРГ статистически значимо чаще наблюдался умеренный ответ яичников 55% (40) (p<0,05) (табл.13).

Таблица 13.

Овариальный ответ при применении различных схем стимуляции суперовуляции в группе ТФ, абс./%.

Вариант ответа яичников	ТФ			
	Короткий с а-ГнРГ (n=46)		Протокол с ант-ГнРГ (n=73)	
	Абс	%	Абс	%
Низкий ответ яичников (до 3 фолликулов)	5	11	15	21
Умеренный ответ яичников (4-10 фолликулов)	21	46	40	55*
Выраженный ответ яичников (более 10 фолликулов)	20	44*	18	25
Статистическая значимость различий	* - статистическая значимость p<0,05, между протоколами стимуляции			

В контрольной группе с МФ чаще применялся короткий протокол с ант-ГнРГ. В расчетах не использовался длинный протокол а-ГнРГ в связи с небольшой группой пациенток (4). Статистически значимых различий между вариантами ответа яичника на применяемый протокол стимуляции суперовуляции выявлено не было (табл.14).

Таблица 14.

Овариальный ответ при применении различных схем стимуляции суперовуляции в группе МФ, абс./%.

Вариант ответа яичников	МФ			
	Короткий с а-ГнРГ (n=12)		Протокол с ант-ГнРГ (n=20)	
	Абс	%	Абс	%
Низкий ответ яичников (до 3 фолликулов)	3	25	2	10
Умеренный ответ яичников (4-10 фолликулов)	4	33,3	12	60
Выраженный ответ яичников (более 10 фолликулов)	5	41,7	6	30
Статистическая значимость различий	p>0,05			

Таким образом, выявлено, что во всех исследуемых группах наиболее часто применялся протокол с ант-ГнРГ, однако выраженный ответ яичников в группе с трубной формой бесплодия чаще наблюдался при применении короткого протокола с а-ГнРГ.

При изучении показателей имплантации в зависимости от овариального ответа на индукцию овуляции в исследуемых группах нами получены следующие результаты. В группе с ТФ при умеренном ответе яичников беременность (54%) случаев наступала чаще (p<0,05), чем при низком (15%) и выраженном (42%) ответах. При этом статистически

значимых отличий между низким и выраженным ответом яичников обнаружено не было. Аналогичная ситуация – беременность наступает в 30% (14) случаев равно как и не наступает в 32% (24) случаях (табл.15).

Таблица 15.

Показатели имплантации в зависимости от овариального ответа на индукцию суперовуляции в группе ТФ, абс./%.

Овариальный ответ на индукцию овуляции	ТФ n-122			
	Б+ (n=46)		Б-(n=76)	
	абс	%	абс	%
1. Низкий ответ яичников – до 3 фолликулов	7	15	20	26
2. Умеренный ответ яичников – от 4 до 10 фолликулов	25	54	32	42
3. Выраженный ответ яичников > 10 фолликулов	14	30	24	32
Статистическая значимость различий	p <sub>1,2</sub> <0,05 p <sub>2,3</sub> <0,05		p <sub>1,2</sub> <0,05	

Примечание. Различия рассчитаны по критерию  $\chi^2$ . для овариального ответа: 1. Низкий ответ яичников, 2. Умеренный ответ яичников, 3. Выраженный ответ яичников.

Полученные данные не имели статистически значимых различий.

В группе с МФ бесплодия беременность достоверно чаще наблюдалась при умеренном 35,7% (5) и выраженном 64,3% (9) ответах яичников ( $p < 0,05$ ). При низком ответе достоверно чаще наблюдалось отсутствие имплантации ( $p < 0,05$ ) (табл.16).

Таблица 16.

Овариальный ответ на индукцию суперовуляции в группе МФ в зависимости от показателей имплантации, абс./%.

Овариальный ответ на индукцию овуляции	МФ n-36			
	Б <sup>+</sup> (n=14)		Б <sup>-</sup> (n=22)	
	абс	%	абс	%
1. Низкий ответ яичников – до 3 фолликулов	0	0	4	18,2
2. Умеренный ответ яичников – от 4 до 10 фолликулов	5	35,7	10	45,5
3. Выраженный ответ яичников > 10 фолликулов	9	64,3	6	36,3
Статистическая значимость различий	p <sub>1,3</sub> <0,05		p <sub>1,2</sub> <0,05	

Примечание. Различия рассчитаны по критерию  $\chi^2$  для овариального ответа: 1. Низкий ответ яичников, 2. Умеренный ответ яичников, 3. Выраженный ответ яичников.

Однако, полученные данные в группе МФ равно как и в группе ТФ не имели статистически значимых различий.

Таким образом, частота имплантации не зависит от выраженности овариального ответа, что побудило нас к поиску маркеров эндотелиальной дисфункции, которая, вероятно, ограничивает имплантацию.

### **3.2. Оценка качества ооцитов и эмбрионов при трубной и мужской формах бесплодия.**

В нашем исследовании мы осуществляли стимуляцию суперовуляции с помощью длинного протокола с применением агонистов гонадотропин релизинг гормона (а-ГнРГ), короткого протокола с применением а-ГнРГ и протокола с применением антагонистов гонадотропин релизинг гормона (ант-ГнРГ).

При проведении контролируемой индукции суперовуляции применялся рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон (рФСГ) – фоллитропин альфа. С учетом нормальных параметров овариальных резервов пациенток исследуемых групп стартовая доза рФСГ не превышала 150-225 ЕД/сут, в каждом конкретном случае вопрос о величине начальной

дозы препарата решался индивидуально. Средняя доза рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ) – фоллитропина альфа на цикл стимуляции была одинаковой: в группе с трубной формой составила  $1222 \pm 36,62$  МЕ, в контрольной группе данный показатель составил  $1260,6 \pm 62,5$  МЕ. Используемые дозировки соответствовали стандартным схемам индукции овуляции [41].

Средняя продолжительность индукции овуляции не имела достоверных различий, была сопоставима между группами и составила  $8,3 \pm 0,2$  дня в группе с трубной формой бесплодия и  $8,2 \pm 0,4$  дня в контрольной группе. В нашем исследовании ооциты оценивались эмбриологом сразу же после аспирации. Эффективность применяемого протокола стимуляции суперовуляции оценивается качеством полученных ооцитов. В нашей работе мы оценивали качество ооцитов с учетом формы бесплодия и проведенного протокола стимуляции суперовуляции.

При изучении влияния протоколов индукции суперовуляции на качество ооцитов в группе с трубной формой бесплодия мы выявили, что наибольшее количество зрелых и наименьшее количество незрелых ооцитов получено при использовании наиболее часто применяемого в данной группе протокола с ант-ГнРГ ( $p < 0,05$ ). У женщин с мужским фактором бесплодия разницы между разными протоколами стимуляции суперовуляции выявлено не было, так количество зрелых и незрелых ооцитов было сопоставимо (табл.17).

Таблица 17.

Морфологическая оценка качества ооцитов в зависимости от схемы стимуляции суперовуляции (в расчете на одну пациентку) в исследуемых группах, n.

Исследуемая группа	Вариант протокола						Статистическая значимость различий
	1. Длинный протокол с а-ГнРГ (n=7)		2. Короткий протокол с а-ГнРГ (n=58)		3. Протокол с ант-ГнРГ (n=93)		
	Зрелые	Незрелые	Зрелые	Незрелые	Зрелые	Незрелые	
ТФ	6	3	9,6	4,3	13,3	3,1	$p_{2,3} < 0,05$
МФ	23,5	7,5	19,3	6,8	10,9	4,7	$p > 0,05$

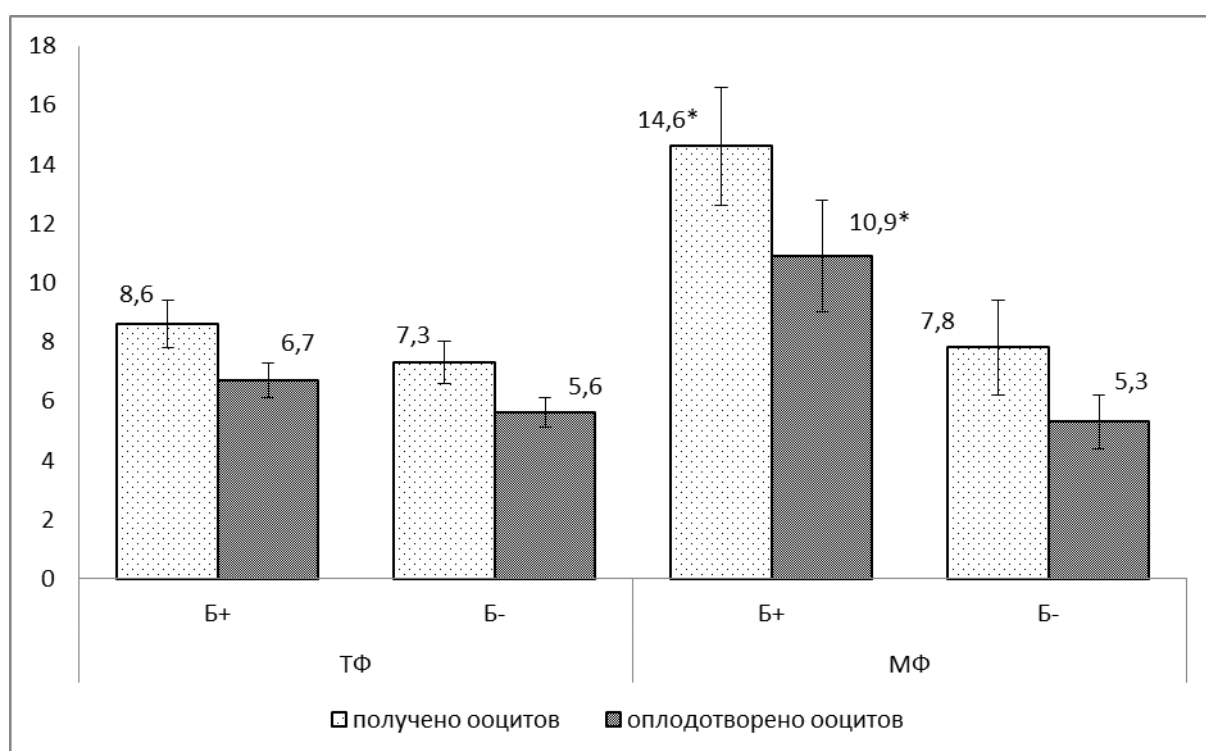
Примечание. Различия рассчитаны по критерию  $\chi^2$  для варианта протокола: 1. Длинный протокол с а-ГнРГ, 2. Короткий протокол с а-ГнРГ., 3. Протокол с ант-ГнРГ.

Выбор данного протокола в этой исследуемой группе можно считать наиболее приемлемым, учитывая наибольшую долю пациенток старшего репродуктивного возраста - 44,3% (54), по сравнению с контрольной группой, а также ожидаемый сниженный овариальный резерв и «бедный» ответ у пациенток, перенесших оперативные вмешательства на придатках матки. Одновременно мы показали, что при использовании протокола с ант-ГнРГ в группе с трубной формой бесплодия можно получить более качественные ооциты, поскольку ант-ГнРГ позволяют сохранить и пролонгировать до преовуляторного периода фолликулы, растущие на фоне введения ГТ, то есть создаются улучшенные условия для созревания преовуляторных ооцитов [23, 41].

При изучении качества ооцитов в зависимости от протокола стимуляции суперовуляции в группе с мужским фактором бесплодия нами выявлено, что наибольшее количество зрелых, равно как и незрелых ооцитов получено при использовании длинного протокола с а-ГнРГ (табл.17). Эти данные, однако, не имели статистически значимых различий.



При исследовании качества ооцитов в зависимости от показателей имплантации получены следующие результаты: всего получено 1264 ооцита от женщин исследуемых групп. От женщин с трубной формой всего получено 923 ооцита, в контрольной группе с мужским фактором бесплодия – 341. Незрелых ооцитов в группе с трубной формой бесплодия было получено 23,2%, а в контрольной группе с мужским фактором бесплодия – 29,6%. Оплодотворенных ооцитов при этом в группе с трубной формой было 76,8%, в контрольной группе с мужским фактором – 70,4%. На рисунке 2 представлено среднее количество полученных и оплодотворенных ооцитов при различных формах бесплодия.



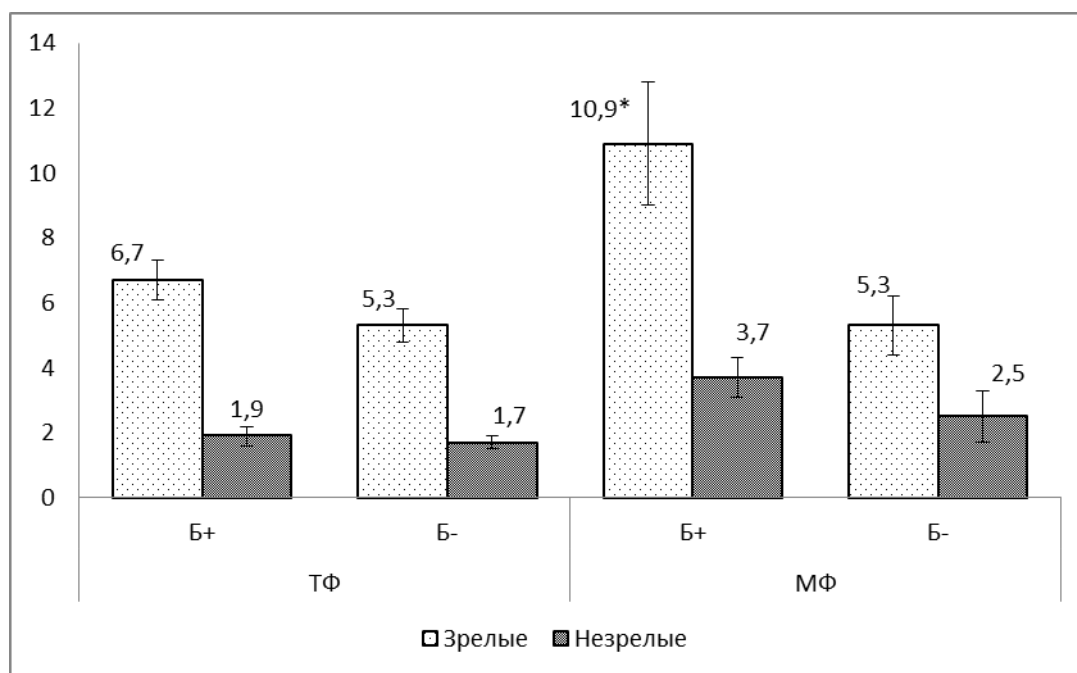
\* - статистическая значимость различий ( $p < 0,05$ ) при сравнении группы МФ (Б+) с другими группами (критерий Манна-Уитни).

Рис 2. Среднее количество полученных и оплодотворенных ооцитов в группах с трубной и мужской формами бесплодия.

При трубной форме бесплодия среднее количество полученных и оплодотворенных ооцитов в расчете на одну женщину в подгруппе  $B^+$  составило  $8,6 \pm 0,8$  и  $6,7 \pm 0,6$  соответственно, а в подгруппе  $B^-$   $7,3 \pm 0,7$  и  $5,6 \pm 0,5$  соответственно. В контрольной группе с мужским фактором бесплодия в подгруппе  $B^+$  составило  $14,6 \pm 2$  и  $10,9 \pm 1,9$  соответственно, а в подгруппе  $B^-$   $7,8 \pm 1,6$  и  $5,3 \pm 0,9$  соответственно.

При сравнении зрелости ооцитов и показателей имплантации в исследуемых группах было выявлено, что в группе с трубной формой бесплодия в подгруппе  $B^+$  получено зрелых ооцитов в расчете на одну женщину  $6,7 \pm 0,6$ , а незрелых  $1,9 \pm 0,3$ , в то время как в подгруппе  $B^-$  зрелых и незрелых ооцитов было получено  $5,3 \pm 0,5$  и  $1,7 \pm 0,2$  соответственно. В контрольной группе с мужской формой бесплодия в подгруппе  $B^+$  получено зрелых -  $10,9 \pm 1,9$ , незрелых -  $3,7 \pm 0,6$ , а в подгруппе  $B^-$  -  $5,3 \pm 0,9$  и  $2,5 \pm 0,8$  соответственно (рис.3).

В каждой группе количество зрелых ооцитов было выше у забеременевших женщин (в подгруппе  $B^+$ ), по сравнению с женщинами, не получившими беременность. В контрольной группе с мужским фактором бесплодия у забеременевших женщин (в подгруппе  $B^+$ ) количество зрелых ооцитов было статистически значимо больше по сравнению с группой пациенток с трубной формой бесплодия ( $p < 0,05$ ).



\*- статистическая значимость различий ( $p < 0,05$ ), сравнение подгрупп в группе МФ (критерий Манна-Уитни).

Рис 3. Зрелые и незрелые ооциты.

Нами выявлено, что независимо от формы бесплодия среднее количество незрелых ооцитов было примерно одинаково в исследуемых группах. В группе МФ (Б<sup>+</sup>) количество зрелых ооцитов было достоверно больше по сравнению с группой ТФ ( $p < 0,05$ ). При этом в каждой группе при Б<sup>+</sup> количество зрелых ооцитов было больше, чем при Б<sup>-</sup>.

После оплодотворения ооцитов не менее важным моментом в процедуре экстракорпорального оплодотворения является культивирование и развитие качественных эмбрионов, способных к имплантации. В нашем исследовании перенос эмбрионов осуществлялся на стадии бластоцисты, которая является наиболее поздней стадией развития зародыша человека, доступной для наблюдения врача-репродуктолога. Мы использовали критерии оценки развития бластоцист по классификации, предложенной Д.К. Гарднером. В нашей работе контроль за оплодотворением и последующим развитием эмбриона осуществлялся ежедневно. Проводилась оценка дробления, количества и морфологии бластомеров. Изучив качество

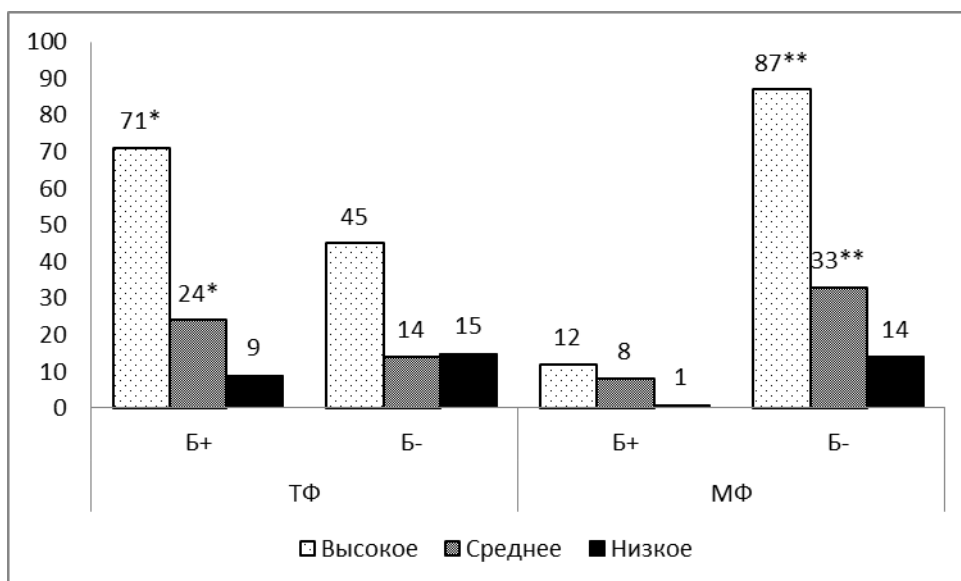
эмбрионов перед переносом, мы сопоставили его с показателями имплантации.

При исследовании качества эмбрионов в исследуемых группах получены следующие результаты: всего получено 328 эмбрионов. В группе с трубной формой бесплодия получено 256 эмбрионов, из них высокого качества - 45,3%, среднего – 43,4%, низкого – 11,3%. В контрольной группе с мужским фактором бесплодия получено 72 эмбриона, из них высокого качества – 36%, среднего – 56,9%, низкого – 6,9%.

Процент переносов в группе с трубной формой бесплодия составил 93, в контрольной группе с мужским фактором - 83. Причинами отказа от переноса эмбрионов являлись: синдром пустых фолликулов (СПФ), низкое качество ооцитов, синдром гиперстимулированных яичников (СГЯ), торможение пролиферативной активности эндометрия. Наиболее низкий процент переносов эмбрионов наблюдался в группе с мужским фактором бесплодия. В большинстве случаев – 50% (3) он был связан с низким качеством полученных ооцитов. В 33,3% (2) с развившимся СГЯ и в 16,7% (1) с торможением пролиферативной активности эндометрия. В группе с трубной формой бесплодия СГЯ являлся причиной отказа в 11,2% (1) случаев, и в равных соотношениях по 44,4% (4) встречались синдром пустых фолликулов и низкое качество полученных ооцитов.

Среднее количество эмбрионов на перенос в группах было примерно одинаковым и составило 2,3-2,4, при толщине эндометрия в группе с ТФ -  $9,6 \pm 0,1$  мм, в контрольной группе с МФ -  $10,7 \pm 0,3$  мм. Частота наступления беременности на эмбриоперенос в группе с трубной формой составила 39,3%, в контрольной группе с мужским фактором бесплодия – 45,2%. Несмотря на тенденцию более частых благоприятных исходов в группе МФ статистически значимых отличий в частоте наступления беременности между группами выявлено не было.

На рисунке 4 представлена оценка качества эмбрионов в абсолютных значениях.



\*- статистическая значимость различий ( $p < 0,05$ ) (критерий Манна-Уитни).

Рис.4. Оценка качества эмбрионов (абсолютные значения).

При сравнении внутри групп с учетом наступления беременности выявлено, что в группе с трубной формой бесплодия количество эмбрионов с высоким и средним качеством было выше у пациенток с наступившей беременностью в подгруппе Б<sup>+</sup>, чем с ее отсутствием в подгруппе Б<sup>-</sup> ( $p < 0,05$ ). В группе с мужской формой бесплодия наблюдалась противоположная ситуация и количество эмбрионов с высоким и средним качеством было выше у пациенток с отсутствием беременности в подгруппе Б<sup>-</sup> ( $p < 0,05$ ).

### **3.3. Влияние ответа яичников на качество ооцитов и эмбрионов, возможность прогнозирования эффективности программ ВРТ.**

При исследовании наступления беременности в зависимости от схемы индукции суперовуляции нами выявлено, что наибольший процент беременностей – 57,1% (8) получен в группе с МФ бесплодия при применении протокола с ант-ГнРГ. В группе с ТФ бесплодия наибольший процент беременностей 54,3% (25) аналогично наблюдался при применении протокола с ант-ГнРГ. Данные результаты, однако, не имели статистически

значимых различий и не могут указывать на преимущества того или иного протокола для успешного наступления беременности (табл.18).

Таблица 18.

Наступление беременности в зависимости от схемы индукции суперовуляции, абс./%.

	ТФ, n=46		МФ, n=14	
	абс	%	абс	%
Длинный протокол с а-ГнРГ	0	0	2	14,3
Короткий протокол с а-ГнРГ	21	45,7	4	28,6
Протокол с ант-ГнРГ	25	54,3	8	57,1
Статистическая значимость различий	p>0,05		p>0,05	

Нами была изучена взаимосвязь между качеством полученных ооцитов и качеством эмбрионов в исследуемых группах в зависимости от ответа яичников. Проведя корреляционный анализ, мы не выявили связи. Это свидетельствует о том, что вследствие сложных механизмов, связанных с созреванием ооцита, маловероятно, что единственная особенность (за исключением размера ооцита) может отразить качество клетки. Известно, что характер развития ооцитов в растущем пуле фолликулов в значительной мере определяется составом жидкости антральной полости, следовательно, чтобы получить информацию о компетентности ооцита, морфологическая оценка должна быть объединена с другими подходами (то есть оценка ооцита должна быть объединена с анализом его микроокружения. Оценка развития эмбриона перед переносом (проядерная стадия, стадия деления и стадия бластоцисты) также крайне важна, но и она, по мнению ряда авторов, весьма субъективна и не отвечает истинному состоянию клеточного материала [62].

При мужском факторе бесплодия обращает на себя внимание высокое качество полученных ооцитов в рамках индукции суперовуляции и более высокая частота встречаемости эмбрионов низкого качества (в 1,8 раз больше по сравнению с трубной формой бесплодия), что, вероятно, связано с патологией сперматозоидов, обуславливающей мужской фактор бесплодия [38].

Нами был проведен анализ зависимости качества эмбрионов от зрелости ооцитов и частоты имплантации в исследуемых группах (табл.19).

Таблица 19.

Корреляционный анализ между зрелыми ооцитами и качеством эмбрионов в зависимости от показателей имплантации в исследуемых группах.

Подгруппа Качество эмбрионов	Зрелые ооциты Б+(r)	Зрелые ооциты Б-(r)
Высокое	-0,35	-0,473
Среднее	0,32	0,5
Низкое	-0,071	-0,167

\*- статистическая значимость различий ( $p < 0,05$ ).

Положительная корреляционная взаимосвязь была выявлена при среднем качестве эмбрионов как при положительном ( $r=0,32$ ,  $p < 0,05$ ) так и при отрицательном ( $r=0,5$ ,  $p < 0,05$ ) исходе беременности. При высоком и низком качестве эмбрионов во всех группах вне зависимости от показателей имплантации выявлены отрицательные корреляционные связи. Полученные результаты свидетельствуют, что, несмотря на большое количество перенесенных эмбрионов высокого и среднего качества, имплантации может не наступить ввиду наличия определенных факторов, сдерживающих имплантацию. По нашим данным это может быть результатом проявления эндотелиальной дисфункции различной степени выраженности, наступившей на фоне стимуляции суперовуляции гонадотропинами.

## РЕЗЮМЕ

Таким образом, рациональное проведение стимуляции суперовуляции с учетом овариального резерва, формы бесплодия, возрастного фактора пациентки, позволяет получить достаточное количество зрелых ооцитов и качественных эмбрионов при трубной и мужской формах бесплодия.

Независимо от формы бесплодия среднее количество незрелых ооцитов в равных соотношениях встречается при трубной и мужской формах бесплодия. При переносе эмбрионов высокого и среднего качества, полученных при исследуемых формах бесплодия беременность наступает не во всех случаях, что свидетельствует о наличии факторов, сдерживающих имплантацию.

Процент наступления беременности на эмбриоперенос самый высокий в группе с мужским фактором, которую составляют пациентки без значимой патологии органов репродуктивной системы.



## ГЛАВА IV

### ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ИНДУЦИРОВАННЫХ ЦИКЛАХ

#### **4.1. Роль маркеров ангиогенеза (СЭФР) и эндотелиальной дисфункции (sPESAM-1) у пациенток с трубной и мужской формами бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).**

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (СЭФР) выступает как ключевой ангиогенный маркер и ему отводится значительная роль в регуляции фолликулярного ангиогенеза, кроме того, он способен инициировать данный процесс и пролиферацию клеток фолликула [11, 37, 135].

Изменение ангиогенеза включает широкий спектр нарушений на клеточно-молекулярном уровне, в основе которого лежит дисбаланс различных биологически активных веществ. Вмешательство в естественный ход реализации процесса фолликулогенеза в рамках индукции суперовуляции может приводить к массовой атрезии фолликулов и неполноценности ооцитов, полученных при пункции, и, следовательно, к неблагоприятному исходу ВРТ. Изменение состава фолликулярной жидкости в этих условиях позволяет прогнозировать качество полученного ооцита и имплантацию. Поэтому мы изучали содержание СЭФР в сыворотке крови и фолликулярной жидкости пациенток исследуемых групп.

Поскольку, будучи экспрессированным на клетках эндотелиальной, тромбоцитарной или лейкоцитарной природы, PESAM-1 участвует в регуляции трансэндотелиальной миграции лейкоцитов при воспалении, а также регуляции ангиогенеза, а при протеолитическом его отщеплении и появлении в растворимой форме в экстрацеллюлярном пространстве, sPESAM-1 маркирует собой повреждение клеток, в частности, эндотелия, мы определяли его содержание в сыворотке крови и фолликулярной жидкости пациенток исследуемых групп.

В нашем исследовании мы изучили возможные взаимосвязи между содержанием СЭФР и sPECAM-1 в фолликулярной жидкости и сыворотке крови методом корреляционного анализа (табл.20).

Таблица 20.

Корреляционные связи между уровнями СЭФР и sPECAM-1

Группа Среда	ТФ n=60		МФ n=17	
	r	p	r	p
Сыворотка крови	0,356	0,005	0,074	0,773
Фолликулярная жидкость	0,407	0,001	0,6	0,014

Выявлена прямая корреляционная связь средней силы между содержанием СЭФР и sPECAM-1 в биологических жидкостях во всех группах исследования, кроме МФ. Данные результаты указывают на то, что увеличение уровня sPECAM-1 в биологической жидкости может являться сигналом к увеличению продукции СЭФР, что запускает механизмы неоангиогенеза при эндотелиальной дисфункции.

#### 4.1.1. Клиническое значение определения уровня СЭФР в прогнозе имплантации эмбрионов в программах ВРТ.

У женщин с трубной формой бесплодия с наступившей беременностью средние значения СЭФР в сыворотке крови составили  $361,3 \pm 36$  пг/мл. У пациенток с отсутствием беременности уровни СЭФР в сыворотке крови составили  $572,6 \pm 58,2$  пг/мл. При этом показатели СЭФР в сыворотке крови были статистически значимо выше у женщин с отсутствием беременности ( $p < 0,05$ ).

У пациенток с мужской формой бесплодия при наступившей беременности уровень СЭФР в сыворотке крови находился в пределах  $388,5 \pm 103,2$  пг/мл, при отсутствии беременности -  $485,6 \pm 78,3$  пг/мл. При этом показатели СЭФР в сыворотке крови были сопоставимы.

На рисунке 5 представлено содержание СЭФР в сыворотке крови и фолликулярной жидкости женщин в исследуемых группах с учетом наступившей беременности.

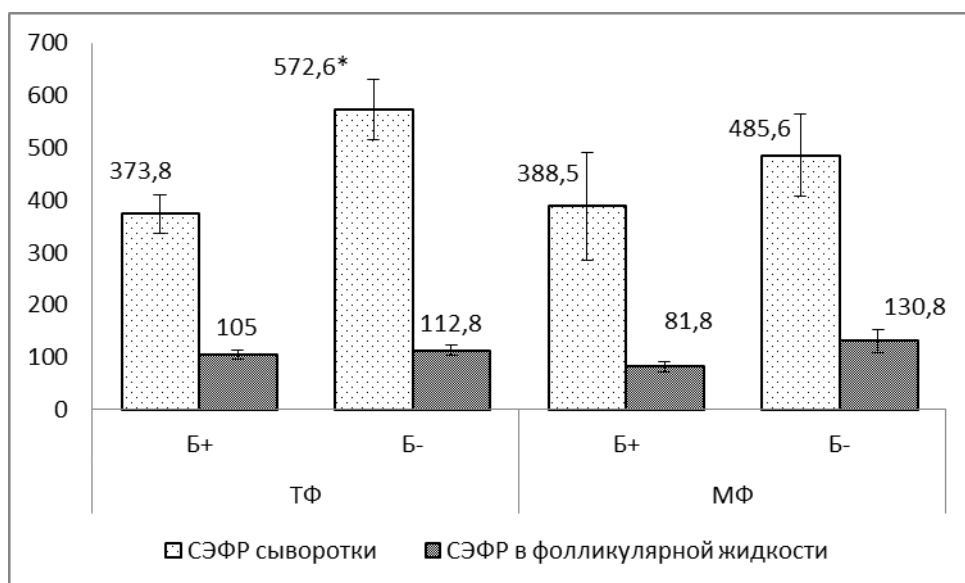


Рис. 5. Уровни сосудистого эндотелиального фактора роста (СЭФР) в фолликулярной жидкости (ФЖ) и сыворотке крови в исследуемых группах (пг/мл)

Примечание:\* -  $p < 0,01$  (сравнение подгрупп в группе с ТФ, критерий Манна-Уитни)

У женщин с трубной формой бесплодия уровень СЭФР в фолликулярной жидкости составил  $109,7 \pm 8,1$  пг/мл при наступлении беременности и  $112,8 \pm 9,9$  пг/мл при ее отсутствии. Данные показатели не имели статистически значимых различий.

У пациенток с трубной формой бесплодия процент наступления беременности на эмбриоперенос составил 39,3%. При этом у пациенток с отсутствием беременности отмечалось 1,5 – кратное увеличение содержания СЭФР в сыворотке крови в сравнении с женщинами, имеющими положительные результаты ( $p < 0,01$ ).

Дополнительно для всех женщин, включенных в исследование, были рассчитаны квартильные интервалы. За нормальные принимались значения, находящиеся в интервале между первым и третьим квартилями.

У женщин с трубной формой бесплодия с наступившей беременностью показатели СЭФР в сыворотке крови находились в интервале от 289 до 433 пг/мл. В то время как у пациенток с отсутствием беременности значения находились в интервале 456-688 пг/мл.

Таким образом, у пациенток с трубной формой бесплодия высокое содержание СЭФР в сыворотке крови является неблагоприятным прогностическим фактором для имплантации. При превышении показателя более 433 пг/мл в сыворотке крови требуется проведение коррекции патологического ангиогенеза для улучшения исходов программ ВРТ.

Для более корректной трактовки полученных результатов нами проведен многофакторный анализ, а именно применены методы множественной и логистической регрессии. В число предикторов неблагоприятного результата программ ВРТ включены трубный и мужской факторы бесплодия, применяемые протоколы стимуляции суперовуляции, исследуемые маркеры ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции (СЭФР, sPECAM-1, эндотелин-1), содержащиеся в сыворотке крови и фолликулярной жидкости (табл. 21).

Таблица 21.

Показатели множественной регрессии для исходов программ ВРТ в группе ТФ.

Предиктор исхода программ ВРТ	p
Вариант протокола	0,727
<b>СЭФР в сыворотке крови</b>	<b>0,007</b>
СЭФР в фолликулярной жидкости	0,536
Эндотелин-1 в сыворотке крови	0,697
Эндотелин-1 в фолликулярной жидкости	0,223
sPECAM-1 в сыворотке крови	0,218
sPECAM-1 в фолликулярной жидкости	0,567

жидкости	
----------	--

При проведении анализа логистической регрессии влияния уровня СЭФР в сыворотке крови на наступление беременности у женщин с трубной формой бесплодия установлено значимое его влияние на имплантацию эмбрионов ( $p = 0,02$ ). Модель логистической регрессии в группе ТФ влияния уровня СЭФР в сыворотке крови на наступление беременности представлен на рисунке 6.

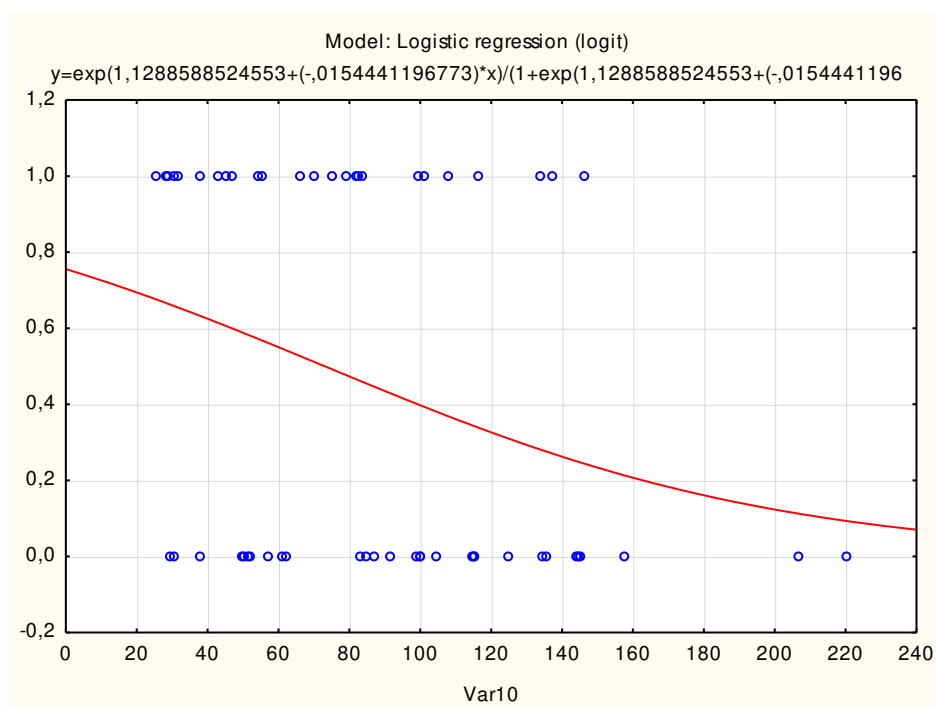


Рис. 6. Модель логистической регрессии в группе ТФ. Влияние уровня СЭФР в сыворотке крови на наступление беременности.

В то же время у пациенток с трубной формой бесплодия проведение анализа логистической регрессии для уровней СЭФР в фолликулярной жидкости статистически значимого влияния не выявило в отличие от контрольной группы пациенток с мужским фактором бесплодия, в которой уровень СЭФР в фолликулярной жидкости оказывал значимое положительное влияние на имплантацию ( $p=0,036$ ) (рис.7).

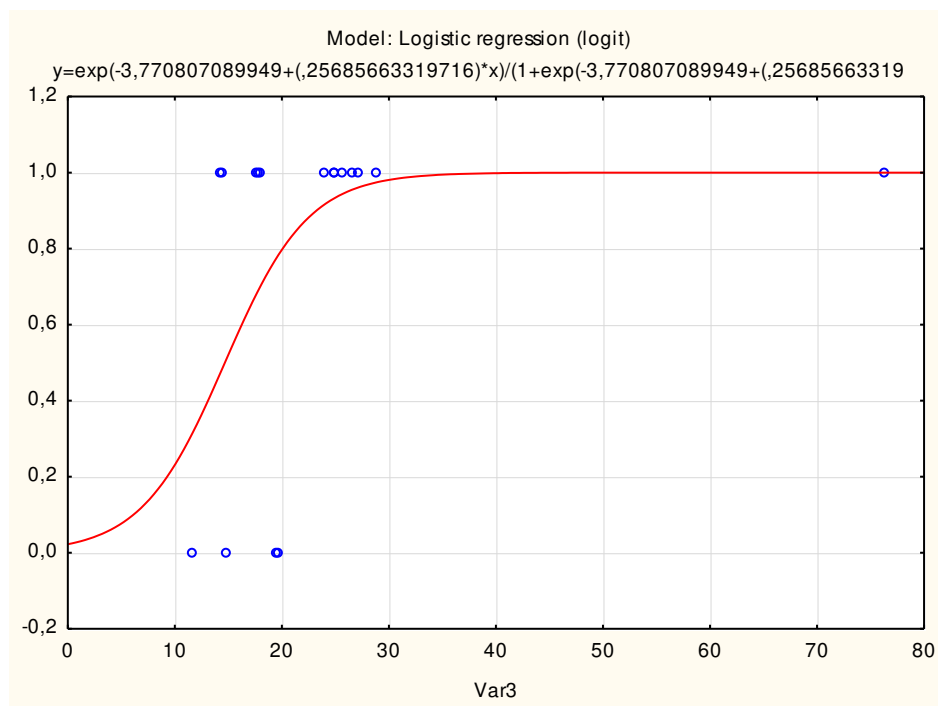


Рис. 7. Модель логистической регрессии в группе МФ влияния уровня СЭФР в фолликулярной жидкости на наступление беременности.

Таким образом, СЭФР в сыворотке крови у пациенток с трубной формой бесплодия может являться значимым предиктором нарушений имплантации.

#### 4.1.2. Роль sPECAM-1 в контексте прогноза имплантации у женщин с трубной и мужской формами бесплодия в программах ВРТ.

Не менее важным моментом, чем ангиогенез, является формирование межклеточных контактов - адгезия клеток, которая играет важную роль на всех этапах репродуктивного цикла (оплодотворение, имплантация, плацентация и др.). Она осуществляется с участием молекул клеточной адгезии. Изменение содержания адгезивных молекул в том числе sPECAM в сыворотке крови может являться дополнительным маркером эндотелиальной дисфункции, так как они отражают процесс активации эндотелиоцитов. В нашем исследовании мы оценили содержание sPECAM-1 в сыворотке крови и фолликулярной жидкости, полученных у женщин, находящихся в циклах индукции суперовуляции в программах ВРТ, при которых происходит рост

большого числа фолликулов, сопровождающийся выраженными гормональными изменениями в организме женщины (рис. 8).

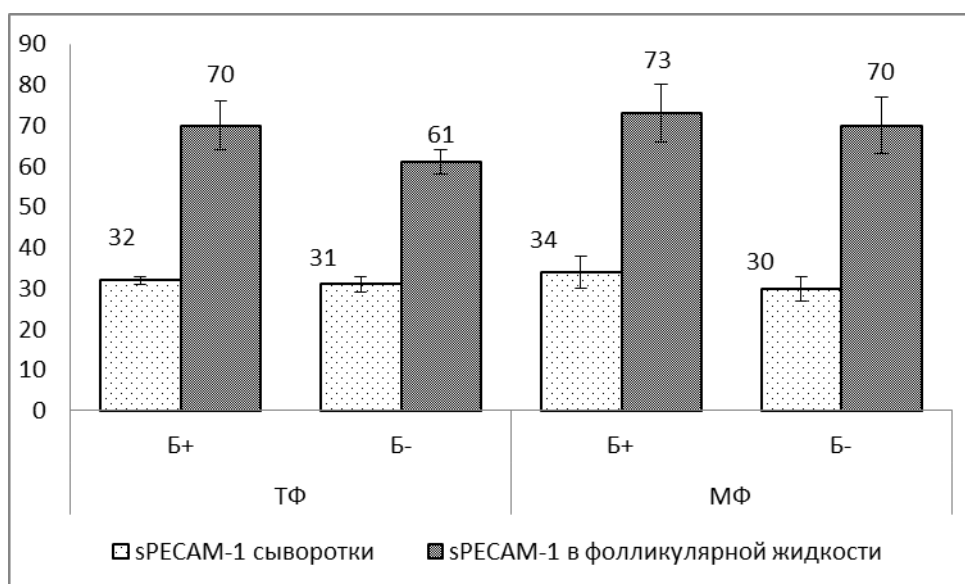


Рис. 8. Уровни sPESAM-1 в фолликулярной жидкости (ФЖ) и сыворотке крови в исследуемых группах (нг/мл).

Для пациенток с трубной формой бесплодия с наступившей беременностью уровень sPESAM-1 в сыворотке крови составлял  $32 \pm 0,1$  нг/мл, а при отсутствии беременности -  $31 \pm 0,2$  нг/мл, в то время как в фолликулярной жидкости при положительном исходе –  $70 \pm 0,6$  нг/мл, а при отрицательном -  $61 \pm 0,3$  нг/мл. Данные показатели статистически не значимы.

Вмешательство в естественный ход процесса фолликулогенеза приводит к значительному увеличению уровня эстрадиола в фолликулярной жидкости, который оказывает влияние на сосудистую пролиферацию и ангиогенез. Вероятно поэтому, выявленные нами уровни sPESAM-1 в фолликулярной жидкости, полученной в перивуляторный период, в 2 раза выше его концентрации в сыворотке крови во всех исследуемых группах, независимо от формы бесплодия, однако различий в показателях sPESAM-1 в исследуемых подгруппах как в сыворотке, так и в фолликулярной жидкости не обнаружено.

Таким образом, sPESAM-1 не может являться индикатором патологического фолликулогенеза в программах ВРТ, однако он маркирует ответ эндотелия сосудов яичника на само применение гонадотропинов.

#### **4.2. Влияние маркера эндотелиальной дисфункции эндотелина-1 у пациенток с трубной и мужской формами бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).**

Яичниковый ангиогенез обеспечивает основные функции половой железы женщины - фолликулогенез и стероидогенез, определяющие формирование, селекцию и развитие полноценного доминантного фолликула. Однако характер ангиогенеза является не единственным параметром, определяющим состояние кровоснабжения фолликула на каждой отдельной стадии развития, поскольку во многом этот процесс зависит также от свойств эндотелия и баланса эндотелиальных факторов, контролирующих тонус сосудов [37, 76].

Нами изучено содержание эндотелина-1 в сыворотке крови и фолликулярной жидкости пациенток исследуемых групп, поскольку увеличение его концентрации можно использовать в качестве маркеров патологических процессов в организме человека, а именно нарушений имплантации. Эндотелин-1 является мощным вазоконстриктором, его появление в крови в увеличенном количестве является маркером дисфункции эндотелия.

На рисунке 9 представлены данные об уровне эндотелина-1 в сыворотке крови и фолликулярной жидкости женщин в исследуемых группах с учетом наступившей беременности.



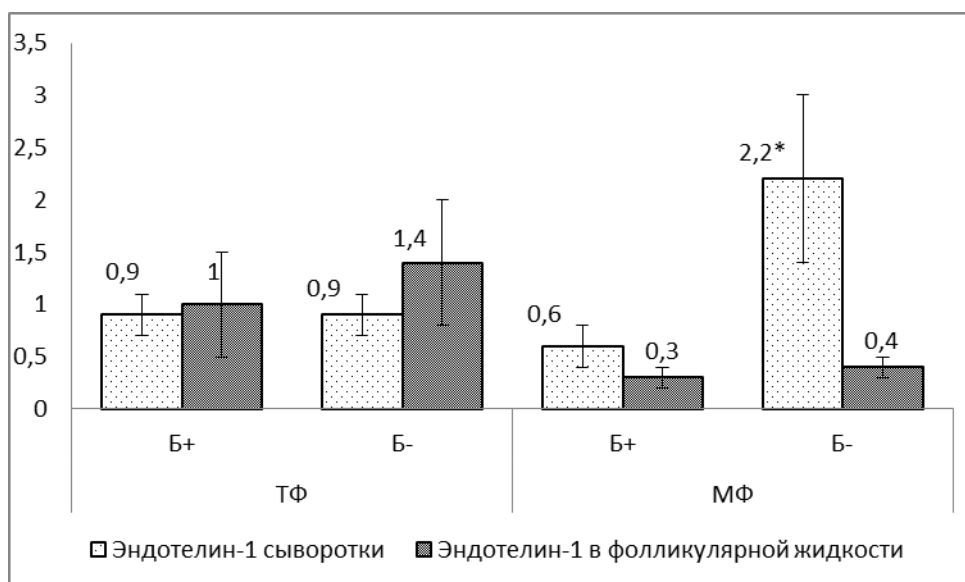


Рис.9. Уровни эндотелина-1 в фолликулярной жидкости и сыворотке крови в исследуемых группах (фмоль/мл)

Примечание: \*-  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни)

У женщин с мужской формой бесплодия с наступившей беременностью содержание эндотелина-1 в сыворотке крови составило  $0,6 \pm 0,2$  фмоль/мл. В то время как у пациенток с отсутствием беременности среднее значение составило  $1,8 \pm 0,8$  фмоль/мл. При этом уровни эндотелина-1 в сыворотке крови при отсутствии беременности статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ). В фолликулярной жидкости уровни эндотелина-1 составили при наступлении беременности  $0,5 \pm 0,2$  фмоль/мл, а при отсутствии -  $0,4 \pm 0,1$  фмоль/мл и не имели достоверных различий.

Дополнительно для всех женщин, включенных в исследование, были рассчитаны квартильные интервалы. За нормальные принимались значения, находящиеся в интервале между первым и третьим квартилями.

У женщин с мужской формой бесплодия с наступившей беременностью показатели эндотелина-1 в сыворотке крови находились в интервале от 0,2-1,0 фмоль/мл. В то время как у пациенток с отсутствием беременности значения находились в интервале 1,0-3,4 фмоль/мл.

Таким образом, можно предположить, что эндотелиальная дисфункция, развившаяся у женщин без значимой патологии органов

репродуктивной системы в сочетании с мужским фактором бесплодия, негативно сказывается на процессе имплантации эмбриона в программах ВРТ. У пациенток с мужским фактором бесплодия высокое содержание эндотелина-1 в сыворотке крови является неблагоприятным прогностическим фактором для имплантации. При превышении показателя более 1,0 фмоль/мл в сыворотке крови требуется проведение коррекции эндотелиальной дисфункции для улучшения исходов программ ВРТ.

#### 4.3. Стимулирующее влияние эндотелина-1 на СЭФР, полученных от пациенток с трубной и мужской формами бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Мы исследовали корреляционную взаимосвязь между СЭФР и эндотелином-1, содержащихся в сыворотке крови и фолликулярной жидкости пациенток с трубной и мужской формами бесплодия, получающих лечение методами ВРТ. При изучении корреляционных связей между уровнями СЭФР и эндотелина-1 в фолликулярной жидкости и сыворотке крови нами выявлена корреляционная связь средней силы 0,32 ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о том, что при повышении уровня эндотелина-1 в сыворотке крови происходит и его увеличение в фолликулярной жидкости (табл.22).

Таблица 22.

Корреляционные связи между уровнями СЭФР и эндотелина-1 в сыворотке крови (Сыв) и фолликулярной жидкости (ФЖ) в группе ТФ

ТФ					
Маркер	Биологическая среда	СЭФР		Эндотелин-1	
		Сыв	ФЖ	Сыв	ФЖ
СЭФР	Сыв	1,00	-0,20	0,15	0,06
	ФЖ	-0,20	1,00	-0,17	-0,16
Эндотелин-1	Сыв	0,15	-0,17	1,00	0,32*
	ФЖ	0,06	-0,16	0,32*	1,00

Статистически значимые различия	* - $p < 0,05$
---------------------------------	----------------

В группе с мужским фактором бесплодия корреляционных взаимосвязей между уровнями СЭФР и эндотелина-1 в сыворотке крови и фолликулярной жидкости выявлено не было (табл. 23).

Таблица 23.

Корреляционные связи между уровнями СЭФР и эндотелина-1 в сыворотке крови (Сыв) и фолликулярной жидкости (ФЖ) в группе МФ

МФ					
		СЭФР		Эндотелин-1	
		Сыв	ФЖ	Сыв	ФЖ
СЭФР	Сыв	1,00	0,25	0,23	-0,01
	ФЖ	0,25	1,00	0,36	0,42
Эндотелин-1	Сыв	0,23	0,36	1,00	0,22
	ФЖ	-0,01	0,42	0,22	1,00
Статистически значимые различия		$p > 0,05$			

Таким образом, наши исследования показали, что при трубной и мужской формах бесплодия корреляционные связи между уровнями СЭФР и эндотелина-1 в сыворотке крови и фолликулярной жидкости отсутствуют.

## РЕЗЮМЕ

Уровень СЭФР в сыворотке крови у женщин с трубной формой бесплодия является индикатором патологического ангиогенеза и имеет прогностическое значение в контексте эффективности имплантации.

Доказано, что увеличение уровня sPECAM-1 в биологической жидкости может являться сигналом к увеличению продукции СЭФР при трубной форме бесплодия, что запускает механизмы неоангиогенеза при эндотелиальной дисфункции. В индуцированных циклах при трубной и мужской формах бесплодия уровень sPECAM-1 в фолликулярной жидкости значительно выше, чем в сыворотке крови, что требует проведения дальнейших исследований.

При мужской форме бесплодия высокие уровни эндотелина-1 в сыворотке крови характеризуют проявления эндотелиальной дисфункции и имеют прогностическое значение для имплантации эмбрионов в программах ВРТ.

## ГЛАВА V

### ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнительный анализ клинико-anamнестических характеристик женщин исследуемых групп демонстрирует сопоставимость по ряду параметров. В частности нами установлено отсутствие достоверных различий при изучении возрастных характеристик исследуемых пациенток. Средний возраст в группе с трубным бесплодием составил  $34,3 \pm 0,4$  года, тогда как при мужской форме бесплодия -  $32,8 \pm 0,8$  года. Однако в группе с трубным фактором бесплодия прослеживается тенденция увеличения доли пациенток старшего репродуктивного возраста по сравнению с группой с мужским фактором бесплодия, которая составила 44,3% (54) и 25% (9) соответственно. Это говорит с одной стороны о поздней обращаемости пациенток за специализированной медицинской помощью по поводу

бесплодия, с другой - о длительном неэффективном лечении существующей проблемы.

При изучении характера менструальной функции группы были сопоставимы по возрасту наступления менархе, длительности менструального цикла и длительности менструальной кровопотери, что свидетельствует о нормальных параметрах менструального цикла у данных пациенток. В группе с трубной формой бесплодия (ТФ) наблюдались межменструальные кровянистые выделения – 8,2% (10), альгоменорея - 25,4% (31) и диспареуния – 5,7% (7). Данные нарушения у пациенток этой группы могут свидетельствовать о наличии воспалительных заболеваний органов малого таза, которые занимают ведущее место среди факторов формирования трубного бесплодия.

При изучении форм и длительности бесплодия было выявлено, что в группе с трубной формой бесплодия превалировало вторичное бесплодие, что составило 74,6% (91), в то время как в контрольной группе (МФ) большинство пациенток имели первичное бесплодие – 52,8% (19) ( $p < 0,05$ ). Для женщин с трубной формой бесплодия средняя длительность бесплодия составила  $7,3 \pm 0,4$  года, тогда как среди пациенток с мужской формой -  $6,1 \pm 0,7$  лет ( $p < 0,05$ ), что указывает на более раннее обращение за специализированной медицинской помощью данной категории супружеских пар.

При изучении соматического статуса выявлено, что женщины контрольной группы имели самую низкую среднюю частоту встречаемости экстрагенитальной патологии, которая составила  $0,7 \pm 0,05$  из расчета на одну пациентку ( $p < 0,05$ ).

Оценивая репродуктивные характеристики пациенток исследуемых групп с вторичным бесплодием нами выявлено, что группы были сопоставимы по возрасту сексуального дебюта, первой беременности, первых родов, среднему числу беременностей на одну пациентку.

Изучение гинекологического анамнеза исследуемых групп показало, что в группе с ТФ достоверно чаще в 30,3% (37) случаях у пациенток имелись эктопические беременности, послужившие основанием для удаления маточных труб ( $p < 0,05$ ). В этой группе отмечалась высокая частота встречаемости оперативных вмешательств – 2,6 в расчете на одну пациентку. Доля женщин этой группы, у которых первая беременность закончилась искусственным прерыванием до 12 недель, составила 33% (30), спонтанным самопроизвольным выкидышем – 11% (10) и в 15,4% (14) случаев наблюдалась замершая беременность. Срочными родами первая беременность закончилась у 36,3% (33) пациенток из этой группы, что достоверно меньше, чем в группе с МФ ( $p < 0,05$ ).

Анализ гинекологического анамнеза в контрольной группе с МФ позволил установить, что в 64,7% (11) случаев первая беременность у пациенток данной группы закончилась срочными родами. Частота артифициальных абортов составила 47,1% (8). Доля пациенток в группе с МФ бесплодия с неразвивающейся беременностью в анамнезе составила 11,8% (2). Самопроизвольных выкидышей у них не наблюдалось.

При изучении структуры гинекологических заболеваний нами была выявлена высокая частота нарушений со стороны репродуктивной системы среди пациенток с трубной формой бесплодия. Воспалительные заболевания органов малого таза с локализацией в придатках наблюдались в 41,8% (51) случаев, хронический эндометрит выявлен и морфологически подтвержден у 55 женщин, что составило 45,1% случаев ( $p < 0,05$ ). Данный факт являлся одним из специфических факторов в развитии трубного бесплодия.

При изучении инфекционных заболеваний в анамнезе у пациенток исследуемых групп нами было выявлено преобладание хламидийной 15,6% (19) и уреаплазменной 14,8% (18) инфекций в группе с ТФ бесплодия.

Таким образом, изучение медико-социального анамнеза пациенток исследуемых групп показал низкий уровень репродуктивного здоровья в

группе с трубной формой бесплодия, ограничивающий естественную фертильность.

При выборе схемы индукции суперовуляции в программах ВРТ выявлено сохранение овариальных резервов у 100% пациенток исследуемых групп, поскольку уровень ФСГ у всех пациенток находился в пределах до 8 МЕ/л, уровень эстрадиола - в пределах 80 пг/мл, а среднее число антральных фолликулов на 2-3-й день цикла составило от 8 до 11.

При проведении стимуляции суперовуляции с целью адекватного выбора схемы индукции суперовуляции выделяют несколько вариантов ответа яичника: низкий ответ (до 3 фолликулов), умеренный ответ (4-10 фолликулов) и выраженный ответ (более 10 фолликулов). Овариальный ответ яичников на проводимую индукцию суперовуляции в группах с трубной формой и в контрольной группе нами оценивался как умеренный и выраженный.

При изучении показателей имплантации в зависимости от овариального ответа на индукцию суперовуляции показано, что в группе с трубной формой бесплодия беременность чаще наступает при умеренном ответе яичников 54% (25), а в группе с мужским фактором бесплодия - при выраженном ответе яичников 64,3% (9), однако данные результаты оказались статистически не значимыми. При низком ответе в исследуемых группах чаще наблюдалось отсутствие имплантации, что подтверждается литературными данными, но в нашем исследовании статистически не подтвердилось.

Во всех исследуемых группах наиболее часто применялся протокол с ант-ГнРГ. Эффективность применяемого протокола стимуляции суперовуляции оценивается качеством полученных ооцитов. При изучении влияния протоколов индукции суперовуляции на качество ооцитов в группе с трубной формой бесплодия выявлено, что наибольшее количество зрелых и наименьшее количество незрелых ооцитов получено при использовании наиболее часто применяемого в данной группе протокола с ант-ГнРГ

( $p < 0,05$ ). Выбор данного протокола в этой исследуемой группе можно считать наиболее приемлемым, учитывая наибольшую долю пациенток старшего репродуктивного возраста по сравнению с другими группами, а также ожидаемый сниженный овариальный резерв и «бедный» ответ у пациенток, перенесших оперативные вмешательства на придатках матки. Одновременно показано, что при использовании протокола с ант-ГнРГ в группе с трубной формой бесплодия можно получить более качественные ооциты, поскольку ант-ГнРГ позволяют сохранить и пролонгировать до преовуляторного периода фолликулы, растущие на фоне введения ГТ, то есть создаются улучшенные условия для созревания преовуляторных ооцитов [41].

При сравнении зрелости ооцитов и показателей имплантации в исследуемых группах выявлено, что в контрольной группе с мужским фактором бесплодия у забеременевших женщин (в подгруппе Б<sup>+</sup>) количество зрелых ооцитов было статистически значимо больше по сравнению с группой ТФ  $10,9 \pm 1,9$  против  $6,7 \pm 0,6$  ( $p < 0,05$ ), что подтверждается литературными данными [81].

После оплодотворения ооцитов не менее важным моментом в процедуре экстракорпорального оплодотворения является культивирование и развитие качественных эмбрионов, способных к имплантации. Перенос эмбрионов осуществлялся на стадии бластоцисты, которая является наиболее поздней стадией развития зародыша человека, доступной для наблюдения врача-репродуктолога. Контроль за оплодотворением и последующим развитием эмбриона осуществлялся ежедневно. Проводилась оценка дробления, количества и морфологии бластомеров.

При исследовании качества эмбрионов в исследуемых группах получены следующие результаты: всего получено 328 эмбрионов. В группе с трубной формой бесплодия получено 256 эмбрионов, из них высокого качества - 45,3%, среднего - 43,4%, низкого - 11,3%. В контрольной группе



с мужским фактором бесплодия получено 72 эмбриона, из них высокого качества – 36%, среднего – 56,9%, низкого – 6,9%.

Во всех группах наибольшее количество эмбрионов было высокого и среднего качества. Процент переносов в группе с трубной формой бесплодия составил 93, а в контрольной группе с мужским фактором - 83. Наиболее низкий процент переносов эмбрионов наблюдался в группе с мужским фактором бесплодия. В большинстве случаев – 50% (3) он был связан с низким качеством полученных ооцитов, в 33,3% (2) с развившимся СГЯ и в 16,7% (1) с торможением пролиферативной активности эндометрия. В группе с трубной формой бесплодия СГЯ являлся причиной отказа в 11,2% (1) случаев, и в равных соотношениях по 44,4% (4) встречались синдром пустых фолликулов и низкое качество полученных ооцитов.

Среднее количество эмбрионов на перенос в исследуемых группах было примерно одинаковым и составило 2,3-2,4, при средней толщине эндометрия  $9,6 \pm 0,1$  мм при трубной форме и  $10,7 \pm 0,3$  мм при мужской форме бесплодия.

Качество эмбрионов было сопоставлено с показателями имплантации.

В группе с трубной формой бесплодия количество эмбрионов с высоким и средним качеством было выше у пациенток с наступившей беременностью в подгруппе  $B^+$ , чем с ее отсутствием в подгруппе  $B^-$  ( $p < 0,05$ ). В группе с мужской формой бесплодия наблюдалась противоположная ситуация и количество эмбрионов с высоким и средним качеством было выше у пациенток с отсутствием беременности в подгруппе  $B^-$  ( $p < 0,05$ ).

Частота наступления беременности на эмбриоперенос в группе с трубной формой составила 39,3%, а в контрольной группе с мужским фактором бесплодия – 45,2%.

Полученные результаты свидетельствуют, что, несмотря на большое количество перенесенных эмбрионов высокого и среднего качества, имплантации может не наступить ввиду наличия определенных факторов,

сдерживающих имплантацию. Это может быть результатом проявления эндотелиальной дисфункции различной степени выраженности, наступившей на фоне стимуляции суперовуляции гонадотропинами.

Осуществляя поиск оптимальных маркеров прогноза имплантации, проводилось изучение уровней маркеров ангиогенеза (СЭФР) и эндотелиальной дисфункции (sPECAM-1, эндотелина-1) в сыворотке крови и фолликулярной жидкости пациенток исследуемых групп.

Выявлена прямая корреляционная связь средней силы между содержанием СЭФР и sPECAM-1 в биологических жидкостях в группе с трубной формой бесплодия (в сыворотке крови  $r=0,356$ ,  $p=0,005$ , в фолликулярной жидкости  $r=0,407$ ,  $p=0,001$ ), и в фолликулярной жидкости в группе с мужской формой бесплодия ( $r=0,6$ ,  $p=0,014$ ). Данные результаты указывают на то, что увеличение уровня sPECAM-1 в биологической жидкости может являться сигналом к увеличению продукции СЭФР, что запускает механизмы неоангиогенеза при эндотелиальной дисфункции и ограничивает имплантацию.

У женщин с трубной формой бесплодия с наступившей беременностью показатели СЭФР в сыворотке крови находились в интервале от 289 до 433 пг/мл, в то время как у пациенток с отсутствием беременности значения находились в интервале 456-688 пг/мл.

У пациенток с трубной формой бесплодия с отсутствием беременности отмечается 1,5 – кратное увеличение содержания СЭФР в сыворотке крови в сравнении с женщинами, имеющими положительные результаты ( $p<0,01$ ).

Проведенный многофакторный анализ, а именно методы множественной и логистической регрессии показали, что СЭФР в сыворотке крови у пациенток с трубной формой бесплодия может являться предиктором нарушений имплантации.

Таким образом, у пациенток с трубной формой бесплодия высокое содержание СЭФР в сыворотке крови является неблагоприятным

прогностическим фактором для имплантации. При превышении показателя более 433 пг/мл в сыворотке крови требуется проведение коррекции патологического ангиогенеза для улучшения исходов программ ВРТ. Многие работы отечественных и зарубежных авторов подтверждают результаты нашего исследования [10, 58, 85].

У женщин с мужской формой бесплодия с наступившей беременностью показатели эндотелина-1 в сыворотке крови находились в интервале от 0,2-1,0 фмоль/мл, в то время как у пациенток с отсутствием беременности значения находились в интервале 1,0-3,4 фмоль/мл.

У пациенток контрольной группы в сыворотке крови выявлено повышение уровня эндотелина-1 при отсутствии имплантации ( $p < 0,05$ ). Таким образом, можно предположить, что эндотелиальная дисфункция, развившаяся у женщин без значимой патологии органов репродуктивной системы в сочетании с мужским фактором бесплодия, негативно сказывается на процессе имплантации эмбриона в программах ВРТ. При превышении показателя более 1,0 фмоль/мл в сыворотке крови требуется проведение коррекции эндотелиальной дисфункции с целью улучшения исходов программ ВРТ.

У пациенток, прошедших индукцию суперовуляции в циклах ЭКО, присутствие СЭФР и эндотелина-1 в сыворотке крови и фолликулярной жидкости показывает степень вовлечения эндотелиновой системы в процесс фолликулогенеза человека и имплантации перенесенных эмбрионов. Установлено, что СЭФР и эндотелин-1 являются значимыми предикторами в прогнозе имплантации эмбрионов в программах ВРТ. Разработанные нормативные интервалы концентрации маркеров ангиогенеза (СЭФР) и эндотелиальной дисфункции (эндотелин-1) в сыворотке крови позволили обосновать терапию по коррекции эндотелиальной дисфункции в индуцированных циклах, что способствовало увеличению частоты имплантации эмбрионов.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при трубной форме бесплодия наибольшее количество зрелых ооцитов –  $13,3 \pm 1,2$  получено при проведении индукции суперовуляции по протоколу с использованием антагониста гонадотропин-рилизинг гормона. В контрольной группе с мужским фактором бесплодия у пациенток, получивших беременность количество зрелых ооцитов было больше ( $10,9 \pm 1,9$ ) по сравнению с группой с трубной формой бесплодия ( $6,7 \pm 0,6$ ).

2. Применение протокола стимуляции суперовуляции с использованием антагониста гонадотропин-рилизинг гормона позволяет получить эмбрионы высокого и среднего качества при трубной форме бесплодия – 45,3% и 43,4% и при мужской форме бесплодия – 36% и 56,9% соответственно. Эффективность программ ВРТ с учетом переноса качественных эмбрионов составила при трубной форме - 39,3%; при мужской форме бесплодия – 45,2%.

3. При трубной форме бесплодия достоверное увеличение уровней СЭФР в сыворотке крови является предиктором неблагоприятного прогноза имплантации эмбрионов в программах ВРТ. Разработанные нормативные показатели уровней СЭФР в сыворотке крови от 289 до 433 пг/мл являются благоприятным прогностическим фактором имплантации эмбрионов, содержание СЭФР в сыворотке крови от 456 до 688 пг/мл является фактором, ограничивающим имплантацию эмбрионов.

4. При мужской форме бесплодия уровень эндотелина-1 в сыворотке крови является предиктором прогноза имплантации эмбрионов в программах ВРТ. При нормативных показателях эндотелина-1 от 0,26 до 1,0 фмоль/мл прогноз имплантации эмбрионов благоприятный, при уровне эндотелина-1 более 1,0 - 3,4 фмоль/мл прогноз имплантации неблагоприятный.

5. Разработанные методические рекомендации по коррекции эндотелиальной дисфункции позволили увеличить частоту имплантации

эмбрионов в программах ВРТ при трубной форме бесплодия с 35,2% до 39,3%, а в группе с мужским фактором бесплодия с 38,2% до 45,2%.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У пациенток с трубной формой бесплодия для оценки прогностических факторов в программах ВРТ проводится исследование сыворотки крови, полученной в день аспирации фолликулов с последующим определением в ней уровня СЭФР.

2. У пациенток с мужским фактором бесплодия для оценки прогностических факторов в программах ВРТ проводится исследование сыворотки крови, полученной в день аспирации фолликулов с последующим определением в ней уровня эндотелина-1.

3. Прогноз имплантации эмбрионов при трубной и мужской формах бесплодия определяется уровнем маркеров ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции (табл.24).

Таблица 24.

Уровни СЭФР и эндотелина-1 в сыворотке крови при различных формах бесплодия в контексте прогноза имплантации

Форма бесплодия	Уровень маркера в сыворотке крови	Прогноз имплантации
Трубная	СЭФР 289-433 пг/мл	высокий
	СЭФР 456-688 пг/мл	низкий
Мужской фактор	Эндотелин-1 0,26-1,0 фмоль/мл	высокий
	Эндотелин-1 1,0 -3,4 фмоль/мл	низкий

4. При трубной и мужской формах бесплодия, выявленные в сыворотке крови уровни СЭФР и эндотелина-1 являются основанием для

назначения низкомолекулярных гепаринов после переноса эмбрионов (табл.25).

Таблица 25.

Показания к назначению низкомолекулярных гепаринов в программах ВРТ при различных формах бесплодия

Форма бесплодия	Уровень маркера в сыворотке крови	Количество фолликулов в яичнике при пункции	Доза применяемого низкомолекулярного гепарина*
Трубная	СЭФР 456-688 пг/мл	<10	Профилактическая доза при массе тела 50-90 кг (10-14 дней после переноса эмбрионов): -Надропарин кальций 5700МЕ ежедневно; - Эноксапарина Na 40мг ежедневно;
Мужской фактор	Эндотелин-1 1,0-3,4 фмоль/мл	>10	

			часов; - Эноксапарина Na 1 мг/кг каждые 12 часов.
--	--	--	--

\*Согласно клиническим рекомендациям «Профилактика венозных тромбозных осложнений в акушерстве и гинекологии», 2013г.

Разработанные методические рекомендации применялись в течение 2014 года в центре гинекологической эндокринологии и репродукции «Три сердца», г. Красноярск и позволили увеличить частоту наступления беременности при трубной форме бесплодия с 35,2% до 39,3%, а в группе с мужским фактором бесплодия с 38,2% до 45,2%.



**УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Амирова, А. А. Факторы, влияющие на исход ЭКО (обзор литературы) / А. А. Амирова, Т. А. Назаренко, Н. Г. Мишиева // Пробл. репродукции. – 2010. – № 1. – С. 68-74.
2. Анализ взаимосвязи между клинико-anamнестическими, клинико-лабораторными данными, особенностями индукции суперовуляции и исходами ЭКО и ЭКО/ИКСИ / А. А. Амирова, Т. А. Назаренко, Т. В. Колесниченко и др. // Пробл. репродукции. – 2011. – № 1. – С. 73-77.
3. Антитромботическая терапия хронического невынашивания беременности в условиях тромбофилии / Под ред. В. Г. Стурова. – Новосибирск, 2012. – 92 с.
4. Аншина, М. Б. Сравнительная оценка эффективности и безопасности триггеров овуляции / М. Б. Аншина, Н. Л. Шамугия, А. А. Смирнова // Пробл. репродукции. – 2011. – № 5. – С. 70-74.
5. Боярский, К. Ю. Молекулярные основы фолликулогенеза: от стадии больших антральных фолликулов до овуляции / К. Ю. Боярский, С. Н. Гайдуков // Пробл. репродукции. – 2010. – № 5. – С. 13-23.
6. Боярский, К. Ю. Факторы, определяющие овариальный резерв женщины / К. Ю. Боярский, С. Н. Гайдуков, А. С. Чинчаладзе // Журн. акушерства и женских болезней. – 2009. – №2. – С. 65-71.
7. Бурлев, В. А. Регуляция ангиогенеза гестационного периода (обзор лит.) / В. А. Бурлев, З. С. Зайдиева, Н. А. Ильясова // Пробл. репродукции. – 2008. – №3. – С. 18-22.
8. Вартамян, Э. В. Причины неудач ЭКО (обзор литературы) / Э. В. Вартамян, И. В. Айзикович, А. Р. Антонов // Пробл. репродукции. – 2010. – № 3. – С. 57-61.
9. Влияние гипергомоцистеинемии на репродуктивные потери и ее коррекция во время беременности / А. А. Левина, С. А. Васильев, Н. М. Подзолкова и др. // Гематол. и трансфузиол. – 2009. – № 6. – С. 34-37.

10. Волкова, Л. В. Клинико-диагностическое значение сосудисто-эндотелиального фактора роста при неудачных попытках ЭКО / Л. В. Волкова, О. С. Аляутдина // Акушерство и гинекол. – 2011. – № 4. – С. 126-129.
11. Гавриленко, Т. И. Сосудистый эндотелиальный фактор роста в клинике внутренних заболеваний и его патогенетическое значение / Т. И. Гавриленко, Н. А. Рыжкова, А. Н. Пархоменко // Український кардіолог. журн. – 2011. – № 4. – С. 87-95.
12. Гнипова, В. В. Дифференцированный подход к терапии при кровотечении в I триместре беременности после ЭКО и ПЭ / В. В. Гнипова, В. М. Сидельникова // Акушерство и гинекол. – 2010. – № 3. – С. 51-53.
13. Головченко, Ю. И. Обзор современных представлений об эндотелиальной дисфункции / Ю. И. Головченко, М.А. Трещинская // Consilium Medicum UKRAINA. – 2008. – № 11. – С. 38-40.
14. Горшкова, А. Г. Дисморфизмы ооцитов в циклах вспомогательных репродуктивных технологий / А. Г. Горшкова, Н. П. Макарова, Н. В. Долгушина // Акушерство и гинекол. – 2014. – № 6. – С. 27-32.
15. Громенко, Ю. Ю. Влияние факторов оценки качества перенесенных эмбрионов на прогнозирование частоты наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения / Ю. Ю. Громенко, И. Р. Исхаков // Медицинский вестн. Башкортостана. – 2012. – № 2. – С. 27-30.
16. Гуморальные факторы микроокружения ооцитов на разных стадиях роста фолликулов при эндокринном бесплодии / М. В. Екимова, Е. А. Тепляшина, Е. А. Пожиленкова и др. // Пробл. репродукции. – 2011. – № 4. – С. 19-22.
17. Динамика растворимых форм молекул клеточной адгезии при преэклампсии / М. М. Зиганшина, Л. В. Кречетова, Л. В. Ванько и др. // Акушерство и гинекол. – 2011. – № 2. – С. 42-48.

18. Екимова, М. В. Фолликулярное микроокружение ооцитов у женщин с эндометриозом при стимуляции овуляции в программе ЭКО / М. В. Екимова, А. Б. Салмина, Е. А. Пожиленкова // *Акушерство и гинекол.* – 2010. – № 2. – С. 40-43.
19. Жорданидзе, Д. О. Влияние овариального резерва на параметры индуцированного цикла / Д. О. Жорданидзе, Т. А. Назаренко, Н. Д. Фанченко // *Пробл. репродукции.* – 2011. – № 2. – С. 63-68.
20. Имплантационные потери в программах ЭКО: роль наследственной и приобретенной тромбофилии (обзор литературы) / Т. А. Охтырская, К. А. Яворовская, А. В. Шуршалина и др. // *Пробл. репродукции.* – 2010. – № 2. – С. 53-57.
21. Казначеева, Т. В. Короткие протоколы с антагонистами гонадотропин-рилизинг-гормона в клинической практике врача-репродуктолога / Т. В. Казначеева, Е. Ю. Мартышкина // *Гинекология.* – 2010. – № 4. – С. 22-25.
22. Капустина, М. В. Особенности ведения I триместра беременности после ЭКО / М. В. Капустина, О. Ф. Серова // *Акушерство и гинекол.* – 2009. – № 4. – С. 30-32.
23. Клиническое значение овариального резерва в реализации репродуктивной функции / А. С. Гаспаров, Е. Д. Дубинская, Д. С. Титов и др. // *Акушерство и гинекол.* – 2014. – № 4. – С. 11-16.
24. Лечебные аспекты агонистов гонадотропного рилизинг-гормона / Т. В. Овсянникова, И. О. Макаров, Е. И. Боровкина и др. // *Гинекология.* – 2009. – № 6. – С. 26-28.
25. Макаров, И. О. Ведение беременности после экстракорпорального оплодотворения / И. О. Макаров // *Гинекология.* – 2010. – № 2. – С. 16-20.
26. Макарова, Н. П. Критерии оценки качества ооцита в циклах ИКСИ: взгляд клинического эмбриолога / Н. П. Макарова, Е. А. Калинина // *Гинекология.* – 2012. – № 3. – С. 24-28.

27. Место агонистов гонадотропин-рилизинг-гормонов в репродуктивной медицине / К. В. Краснопольская, Е. В. Крстич, О. С. Горская и др. // Пробл. репродукции. – 2012. – №2. – С. 65-67.

28. Модифицированные схемы стимуляции суперовуляции: эффективность и безопасность / Е. А. Калинина, М. В. Эбзеева, О. В. Бурменская и др. // Пробл. репродукции. – 2011. – № 1. – С. 67-72.

29. Молекулярные механизмы эндотелиальной дисфункции при венозном тромбозе: современные представления и перспективы дальнейшего изучения (обзор литературы) / А. П. Полякова, М. Н. Блинов, В. Д. Каргин и др. // Трансфузиология. – 2011. – Т. 12. – С. 1248-1265.

30. Опыт использования модифицированных схем стимуляции яичников для предотвращения синдрома гиперстимуляции яичников в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Т. А. Назаренко, Д. В. Дмитриев, Н. Р. Мамедова и др. // Акушерство и гинекол. – 2010. – № 5. – С. 63-67.

31. Оценка влияния на выбор метода родоразрешения при индуцированной беременности факторов, связанных с причиной и длительностью бесплодия, возрастом пациенток и количеством выполненных процедур экстракорпорального оплодотворения / В. И. Краснопольский, М. В. Капустина, Л. У. Долгиева и др. // Рос. вестн. акушера-гинеколога. – 2011. – № 2. – С. 44-48.

32. Оценка морфологии преимплантационных эмбрионов на различных стадиях развития *in vitro* (обзор лит-ры) / М. М. Левиашвили, Н. Г. Мишиева, Н. Ю. Костромина и др. // Пробл. репродукции. – 2011. – № 3. – С. 74-79.

33. Оценка эффективности программы ЭКО: день переноса эмбрионов в полость матки и показатели контролируемой индукции овуляции / Н. С. Щетинина, Л. Н. Кузьмичев, В. А. Бурлев и др. // Пробл. репродукции. – 2011. – № 3. – С. 56-62.

34. Повещенко, О. В. Эндотелиальные прогениторные клетки и неоваскулогенез / О. В. Повещенко, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков // Успехи современной биологии. – 2012. – №1. – С. 69-76.
35. Применение ингибиторов ароматазы в программах ВРТ (клиническая лекция) / К. В. Краснопольская, С. Л. Горский, Д. И. Кабанова и др. // Пробл. репродукции. – 2009. – № 4. – С. 40-44.
36. Пырьева, Е. А. О профилактической роли фолатов в период беременности / Е. А. Пырьева // РМЖ. Мать и дитя. – 2010. – №19. – С. 1206-1208.
37. Роль эндотелина и сосудисто-эндотелиального фактора роста в процессе фолликулогенеза / Е. А. Тепляшина, Е. А. Пожиленкова, М. В. Екимова и др. // Рос. вестн. акушера-гинеколога. – 2011. – № 3. – С. 4-8.
38. Руководство по клинической эмбриологии / Под ред. В.С. Корсака. – М.: МК, 2011. – 224 с.
39. Сароян, Т. Т. Тактика ведения индуцированной беременности, наступившей на фоне тяжелого течения синдрома гиперстимуляции яичников / Т. Т. Сароян, И. Е. Корнеева // Акушерство и гинекол. – 2011. – № 8. – С. 107-111.
40. Современные подходы к ведению лютеиновой фазы в программе экстракорпорального оплодотворения / Е. М. Галлямова, С. Г. Перминова, Э. Р. Дуринян и др. // Акушерство и гинекол. – 2014. – № 1. – С. 15-22.
41. Стимуляция функции яичников / Т. А. Назаренко. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 272 с.
42. Ультразвуковая патология ооцитов в циклах экстракорпорального оплодотворения как причина женского бесплодия / Н. П. Макарова, Л. М. Казарян, Е. В. Петрова и др. // Акушерство и гинекол. – 2014. – № 1. – С. 69-73.
43. Физиологические функции сосудистого эндотелия / А. Х. Каде, С. А. Занин, Е. А. Губарева и др. // Фундамент. исследования. – 2011. – № 11. – С. 611-617.

44. Фолликулярная жидкость как среда, определяющая качество ооцита и исход программ ВРТ (обзор лит.) / А. А. Ильина, И. И. Калинина, Т. Г. Тропина и др. // Пробл. репродукции. – 2008. – № 4. – С. 27-38.

45. Шамилова, Н. Н. Ген FMR1: новые возможности оценки овариального резерва / Н. Н. Шамилова, Л. А. Марченко // Акушерство и гинекол. – 2011. – № 2. – С. 58-64.

46. Эбзеева, М. В. Современные подходы к стимуляции суперовуляции в программах ВРТ / М. В. Эбзеева, Е. А. Калинина, Л. Н. Кузьмичев // Пробл. репродукции. – 2009. – № 4. – С. 47-49.

47. Экстракорпоральное оплодотворение и управление гемостазом / А. П. Момот, И. В. Лыдина, О. Г. Борисова и др. // Пробл. репродукции. – 2012. – № 6. – С. 47-55.

48. Элдер, К. Экстракорпоральное оплодотворение: Пер. с англ. / К. Элдер, Б. Дэйл. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 304 с.

49. Эндотелиальная дисфункция и механизмы ее формирования / А. А. Попова, С. Д. Маянская, Е. Н. Березикова // Сибирское мед. обозрение. – 2010. – № 4. – С. 7-11.

50. Эндотелиальная дисфункция: гомоцистеин и оксид азота у беременных групп высокого риска. Современные подходы к терапии. Роль фолиевой кислоты / Э. М. Джобава, Л. А. Аминтаева, Д. Н. Алиева и др. // Пробл. репродукции. – 2010. – № 6. – С. 98-103.

51. Эндотелий. Функция и дисфункция / З. А. Lupинская, А. Г. Зарифьян, Т. Ц. Гурович, С. Г. Шлейфер. – Бишкек: КРСУ, 2008. – 373 с.

52. Яманова, М. В. Эндокринное бесплодие: клеточная и молекулярная патология имплантации / М. В. Яманова, А. Б. Салмина. – М.: Медика, 2009. – 208 с.

53. Янчук, Т. В. Современная роль антагонистов гонадотропин-рилизинг-гормона в репродукции человека (обзор) / Т. В. Янчук // Гинекология. – 2010. – № 1. – С. 19-25.

54. A giant oocyte in a cohort of retrieved oocytes: does it have any effect on the in vitro fertilization cycle outcome? / R. Machtinger, J. A. Politch, M. D. Hornstein et al. // *Fertil. Steril.* – 2011. – V. 95, № 2. – P. 573-576.
55. A prospective, randomized, controlled trial comparing three different gonadotropin regimens in oocyte donors: ovarian response in vitro fertilization outcome, and analysis of cost minimization / M. Melo, J. Bellver, N. Garrido et al. // *Fertil. Steril.* – 2010. – V. 94, № 3. – P. 958-964.
56. A quantitative assessment of follicle size on oocyte developmental competence / M. P. Rosen, S. Shen, A. T. Dobson et al. // *Fertil. Steril.* – 2008. – V. 90, № 3. – P. 684-690.
57. A randomized controlled dose–response pilot study of addition of hCG to recombinant FSH during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization / L. L. Thuesen, A. Loft, A. N. Egeberg et al. // *Hum. Reprod.* – 2012. – V. 27, № 10. – P. 3074-3084.
58. Altered vascular endothelial growth factor expression during GnRH antagonist protocol in women of reproductive age with normal baseline hormone profiles / Y. A. Koo, B. Lee, H. J. Park et al. // *Fertil. Steril.* – 2009. – V. 91, № 3. – P. 744-748.
59. Andraweera, P. H. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes / P. H. Andraweera, G. A. Dekker, C. T. Roberts // *Hum. Reprod. Update.* – 2012. – V. 18, № 4. – P. 436-457.
60. Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE / J. de Mouzon, V. Goossens, S. Bhattacharya et al. // *Hum. Reprod.* – 2010. – V. 25, № 8. – P. 1851-1862.
61. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles / S. K. Sunkara, V. Rittenberg, N. Raine-Fenning et al. // *Hum. Reprod.* – 2011. – V. 26, № 7. – P. 1768-1774.
62. Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos / M. C. Magli, G. M. Jones, K. Lundin et al. // *Hum. Reprod.* – 2012. – V. 27, Suppl. 1. – P. i1–93.

63. Berkkanoglu, M. What is the optimum maximal gonadotropin dosage used in microdose flare-up cycles in poor responders? / M. Berkkanoglu, K. Ozgur // *Fertil. Steril.* – 2010. – V. 94, № 2. – P. 662-665.
64. Bonello, N. Soluble adhesion molecules in serum throughout the menstrual cycle / N. Bonello, R. J. Norman // *Hum. Reprod.* – 2002. – V. 17, № 9. – P. 2272-2278.
65. Can 200 IU of hCG replace recombinant FSH in the late follicular phase in a GnRH-antagonist cycle? A pilot study / C. Blockeel, M. De Vos1, W. Verpoest et al. // *Hum. Reprod.* – 2009. – V. 24, № 11. – P. 2910-2916.
66. Chen, C. D. Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome / C. D. Chen, S. U. Chen, Y. S. Yang // *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* – 2012. – V. 26, № 6. – P. 817-827.
67. Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization / L. G. Nardo, T. A. Gelbaya, H. Wilkinson et al. // *Fertil. Steril.* – 2009. – V. 92, № 5. – P. 1586-93.
68. Conventional ovarian stimulation no longer exists: welcome to the age of individualized ovarian stimulation / L. G. Nardo, R. Fleming, C. M. Howles et al. // *Reprod. Biomed. Online.* – 2011. – V. 23, № 2. – P. 141-148 .
69. Detrimental effects of high-dose gonadotropin on outcome of IVF: making a case for gentle ovarian stimulation strategies / P. Kovacs, A. Sajgo, S. G. Kaali et al. // *Reprod. Sci.* – 2012. – V. 19, № 7. – P. 718-724.
70. Devroey, P. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment / P. Devroey, N. P. Polyzos, C. Blockeel // *Hum. Reprod.* – 2011. – V. 26, № 10. – P. 2593-2597.
71. Early and short follicular gonadotropin-releasing hormone antagonist supplementation improves the meiotic status and competence of retrieved oocytes in in vitro fertilization–embryo transfer cycles / J. S. Younis, S. Soltsman, I. Izhaki et al. // *Fertil. Steril.* – 2010. – V. 94, № 4. – P. 1350-1355.



72. Effects of exogenous testosterone supplementation in gonadotrophin stimulated cycles / C. S. Sipe, M. R. Thomas, B. J. Stegmann et al. // *Hum. Reprod.* – 2010. – V. 25, № 3. – P. 690-696.

73. Embryo quality and impact of specific embryo characteristics on ongoing implantation in unselected embryos derived from modified natural cycle in vitro fertilization / M.-J. Pelinck, A. Hoek, A. H. Simons et al. // *Fertil. Steril.* – 2010. – V. 94, № 2. – P. 527-534.

74. Endometrial mRNA expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and cell adhesion molecules in unexplained infertility and implantation failure patients / E. Konac, E. Alp, H. I. Onen et al. // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. – V. 19, № 3. – P. 391-397.

75. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF / C. M. Boomsma, A. Kavelaars, M. J. Eijkemans et al. // *Hum. Reprod.* – 2009. – V. 24, № 6. – P. 1427-1435.

76. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture / C. M. Ko, M. C. Gieske, L. Al-Alem et al. // *Endocrinology.* – 2006. – V. 147, № 4. – P. 1770-1779.

77. 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. // *Hum. Reprod.* – 2011. – V. 26, № 7. – P. 1616-1624.

78. Expression pattern of endothelin system components and localization of smooth muscle cells in the human pre-ovulatory follicle / D. H. Choi, E. K. Kim, K.-H. Kim et al. // *Hum. Reprod.* – 2011. – V. 26, № 5. – P. 1171-1180.

79. Factors affecting success rates in two concurrent clinical IVF trials: an examination of potential explanations for the difference in pregnancy rates between the United States and Europe / V. L. Baker, C. E. Jones, B. Cometti et al. // *Fertil. Steril.* – 2010. – V. 94, № 4. – P. 1287-1291.

80. Fatemi, H. M. Ovarian stimulation: today and tomorrow / H. M. Fatemi, C. Blockeel, P. Devroey // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2012. – V. 13, № 3. – P. 392-397.

81. Fertilization rate is an independent predictor of implantation rate / M. P. Rosen, S. Shen, P. F. Rinaudo et al. // *Fertil. Steril.* – 2010. – V. 94, № 4. – P. 1328-1333.
82. Fixed versus flexible gonadotropin-releasing hormone antagonist administration in in vitro fertilization: a randomized controlled trial / E. M. Kolibianakis, C. A. Venetis, L. Kalogeropoulou et al. // *Fertil. Steril.* – 2011. – V. 95, № 2. – P. 558-562.
83. Flexible GnRH antagonist protocol versus GnRH agonist long protocol in patients with polycystic ovary syndrome treated for IVF: a prospective randomised controlled trial (RCT) / T. G. Lainas, I. A. Sfontouris, I. Z. Zorzovilis et al. // *Hum. Reprod.* – 2010. – V. 25, № 3. – P. 683-689.
84. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics / A. Revelli, L. Delle Piane, S. Casano et al. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2009. – V. 7. – P. 40.
85. Follicular fluid-specific distribution of vascular endothelial growth factor isoforms and sFlt-1 in patients undergoing IVF and their correlation with treatment outcomes / S. I. Savchev, V. A. Moragianni, D. Senger et al. // *Reprod. Sci.* – 2010. – V. 17, № 11. – P. 1036-1042.
86. Fujii, E. Y. The measurements of RAGE, VEGF, and AGEs in the plasma and follicular fluid of reproductive women: the influence of aging / E. Y. Fujii, M. Nakayama // *Fertil. Steril.* – 2010. – V. 94, № 2. – P. 694-700.
87. Girling, J. E. Regulation of endometrial vascular remodelling: role of the vascular endothelial growth factor family and the angiopoietin-TIE signalling system / J. E. Girling, P. A. Rogers // *Reproduction.* – 2009. – V. 138, № 6. – P. 883-893.
88. GnRH agonist for triggering of final oocyte maturation: time for a change of practice? / P. Humaidan, S. Kol, E. G. Papanikolaou et al. // *Hum. Reprod. Update.* – 2011. – V. 17, № 4. – P. 510-524.
89. GnRH antagonist rescue of a long-protocol IVF cycle and GnRH agonist trigger to avoid ovarian hyperstimulation syndrome: three case reports / F.

Martinez, D. B. Rodriguez, R. Buxaderas et al. // *Fertil. Steril.* – 2011. – V. 95, № 7. – P. 2432. e17-9.

90. GnRH-agonist versus GnRH-antagonist IVF cycles: is the reproductive outcome affected by the incidence of progesterone elevation on the day of HCG triggering? A randomized prospective study / E. G. Papanikolaou, G. Pados, G. Grimbizis et al. // *Hum. Reprod.* – 2012. – V. 27, № 6. – P. 1822-1828.

91. Grafodatskaya, D. The health risks of ART: Science & Society Series on Sex and Science / D. Grafodatskaya, C. Cytrynbaum, R. Weksberg // *EMBO Rep.* – 2013. – V. 14, № 2. – P. 129-135.

92. High basal LH levels in combination with low basal FSH levels are associated with high success rates at assisted reproduction / T. Brodin, T. Bergh, L. Berglund et al. // *Hum. Reprod.* – 2009. – V. 24, № 11. – P. 2755-2759.

93. Highly purified hMG versus recombinant FSH in ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists—a randomized study / E. Bosch, C. Vidal, E. Labarta et al. // *Hum. Reprod.* – 2008. – V. 23, № 10. – P. 2346-2351.

94. Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction / B. Berker, C. Kaya, R. Ayta et al. // *Hum. Reprod.* – 2009. – V. 24, № 9. – P. 2293-2302.

95. Hormonal and molecular characterization of follicular fluid, cumulus cells and oocytes from pre-ovulatory follicles in stimulated and unstimulated cycles / M. J. de los Santos, V. García-Láez, D. Beltrán-Torregrosa et al. // *Hum. Reprod.* – 2012. – V. 27, № 6. – P. 1596-1605.

96. Human chorionic gonadotrophin stimulation test as a predictor of ovarian response and pregnancy in IVF cycles stimulated with GnRH agonist gonadotrophin treatment: a pilot study / F. Fábregues, A. Iraola, R. Casamitjana et al. // *Hum. Reprod.* – 2012. – V. 27, № 4. – P. 1122-1129.

97. Impact of luteinizing hormone administration on gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: an age-adjusted analysis / E. Bosch, E. Labarta, J. Crespo et al. // *Fertil. Steril.* – 2011. – V. 95, № 3. – P. 1031-1036.

98. Increased risk of early pregnancy loss and lower live birth rate with GNRH antagonist vs. long GNRH agonist protocol in PCOS women undergoing controlled ovarian hyperstimulation / M. Kdous, A. Chaker, M. Bouyahia et al. // *Tunis Med.* - 2009. – V. 87, № 12. – P. 834-842.

99. Inflammatory Disturbances in Preeclampsia: Relationship between Maternal and Umbilical Cord Blood / C. Catarino, A. Santos-Silva, L. Belo et al. // *J. Pregnancy.* – 2012. – 2012: 684384.

100. Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF / S. Ziebe, K. Lundin, R. Janssens et al. // *Hum. Reprod.* – 2007. – V. 22, № 9. – P. 2404-2413.

101. IVF outcomes are associated with biomarkers of the homocysteine pathway in monofollicular fluid / J. C. Boxmeer, N. S. Macklon, J. Lindemans et al. // *Hum. Reprod.* – 2009. – V. 24, № 5. – P. 1059-1066.

102. Kol, S. GnRH agonist ovulation trigger and hCG-based, progesterone-free luteal support: a proof of concept study / S. Kol, P. Humaidan, J. Itskovitz-Eldor // *Hum. Reprod.* – 2011. – V. 26, № 10. – P. 2874-2877.

103. Low-dose human chorionic gonadotropin may improve in vitro fertilization cycle outcomes in patients with low luteinizing hormone levels after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration / A. M. Propst, M. J. Hill, G. W. Bates et al. // *Fertil. Steril.* – 2011. – V. 96, № 4. – P. 898-904.

104. Luteal phase progesterone increases live birth rate after frozen embryo transfer / K. Bjuresten, B. M. Landgren, O. Hovatta et al. // *Fertil. Steril.* – 2011. – V. 95, № 2. – P. 534-537.

105. Mild ovarian stimulation for IVF / M. F. G. Verberg, N. S. Macklon, G. Nargund et al. // *Hum. Reprod. Update.* – 2009. – V. 15, № 1. – P. 13-29.

106. Modified super-long down-regulation protocol improves fertilization and pregnancy in patients with poor ovarian responses / H. J. Zhang, X. R. Song, R. Lu et al. // *Chin. Med. J. (Engl.)*. – 2012. – V. 125, № 16. – P. 2837-2840.

107. Morphological embryo assessment: reevaluation / H. Bar-Yoseph, A. Levy, Y. Sonin et al. // *Fertil. Steril.* – 2011. – V. 95, № 5. – P. 1624-1628.

108. Multi-marker assessment of ovarian reserve predicts oocyte yield after ovulation induction / M. Al-Azemi, S. R. Killick, S. Duffy et al. // *Hum. Reprod.* – 2011. – V. 26, № 2. – P. 414-422.

109. Nelson, S. M. The potential role of heparin in assisted conception / S. M. Nelson, I. A. Greer // *Hum. Reprod. Update.* – 2008. – V. 14, № 6. – P. 623-645.

110. Oocyte diameter as a predictor of fertilization and embryo quality in assisted reproduction cycles / G. S. Romao, M. C. Araujo, A. S. de Melo et al. // *Fertil. Steril.* – 2010. – V. 93, № 2. – P. 621-625.

111. Outcome of in vitro fertilization following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in downregulated women of advanced reproductive age: a prospective, randomized and controlled trial / H. Ye, G. Huang, L. Pei et al. // *Gynecol. Endocrinol.* – 2012. – V. 28, № 7. – P. 540-544.

112. Ovarian hyperstimulation syndrome / A. Le Gouez, B. Naudin, M. Grynberg et al. // *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* – 2011. – V. 30, № 4. – P. 353-362.

113. Pepene, C. E. Soluble platelet/endothelial cell adhesion molecule (sPECAM)-1 is increased in polycystic ovary syndrome and related to endothelial dysfunction / C. E. Pepene // *Gynecol. Endocrinol.* – 2012. – V. 28, № 5. – P. 370-374.

114. Poor prognosis for ovarian response to stimulation: results of a randomised trial comparing the flare-up GnRH agonist protocol vs. the antagonist protocol / M. Devesa, F. Martinez, B. Coroleu et al. // *Gynecol. Endocrinol.* – 2010. – V. 26, № 7. – P. 509-515.

115. Povsic, T. J. Endothelial progenitor cells: markers of vascular reparative capacity / T. J. Povsic, P. J. Goldschmidt-Clermont // *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* – 2008. – V. 2, № 3. – P. 199 - 213.

116. Predicting successful induction of oocyte maturation after gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) trigger / N. E. Kummer, R. S. Feinn, D. W. Griffin et al. // *Hum. Reprod.* – 2013. – V. 28, № 1. – P. 152-159.

117. Prediction of pregnancy rate by blastocyst morphological score and age, based on 1,488 single frozen-thawed blastocyst transfer cycles / S. Goto, T. Kadowaki, S. Tanaka et al. // *Fertil. Steril.* – 2011. – V. 95, № 3. – P. 948-952.

118. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis / L. L. van Loendersloot, M. van Wely, J. Limpens et al. // *Hum. Reprod. Update.* – 2010. – V. 16, № 6. – P. 577-589.

119. Predictive factors of ovarian response and clinical outcome after IVF/ICSI following a rFSH/GnRH antagonist protocol with or without oral contraceptive pre-treatment / A. N. Andersen, H. Witjes, K. Gordon et al. // *Hum. Reprod.* – 2011. – V. 26, № 12. – P. 3413-3423.

120. Pu, D. Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in poor ovarian responders undergoing IVF / D. Pu, J. Wu, J. Liu // *Hum. Reprod.* – 2011. – V. 26, № 10. – P. 2742-2749.

121. Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. A Cochrane review / M. van Wely, I. Kwan, A. L. Burt et al. // *Hum. Reprod. Update.* – 2012. – V. 18, № 2. – P. 111.

122. Relative contribution of PECAM-1 adhesion and signaling to the maintenance of vascular integrity / J. R. Privratsky, C. M. Paddock, O. Florey et al. // *J. Cell Sci.* – 2011. – V. 124, № 9. – P. 1477-1485.

123. Rienzi, L. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature / L. Rienzi, G. Vajta, F. Ubaldi // *Hum. Rep. Update.* – 2011. – V. 17, № 1. – P. 34-45.

124. Santos M. A. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo / M. A. Santos, E. W. Kuijk, N. S. Macklon // *Reproduction.* – 2010. – V. 139, № 1. – P. 23-34.

125. Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 in in vitro fertilization cycles / I. Souter, A. Huang, O. Martinez-Maza et al. // *Fertil. Steril.* – 2009. – V. 91, № 5. – P. 2012-2019.

126. The association between homocysteine in the follicular fluid with embryo quality and pregnancy rate in assisted reproductive techniques / P. Ocal, B. Ersoylu, I. Cepni [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2012. – V. 29, № 4. – P. 299-304.

127. The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis / M. F. Verberg, M. J. Eijkemans, N. S. Macklon et al. // *Hum. Reprod. Update.* – 2009. – V. 15, № 1. – P. 5-12.

128. The effect of recombinant LH on embryo quality: a randomized controlled trial in women with poor ovarian reserve / A. M. Musters, M. van Wely, S. Mastenbroek et al. // *Hum. Reprod.* – 2012. – V. 27, № 1. – P. 244-250.

129. The level of vascular endothelial cell growth factor, nitric oxide, and endothelin-1 was correlated with ovarian volume or antral follicle counts: a potential predictor of pregnancy outcome in IVF / M. Zhao, C. Chang, Z. Liu et al. // *Growth Factors.* – 2010. – V. 28, № 5. – P. 299-305.

130. The number of small antral follicles (2–6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population / M. L. Haadsma, A. Bukman, H. Groen et al. // *Hum. Reprod.* – 2007. – V. 22, № 7. – P. 1925-1931.

131. The oocyte / L. Rienzi, B. Balaban, T. Ebner et al. // *Hum. Reprod.* – 2012. – V. 27, Suppl. 1. – P. i2-21.

132. The possible role of hyperhomocysteinemia on IVF outcome / A. Pacchiarotti, M. A. Mohamed, G. Micara et al. // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2012. – V. 24, № 10. – P. 459-462.

133. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion / J. Bellver, S. R. Soares, C. Álvarez et al. // *Hum. Reprod.* – 2008. – V. 23, № 2. – P. 278-284.

134. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in patients with polycystic ovary syndrome undergoing IVF / P. G. Artini, M. Ruggiero, M. R. Parisen Toldin et al. // *Hum. Fertil. (Camb).* – 2009. – V. 12, № 1. – P. 40-44.

135. Vascular endothelial growth factor levels in serum and plasma from patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF / D. Manau, F. Fábregues, J. Peñarrubia et al. // *Hum. Reprod.* – 2007. – V. 22, № 3. – P. 669-675.

136. Vascular endothelial growth factor, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the follicular fluid of patients undergoing IVF / J. L. Benifla, A. F. Bringuier, C. Sifer et al. // *Hum. Reprod.* – 2001. – V. 16, № 7. – P. 1367-1381.

137. VEGF deficit is involved in endothelium dysfunction in preeclampsia / Q. Zhou, H. Liu, F. Qiao et al. // *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* – 2010. – V. 30, № 3. – P. 370-374.

138. Vrtacnik-Bokal, E. Follicular oestradiol and VEGF after GnRH antagonists or GnRH agonists in women with PCOS / E. Vrtacnik-Bokal, I. V. Klun, I. Verdenik // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. – V. 18, № 1. – P. 21-28.

139. Who needs LH in ovarian stimulation? / C. Alviggi, R. Clarizia, A. Mollo et al. // *Reprod. Biomed. Online.* – 2011. – V. 22, Suppl. 1. – S. 33-41.

140. Woodfin, A. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology / A. Woodfin, M.-B. Voisin, S. Nourshargh // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – V. 27, № 12. – P. 2514-2523.