МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области

МОСКОВСКИЙ ОБЛАСТНОЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ АКУШЕРСТВА И ГИНЕКОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КРАСНОПОЛЬСКОГО

На правах рукописи

ЛЯХОВ АНДРЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИИ ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ НЕЯСНОГО ГЕНЕЗА

3.1.4. –Акушерство и гинекология

Д И С С Е Р Т А Ц И Я

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Краснопольская К.В.

МОСКВА – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

стр.

Введение……..... 5

Глава 1 Клинические и молекулярно-генетические аспекты бесплодия неясного генеза (обзор литературы)……..... 10
1.1. Эпидемиологическая, патогенетическая и клиническая характеристика бесплодия неясного генеза.…… ……... 10
1.2. Молекулярно-генетические механизмы в патогенезе БНГ и их влияние на показатели ЭКО в до- и посттрансферном периодах……. 24

Глава 2 Материал и методы исследования……. 34
2.1. Дизайн исследования: критерии включения в исследование и порядок его проведения, число и распределение обследованных больных…… 34
2.2. Методы исследования…… 34
2.2.1. Стандартные методы исследования, использованные до начала выполнения программы ЭКО…. 35
2.2.2. Методы исследования, использованные в период выполнения программы ЭКО…… 40
2.2.3. Молекулярно-генетические методы исследования…….. 43
2.3. Методы лечения…….. 43
2.4. Методы статистического анализа……... 47
2.5. Работа с литературными источниками……..…... 47
2.6. Этические аспекты……..…… 48

Глава 3 Результаты исследования……. 49
3.1. Инцидентность БНГ с изучавшимися генетическими особенностями в общем контингенте инфертильных женщин не старше 35 лет……... 49
3.2. Характеристика длительности и типа бесплодия, гормональной регуляции репродуктивной системы и состояния овариального резерва у обследованных женщин с БНГ……..…. …….. 50
3.3. Результаты выполнения программы ЭКО в дотрансферном периоде у пациенток с БНГ с изучавшимися генетическими особенностями…… 53
3.3.1. Этап управляемого фолликулогенеза……. 53
3.3.2. Этап оплодотворения ооцитов…….…….. 55
3.3.3. Этап доимпантационного развития эмбрионов……..….. 57
3.4. Результаты выполнения программы ЭКО в посттрансферном периоде у пациенток с БНГ с изучавшимися генетическими особенностями…… 59
3.4.1. Этап имплантации переносимых эмбрионов……. 59
3.4.2. Этап раннего постимплантационного развития эмбрионов (до срока подтверждения клинической беременности)…….. 61
3.5. Итоговая оценка терапевтической эффективности ЭКО у пациенток не старше 35 лет с БНГ с анализом значимости изучавшихся генетических аномалий для результатов лечения……. 64

Обсуждение результатов исследования…..…….. 71

Выводы…… 81

Практические рекомендации…….. 82

Список литературы…….. 83

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.

а-ГнРГ - агонист (аналог) гонадотропин-релизинг гормона

ант-ГнРГ –антагонист гонадотропин-релизинг гормона

АМГ – антимюллеровый гормон

БНГ – бесплодие неясного генеза

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ГА – генетические аномалии (по изучавшимся генам OOMD/PREMBL/VEGF).

ГнРГ – гонадотропин-релизинг гормон

E_2.- эстрадиол

ИКСИ – интрацитоплазматическое введение сперматозоида

МЦ – менструальный цикл

ПЭ – перенос эмбрионов

ПНЯ –преждевременная недостаточность яичников

СГЯ – синдром гиперстимуляции яичников

СЦ – стимулированный цикл

ТВП – трансвагинальная пункция

ТПБ - трубно-перитонеальное бесплодие

УЗИ - ультразвуковое исследование

ФСГ - фолликулостимулирующий гормон

чАФ – число малых антральных фолликулов

чМГ – человеческие менопаузальные гонадотропины

чХГ – человеческий хорионический гонадотропин

ЧНБ– частота наступления беременности

$ЧНБ_{ПЭ}$– частота наступления беременности на перенос эмбрионов

$ЧНБ_{СЦ}$– частота наступления беременности на стимулированный цикл

ЭКО - экстракорпоральное оплодотворение

ЭКО-ОД - экстракорпоральное оплодотворение с использованием ооцитов донора

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность.

Известно, что терапевтическая эффективность стандартной процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с собственными ооцитами пациентки, определяемая частотой наступления клинической беременности (ЧНБ) последние десятилетия стабильно колеблется на уровне примерно 35% на перенос эмбрионов и 25-30% на стимулированный цикл. Об этом свидетельствуют многолетние отчеты Российской Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ), в том числе и самый последний их них за 2021 год, согласно которому усредненные показатели ЧНБсц и ЧНБпэ в российских центрах, использующих ЭКО, составили соответственно 28,6% и 34,8% [11]. У пациенток с бесплодием неясного генеза (БНГ), т.е. с инфертильностью, причину которой не удается установить с помощью существующих методов, применяемых для оценки состояния женской репродуктивной системы и исключающих мужской фактор, показатель ЧНБсц обычно не превышает 10-20% [126, 131]. Данный факт указывает на то, что женщины с БНГ представляют собой когорту «трудных» пациенток по причине их выраженной резистентности к лечению бесплодия с применением даже такой высокоэффективной технологии, как ЭКО.

Одним из подходов, способствующих улучшению терапевтических исходов при лечении БНГ является идентификация маркеров, позволяющих прогнозировать степень эффективности стандартного ЭКО. Очевидно, что получаемая с помощью таких маркеров информация помогала бы определяться в вопросе о целесообразности использования при выполнении ЭКО собственных или донорских ооцитов. Существует взгляд, что многие случаи БНГ ассоциируются с «эмбриональным» фактором, обусловленным разного рода генетическим аномалиями, сопровождаемыми нарушениями созревания и оплодотворения ооцитов, а также блокадой процессов бластуляции, имплантации и раннего посттрансферного развития эмбрионов [102, 182]. До настоящего времени гены-кандидаты на роль маркеров

ожидаемой эффективности ЭКО окончательно не определены, о чем свидетельствуют непрекращающиеся дискуссии по этому вопросу. Тем не менее, анализ сообщений разных авторов [102, 181] показывает, что наиболее перспективными прогностическими (для результатов ЭКО) генетическими маркерами являются гены, относимые к группам: 1) дефекта созревания ооцитов (OOMD); 2) преимплантационной летальности бластоцист (PREMBL); 3) трансформирующего фактора роста-β (TGF_{β}). С учетом этого обстоятельства представляется актуальным уточнить среди женщин с БНГ частоту лиц с аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF_{β}. При этом целесообразно изучить степень негативного влияния генетических нарушений, ассоциируемых с генами OOMD/PREMBL/TGF_{β}, на параметры программ ЭКО, оцениваемые в до- и посттрансферном периодах, т.е. от начала гонадотропиновой стимуляции до срока подтверждения клинической беременности.

Выделение на основе оценки генетических маркеров, ассоциируемых с «эмбриональным» фактором инфертильности, среди всех женщин с БНГ пациенток с «хорошим» и «плохим» прогнозом успешного использования стандартного ЭКО с собственными ооцитами имеет чрезвычайно важное практическое значение для ситуаций, когда лечение проводится в рамках обязательного медицинского страхования (ОМС). Очевидно, что процедуру ЭКО с собственным генетическим материалом в рамках ОМС имеет смысл назначать пациенткам с БНГ только при условии «хорошего» прогноза успеха такого лечения. Лицам с «плохим» прогнозом терапевтических исходов программ ЭКО с собственными ооцитами целесообразно рекомендовать использование модификации ЭКО с ооцитами донора. Не приходится сомневаться, что такой подход мог бы способствовать не только рачительному, но и более эффективному расходованию средств из страхового бюджета, который, как должно быть известно всем, всегда представляется достаточно ограниченным.

Цель исследования: уточнить значимость молекулярно-генетических исследований групп генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ для совершенствования тактики ведения женщин с необъяснимым бесплодием в программах ЭКО.

Задачи исследования:

1. Составить «генетический портрет» (т.е. создать референсную базу) по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ у женщин с подтвержденной максимальной терапевтической эффективностью ЭКО (в «идеальной» группе по критерию успешного использования ЭКО).
2. Уточнить долю необъяснимого бесплодия в общей структуре причинных факторов инфертильности у пациенток, включаемых в программы ЭКО.
3. Определить частоту женщин с наличием и отсутствием дефектов в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ у пациенток с БНГ, установленным по результатам стандартного клинико-лабораторного и инструментального обследования.
4. Изучить особенности гипофизарной регуляции репродуктивной системы, состояния овариального резерва и реакции на гонадотропиновую стимуляцию (по показателям курсовой дозы ФСГ, числа дней стимуляции и количества полученных ооцитов при ТВП) у женщин с БНГ с наличием и отсутствием изучавшихся генетических аномалий.
5. Провести анализ показателей раннего эмбриогенеза и причинных факторов прекращения программы ЭКО на доимплантационном этапе у пациенток с БНГ с наличием и отсутствием дефектов в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.
6. Уточнить инцидентность случаев отсутствия имплантации переносимых эмбрионов и потери биохимически подтвержденной беременности у пациенток с БНГ с наличием и отсутствием дефектов в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.
7. Охарактеризовать терапевтическую эффективность ЭКО по критерию частоты наступления клинической беременности (подтверждаемой на 28-е сутки после ПЭ) у пациенток с БНГ с наличием и отсутствием дефектов в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$

Научная новизна.

На материале, достаточном для статистически обоснованных выводов, подтверждена неоднородность популяции женщин с БНГ, среди которых возможно выделение лиц с наличием и отсутствием дефектов в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

Получены результаты, подтверждающие существенное негативное влияние изучавшихся в работе генетических аномалий (в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$) на показатели, характеризующие управляемый фолликулогенез, способность ооцитов к оплодотворению, раннее эмбриональное развитие в дотрансферном периоде и имплантацию.

Продемонстрировано, насколько негативно влияет на результаты ЭКО (оцениваемые по показателю частоты наступления клинической беременности) наличие у лиц с БНГ генетических аномалий, ассоциируемых с искажением «генетического портрета», формируемого генами OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

Практическая значимость.

Обоснована целесообразность молекулярно-генетического исследования у женщин с БНГ для уточнения наличия/отсутствия дефектов генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$. По результатам такого исследования пациенткам с БНГ и подтвержденными дефектами изучавшихся генов целесообразно рекомендовать использование в программах ЭКО донорских ооцитов. Женщинам с таким же диагнозом, но не имеющим указанных генетических нарушений допустимо назначение стандартного ЭКО.

В процессе выполнения работы составлен «генетический портрет» по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, характеризующий лиц с максимально благоприятным прогнозом успешной реализации терапевтического потенциала ЭКО. Такой портрет, представляющий собой референсную базу для оценки соответствия нормативам для генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, может быть широко использован на практике в качестве эталона для идентификации

лиц с дефектами указанных генов, ухудшающими прогноз успешного использования ЭКО с собственными ооцитами и, соответственно, мотивировать их замену на ооциты донора.

Положения, выносимые на защиту.

1. Пациентки с БНГ представляют собой неоднородную группу, в которой примерно в равном соотношении присутствуют лица с наличием и отсутствием дефектов генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

2. При наличии у пациентки с БНГ дефектов в группах генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ отмечается ухудшение результатов лечения на доимплантационном этапе, что проявляется в возрастании частоты блоков созревания (до стадии MII) и оплодотворения ооцитов, а также блоков развития культивируемых эмбрионов до стадии бластоцисты.

3. Дефекты в группах генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ ассоциируются также с ухудшением вероятности успешной имплантации переносимых эмбрионов.

4. У включаемых в программы ЭКО женщин с БНГ с наличием дефектов в группах генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ имеющие место отклонения в эмбриогенезе на дотрансферном этапе и нарушения процесса имплантации фактически нивелируют возможность достижения клинически подтверждаемой беременности, что мотивирует целесообразность использования донорских ооцитов при ведении таких больных.

Глава 1

КЛИНИЧЕСКИЕ И МОЛКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БЕСПЛОДИЯ НЕЯСНОГО ГЕНЕЗА (обзор литературы).

1.1. Эпидемиологичекая, патогенетическая и клиническая характеристика бесплодия неясного генеза.

По определению ВОЗ бесплодием является отсутствие беременности у женщины детородного возраста в течение 1 года регулярной половой жизни без применения каких-либо контрацептивных средств [184]. Частота бесплодного брака в России и других развитых странах мира в настоящее время колеблется на уровне 10-20%, а его причинами могут выступать нарушения в репродуктивной сфере у одного или обоих супругов [18; 114]. Женский фактор провоцирует бесплодие в браке примерно в 45% случаев, мужской – в 40%, сочетанный – в 15% [28, 76].

В приложении к женской инфертильности выделяют ***абсолютное женское бесплодие*** при котором возможность возникновения беременности с помощью разного рода средств и методов восстановления естественной фертильности полностью исключена (при отсутствии маточных труб, матки или яичников) [18]. У пациенток с абсолютным женским бесплодием его преодоление возможно только благодаря методам вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), предусматривающих, в зависимости от клинической ситуации, применение стандартного ЭКО (при абсолютном трубном бесплодии), ЭКО с донорскими ооцитами (при очевидной невозможности восстановления овуляторной функции) или ЭКО в программе суррогатного материнства (при отсутствии матки). Бесплодие, ассоциируемое с мужским фактором, проявляющимся в отсутствии спермы в эякуляте или с тяжелой тератозооспермией, преодолевается с использованием технологии искусственной инсеминации донорской спермой [15].

Все причины, которые не обусловливают «абсолютное женское бесплодие», рекомендуется рассматривать как «относительные» факторы

женской инфертильности [21]. Среди женщин с «относительными» факторами бесплодия возможно выделение лиц:

1) с очевидными (вполне понятными по патогенетическим критериям) причинами инфертильности;

2) с предполагаемыми (не совсем ясными с точки зрения понимания механизмов их патогенного воздействия на репродуктивную систему) факторами бесплодия;

3) с бесплодием неясного генеза (с неустановленными причинами нарушений в репродуктивной сфере).

Очевидные причины женского бесплодия, представленные в Международном Классификаторе Болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), включают:

- овуляторные нарушения (ановуляцию) при гипоталамо-гипофизарной недостаточности или дисфункции, часто сопровождаемой СПКЯ, или при первичной гипофункции яичников при их различных поражениях (код 97.0);
- трубную непроходимость при прямом поражении фаллопиевых труб различной этиологии или при спаечном процессе в области придатков с захватом маточных труб (код 97.1);
- аномалии матки в виде, например, выраженных синехий (синдром Ашермана) или пороков развития (код 97.2);
- поражения на уровне шейки матки, препятствующие транспорту мужских гамет (код 97.3).

Предполагаемые причины относительного женского бесплодия ассоциируются с гинекологическими заболеваниями и состояниями, которые достоверно увеличивают (по данным статистических исследований) риск развития бесплодия, но не имеют окончательного объяснения механизма их негативного влияния на репродуктивнцую функцию. Примером такого рода вариантов женской инфертильности являются случаи бесплодия, ассоциируемые с эндометриозом, не сопровождаемым овуляторными

нарушениями, трубными, цервикальными или внутриматочными поражениями [84, 101, 154]. Сюда же можно отнести инфертильных пациенток с миомой (не деформирующей полость матки) [14, 29] или со спаечным процессом в области малого таза (не сопровождаемым окклюзией маточных труб) [154], у которых не обнаруживается никаких других причинных факторов бесплодия, относимых в МКБ-10 к рубрикам 97.0 – 97.3. Необходимо подчеркнуть, что перечисленные гинекологические заболевания отнюдь не всегда сопровождаются инфертильностью, что доказывается вполне успешной реализацией репродуктивной функции у многих женщин с эндометриозом, миомой или перитонеальными спайками [12, 14]. Тем не менее, поскольку на фоне такой патологии риск бесплодия все же возрастает, представляется вполне оправданным рассматривать эти заболевания и состояния как вероятную причину инфертильности (выделенную в МКБ-10 в отдельную рубрику под кодом 97.7), в особенности в отсутствие «более очевидных» причинных факторов бесплодия, относимых к рубрикам 97.0-97.3.

Диагноз ***необъяснимого бесплодия*** выставляется, если с использованием всех доступных диагностических исследований (в том числе гистеро- и лапароскопии) и при условии исключения мужского фактора не удалось выявить [21, 139, 184]:

- *очевидных (абсолютно понятных) причин* нарушений в женской репродуктивной системе, относимых к рубрикам 97.0-97.3 по МКБ-10;

- *предполагаемых причин* женской инфертильности, ассоциируемых с гинекологическими заболеваниями, которые по данным литературы увеличивают риск бесплодия (миома, продвинутые стадии перитонеального эндометриоза, эндометриоза яичников и аденомиоза).

По сообщениям разных авторов доля БНГ в структуре причин женского бесплодия составляет от 5 до 40% [74, 75, 96, 140]. Столь выраженные различия результатов эпидемиологических исследований распространенности БНГ могут быть связаны с множеством факторов, таких как глубина

клинического обследования и варианты интерпретации его данных, возраст пациенток, величина выборки, критерии включения в исследуемую группу [121, 136, 139]. Тем не менее, эпидемиологические исследования однозначно свидетельствуют о том, что БНГ в большей или меньшей степени, но стабильно присутствует в общей структуре причин бесплодия. Такая информация наводит на мысль о том, что БНГ явно является популяционной константой, т.е. среди возможных причин БНГ есть такие, которые никогда не исчезают и обусловливают сохранение регистрируемых случаев данного варианта бесплодия в общей популяции инфертильных женщин.

Потенциальные причинные факторы БНГ являются предметом нескончаемых дискуссий. Ниже мы приводим обсуждаемые среди специалистов заболевания и состояния, которые могут быть вероятной причиной инфертильности у женщин, относимых при стандартном обследовании по поводу бесплодия к когорте пациенток с БНГ,

1. БНГ и «малые» формы эндометриоза.

В литературе можно найти сообщения, что какая-то часть случаев БНГ может ассоциироваться с плохо диагностируемыми «малыми» формами эндометриоза [84, 101, 154, 168]. Несмотря на отсутствие при «малых» формах эндометриоза каких-то очевидных (относимых к рубрикам 97.0-97.3 по МКБ-10) причин инфертильности, при этом заболевании, вероятно, может происходить аномальная активация локального иммунитета, которая проявляется в угнетении процесса имплантации бластоцисты в эндометрий или в поражении сперматозоидов активированными макрофагами [9, 158]. Не исключается также возможность ухудшения качества созревающих ооцитов, что может быть следствием манифестации «дремлющих» генетических дефектов в ооцитах под влиянием наблюдаемого при эндометриозе оксидативного стресса и избыточной продукции биологически-активных веществ, способных оказывать неблагоприятное влияние на генетический аппарат, как ооцитов, так и сперматозоидов [55, 117, 130, 176].

2) БНГ и скрытая преждевременная недостаточность яичников, ассоциируемая с наследственной предрасположенностью или аутоиммунным оофаритом.

Допускается, что у части пациенток с БНГ инфертильность может быть следствием скрытой формы преждевременной недостаточности яичников (ПНЯ). Известно, что у некоторого числа молодых женщин самые первые проявления естественного старения яичников выражаются в снижении способности к зачатию, не сопровождаясь явными количественными изменениям показателей овариального резерва [165]. Маркером скрытой формы ПНЯ является нетипичная для данного возраста резистентность яичников к гонадотропинам, назначаемым в дозах необходимых для индукции суперовуляции [134]. Важным свидетельством в пользу наследственной предрасположенности к развитию скрытой формы ПНЯ у части лиц с БНГ являются случаи ранней менопаузы в семейной истории у таких больных [147]. Связь между ранней субфертильностью (на фоне скрытой формы ПНЯ) и возрастом наступления менопаузы объясняется в рамках концепции наследственно-обусловленного преждевременного старения яичников [134].

Отдельные специалисты полагают, что ПНЯ может быть следствием аутоиммунного оофарита [2, 7, 38, 167]. Из-за того, что аутоиммунный оофарит плохо поддается диагностике, это заболевание часто принимают за ПНЯ с неясной этиологией, относя его к БНГ. Антигены, к которым вырабатываются аутоантитела при аутоиммунном оофарите, гетерогенны по своей природе. Это могут быть структурные элементы клеток гранулезы, теки, ооцитов, стероид-продуцирующих клеток яичников, рецепторы гонадотропных гормонов и непосредственно гонадотропины [65, 110, 122].

Заслуживает внимания, что аутоиммунный оофарит может проявляться в гипер- и в нормогонадотропной форме, т.е. с повышенным и нормальным уровнем гонадотропинов [7, 37]. В тех случаях, когда аутоантитела направлены против примордиальных и первичных фолликулов, повреждается фолликулярный аппарат вплоть до его полного уничтожения и замещения

соединительной тканью. Дефицит фолликулов приводит к развитию вторичной гипергонадотропной аменореи.

В других случаях, когда при аутоиммунном оофарите аутоантитела направлены только против растущих фолликулов, развивается нормогонадотропная первично-яичниковая аменорея. При этом состоянии отмечается нормальный уровень гонадотропинов и отсутствуют ультразвуковые и гормональные признаки редукции овариального резерва. Такое состояние нередко описывается как «синдром резистентных яичников», для которого типична рефрактерность яичников к гонатропиновой стимуляции [7, 37].

Отдельные специалисты обращают внимание, что первично-овариальная недостаточность аутоиммунной природы характеризуется увеличением продукции ингибина В по сравнению с этим показателем у пациенток с гипергонадотропной аменореей другой этиологии, женщин постменопаузального возраста и здоровых фертильных женщин [164]. Данный факт объясняют тем, что при аутоиммунном оофарите в большей степени повреждаются клетки теки, тогда как гранулезные клетки, образующие ингибин В, остаются интактными до начала их лютеинизации.

Возможно, при аутоиммунном оофарите патологический процесс начинается с поражения растущих фолликулов и только затем распространяется на структуры яичника с захватом примордиальных фолликулов. В этом случае можно говорить о стадийности одного и того же заболевания. Однако клинические наблюдения указывают на то, что нормогонадотропная стадия аутоиммунного оофарита не всегда переходит в гипергонадотропную, т.е. эти два состояния являются разными заболеваниями. Таким образом, нормогонадотропная овариальная недостаточность при аутоиммунном оофарите может быть, как начальной стадией заболевания, так и его самостоятельной формой, не приводящей в дальнейшем к поражению примордиальных фолликулов и развитию гипергонадотропной аменореи [7].

Среди лиц с аутоиммунным оофаритом частота его проявления в виде гипер- и нормогонадотропной аменореи составляет соответственно 70% и 30% [2, 7].

3) БНГ и «срытая» непроходимость маточных труб.

В общую когорту пациенток с БНГ могут попадать женщины с оставшимся не выявленным трубным фактором бесплодия [166, 151]. Это связано с трудностями при установлении данного диагноза даже с использованием лапароскопии. Сложность подтверждения трубного фактора бесплодия может быть обусловлена незначительными размерами поражений маточных труб (МТ), наблюдаемыми при «малых» формах эндометриоза. Кроме того, нельзя исключать наличие динамической трубной непроходимости при нарушении тонуса мышечных элементов МТ на фоне отклонений их гормональной регуляции и/или вследствие дисбаланса простагландинов и других биологически активных веществ, образуемых в очагах эндометриоза или хронического воспаления любой другой природы [64, 90].

4) БНГ и нарушения волновой перистальтической активности эндометрия.

С БНГ могут быть ассоциированы нарушения перистальтики субэндометриальной (переходной) зоны матки [8]. Слой миометрия, прилегающий к полости матки, выделяется в особую морфофункциональную зону («субэндометриальный слой», «соединительная зона»). Важно, что, в отличие от основной части миометрия, экспрессия эстрогеновых рецепторов соединительной зоны имеет циклический характер: нарастает в позднюю пролиферативную фазу менструального цикла и быстро снижается в начале секреторной фазы. Экспрессия прогестероновых рецепторов при этом не претерпевает особых колебаний в течение МЦ. В норме в слизистой оболочке матки регулярно распространяются волнообразные колебания, порождаемые последовательными сокращениями пучков миометрия субэндометриального слоя. Направленность и частота формирующихся волн в эндометрии

подвержены циклической гормональной регуляции, т.е. зависят от фаз МЦ. Показано [23], что в позднюю пролиферативную/периовуляторную фазу МЦ волны перистальтика эндометрия направлены от внутреннего зева к трубным углам (антеградно), что обеспечивает успешный транспорт мужских гамет. В раннюю секреторную фазу МЦ волны перистальтики распространяются в обратном направлении (от трубных углов к внутреннему зеву), т.е. ретроградно. В «окно имплантации» волны перистальтики в норме также направлены ретроградно, с периодичностью 2-5 в минуту, что, вероятно, оптимизирует условия для имплантации. При этом адекватный характер перистальтических волн в «окно имплантации» может быть одним из ключевых факторов, определяющих успех нидации эмбриона в эндометрий. Характер перистальтики эндометрия во многом зависит от архитектоники миометрия и распределения в нем рецепторов к половым стероидам. При дисбалансе половых стероидов, вызванном самыми разными причинами (аденомиоз, эндометриальные полипы, миома матки), ритм и характер (направленность) перистальтических волн эндометрия может искажаться, что провоцирует снижение рецептивности эндометрия и способствует развитию инфертильности [14, 92, 93].

5) БНГ и нарушение рецептивности эндометрия, связанные с молекулярными и генетическими факторами.

В литературе можно найти сообщения, что к бесплодию может приводить снижение рецептивности эндометрия из-за нарушений в местной продукции и/или тканевой рецепции и экспрессии:

- интерлейкина-1, -6, -11 (IL-I, 6, 11) [32, 143];
- лейкемия-ингибирующего фактора (LIF) [119];
- сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) и тканевого фактора роста [TGF] [47];
- гепаринсвязывающего эпидермального фактора роста (ГС-ЭФР) [155];
- матриксных металлопротеиназ (ММР) и их тканевых ингибиторов (TIMP) [104];

- интегринов [43, 81];
- селектинов [5, 44, 69, 86];
- гликоделина А [31, 59, 135, 156];
- кадгеринов, муцинов, простагандинов [32];
- белка Ki-67 [1, 26].
- ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1) [24, 46].

Также было установлено, что в период «окна имплантации» поддержание высокой рецептивности эндометрия ассоциируется со значительным повышением концентрации 9 липидов (простагландинов E_2, $F_{1\alpha}$, $F_{2\alpha}$, а также соединений этаноламина с различными жирными кислотами) [40]. С другой стороны, усиленное образование аполипопротеина А-I (ApoA-I) в указанные сроки, наоборот, может препятствовать имплантации, что было продемонстрировано в контингенте пациенток с эндометриозом [45].

Кроме того, для оценки рецептивности эндометрия отдельные специалисты предлагают использовать не только определение уровней тех или иных биологически активных веществ (секретомику и протеомику), но и молекулярно-генетические методы (геномику). С помощью последних изучают экспрессию генов, функция которых связана с клеточным метаболизмом, железистой секрецией, дифференцировкой клеток, межклеточной коммуникацией, адгезией, механизмами репарации и регуляции протеолиза [35, 141]. В литературе имеются сообщения о том, что для оценки способности эндометрия обеспечивать успешную имплантацию полезно исследовать экспрессию генов Ced-3, Ced-4, Bcl-2, Bax, Fas, TNFα, которые влияют на баланс между апоптозом и пролиферацией [42]. При нарушениях экспрессии перечисленных генов могут происходить сбои в механизмах регуляции апоптоза, что приводит к снижению готовности эндометрия к имплантации бластоцисты [42].

Высказываются также предложения определять экспрессию HOX-генов, кодирующих транскрипционные факторы, контролирующие программы формирования органов и тканей. По данным ряда авторов [137], экспрессия

HOXA-10 гена, (участвующего в регуляции роста, дифференциации и рецептивности эндометрия) оказывается сниженной в период «окна имплантации» у пациенток с подтвержденной безуспешностью имплантации. Предполагается, что снижение экспрессии HOXA-10 (спровоцированное, например, его гиперметилированием) может приводить к устойчивости действия прогестерона в эндометрии, т.к. в норме HOX-гены модулируют многие функции прогестерона [48]. Данный механизм сохранения устойчивости действия прогестерона может объяснять случаи неудачи терапии, направленной на повышение рецептивности эндометрия у пациенток с безуспешной имплантацией в анамнезе.

Следует отметить, что в литературе есть сообщения, в которых их авторы предлагают выполнять молекулярно-генетическое исследование биоптата эндометрия на предмет экспрессии сразу 238 генов. Рекомендуемый к тестированию массив генов (представленных в одном генетическом чипе) выбран этими специалистами в результате предварительно проведенного анализа диагностической значимости каждого из них для оценки рецептивности эндометрия. Данный метод, получивший название Endometrial Receptive Arrey (ERA), по мнению его разработчиков, позволяет подтвердить наличие удовлетворительной рецептивности в конкретном образце эндометрия со специфичностью 88% и чувствительностью 99% [58, 73].

Приходится констатировать, что авторы, описывающие множество молекулярных и генетических факторов, контролирующих эндометриальный гомеостаз, сами же признают, что до настоящего времени не имеют четкого представления, как все эти факторы взаимодействуют друг с другом [6, 10]. Остается неясным, насколько отклонения какого-то одного из молекулярно-генетических маркеров эндометриальной рецептивности могут быть компенсированы изменениями других регуляторов эндометриального гомеостаза. По этой причине вопрос о том, какой из регуляторов эндометриального гомеостаза может быть надежным маркером эндометриальной рецептивности и, соответственно, использован для

объяснения случаев БНГ, связанных с эндометриальным фактором остается открытым.

6) БНГ и иммунные нарушения.

Отдельные специалисты акцентируют внимание на роли в патогенезе БНГ разного рода иммунных нарушений. Выше мы уже отмечали, что такие нарушения могут ассоциироваться с аутоиммунным оофаритом, проявляемым в виде скрытой ПНЯ. Однако при аутоиммунных процессах могут страдать и другие структуры репродуктивной системы. Так, в сообщении Е.П.Келлэт [9] отмечается связь между снижением рецептивности эндометрия у лиц с БНГ и отклонениями в субпопуляционном профиле лимфоцитов, которые проявляются в увеличении и повышении активности фракции натуральных киллеров, оказывающих цитотоксические эффекты. Ослабление адгезивных свойств эндометрия, препятствующее нормальной имплантации эмбриона, может быть спровоцировано и гуморальными аутоиммунными реакциями, реализуемыми антифосфолипидными антителами [148]. Также аутоантитела могут поражать рецепторы к ФСГ, следствием чего становится недостаточно выраженная ответная реакция яичников при их гонадотропиновой стимуляции [147, 162].

Кроме того, во многих публикациях сообщается, что у женщин с различными аутоиммунными заболеваниями (в особенности, с аутоиммунным тиреоидитом) часто имеет место снижение фертильности [97, 99]. Полагают, что это может быть связано с перекрестными гуморальными и клеточными реакциями, при которых могут страдать структуры репродуктивной системы, ассоциируемые с осью гипоталамус-гипофиз-яичники и с эндометрием [13, 169].

7) БНГ и слабо выраженный мужской фактор бесплодия.

Нельзя исключить, что под маской БНГ может скрываться и слабо выраженный мужской фактор бесплодия, связанный, например, с мужскими антиспермальными антителами (АСАТ). Антитела, направленные против антигенов мембраны сперматозоидов, провоцируют функциональные

нарушения сперматозоидов при капацитации, акросомальной реакции, затрудняют процесс проникновения сперматозоидов через cumulus и/или zona pellucida и их взаимодействие с яйцеклеткой, что снижает фертильность спермы [4, 107]. Как правило, не обнаруживается взаимосвязи между наличием мужских АСАТ и снижением концентрации или подвижности сперматозоидов, т.е. нормальные показатели спермограммы не исключают наличия мужского иммунологического бесплодия, ассоциируемого с АСАТ [95, 116].

Помимо указанных вероятных причин БНГ, кандидатами на роль его этиологических факторов выступают и молекулярно-генетические особенности, лежащие в основе расстройств в репродуктивной системе, связанных с эмбриональным фактором [102, 182]. Значение генетических аномалий, препятствующих созреванию ооцитов, их оплодотворению и последующему эмбриональному развитию, в патогенезе БНГ и их влияние на результаты его лечения с использованием ЭКО прицельно рассматриваются нами во втором разделе данного обзора (см. ниже Глава 1.2).

Таким образом, у пациенток с диагнозом БНГ набор предполагаемых причинных факторов бесплодия оказывается весьма гетерогенным. Можно ожидать, что по мере изучения значимости в патогенезе БНГ таких факторов и совершенствования их диагностики будет происходить сокращения общего числа лиц с диагнозом БНГ за счет их перемещения в группы с более понятными механизмами реализации наблюдаемых расстройств в репродуктивной сфере.

Частота естественного зачатия, ведущего к рождению живого ребенка у пар с БНГ, достаточно низкая и в среднем составляет 1,1-3,8% на цикл, прогрессивно снижаясь по мере увеличения возраста пациенток и продолжительности бесплодия [102]. При этом эффективность попыток преодоления бесплодия у пациентов с БНГ с помощью разнообразных вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), как правило, заметно уступает результатам, получаемым при лечении других типов бесплодия:

частота наступления беременности у пациенток с БНГ не высока и варьирует в диапазоне 10-20% на цикл [126, 131].

Для объяснения причин весьма скромных результатов лечения с применением ЭКО у женщин с БНГ предлагается достаточно много версий.

Так, в литературе можно найти сообщения о снижении при БНГ количества полученных в программах ЭКО/ИКСИ фолликулов и ооцитов на фоне более высокой, чем в контроле, курсовой дозе расходуемого экзогенного ФСГ в составе препаратов гонадотропинов. Эти наблюдения дают основания предположить, что у женщин с БНГ имеет место тенденция к редукции овариального резерва, которая увеличивает риск «бедного» ответа на гонадотропиновую стимуляцию в программах ЭКО [98, 153, 183].

Заслуживает внимания, что отдельные специалисты полагают, что возможной причиной субоптимального/бедного ответа яичников на гонадотропиновую стимуляцию у лиц с БНГ является не редукция овариального резерва (количественное уменьшение фолликулов), а рецепторные дефекты женских гамет, при которых отмечается снижение чувствительности специфических ФСГ-рецепторов (ФСГ-R) клеток гранулезы растущих фолликулов к ФСГ. Такое нарушение может быть следствием полиморфизма гена, кодирующего ФСГ-R [152, 157]. Показано, что полиморфизм гена ФСГ-R может потребовать значительного увеличения курсовой дозы ФСГ, которое, однако, не гарантирует обеспечение оптимальных количественных параметров управляемого фолликулогенеза [33, 57, 108].

Также возможно поражение ФСГ-R аутоантителами, что будет приводить к первично-яичниковой недостаточности и резистентности к гонадотропиновой стимуляции [147].

При ослабленной реакции на гонадотропиновую стимуляцию, независимо от ее причины (связанной с редукцией овариального резерва или падением чувствительности ФСГ-рецепторов из-за их полиморфизма или поражения аутоантителами) количество извлекаемых фолликулов из яичников

уменьшается. Следствием этого становится уменьшение числа выделяемых из фолликулов яйцеклеток, что ведет к синхронному снижению количества получаемых зрелых и правильно оплодотворенных ооцитов, а также пригодных для переноса бластоцист. Вполне очевидно, что ухудшение количественных параметров раннего (дотрансферного) эмбриогенеза ассоциируется с затруднениями выполнения этапа ПЭ, что в конечном итоге снижает терапевтическую эффективность ЭКО, оцениваемую по показателю клинической ЧНБ [16].

Отмечаемая при БНГ низкая терапевтическая эффективность ЭКО возможно связана с генетическими аномалиями контроля гаметогенеза в критически важные моменты процессов развития и созревания ооцитов, оплодотворения, раннего эмбриогенеза, имплантации эмбриона и его посттрансферного развития [102, 182]. На практике нарушения гаметогенеза могут запускать целый каскад неблагоприятных последствий, среди которых можно выделить:

- ослабленный ответ фолликулов на гонадотропиновую стимуляцию и недостаточно активное созревание ооцитов;

- снижение способности ооцитов к оплодотворению, а зигот – к дроблению;

- нарушение доимплантационного развития и гибель эмбрионов;

- снижение имплантационного потенциала переносимых эмбрионов;

- нарушения пострансферного развития успешно имплантировавшихся эмбрионов.

На каждом из перечисленных этапов аномалии гаметогенеза могут иметь относительно независимые причины. Но с очень большей вероятностью они могут быть ассоциированы с аномалиями вполне определенных генов, определяющих репродуктивный потенциал женских гамет и образуемых из них эмбрионов [102, 181].

1.2. Молекулярно-генетические механизмы в патогенезе БНГ и их влияние на показатели ЭКО в до- и посттрансферном периодах

Молекулярно-генетические особенности, лежащие в основе расстройств в репродуктивной системе, связанных с эмбриональным фактором, в последнее время подвергаются особенно интенсивному изучению [102, 181]. Исследования генетических основ нарушений женского гаметогенеза и формирования структур яичников помогают расширить фундаментальные представления о механизмах бесплодия, которые могут быть ответственны за нарушения в репродуктивной сфере у части пациенток с БНГ. Получаемые при этом результаты могут помочь усовершенствовать тактику ведения лиц с БНГ с учетом конкретных характеристик, получаемых с помощью соответствующих молекулярно-генетических методов.

Генетические дефекты ооцитов, приводящие к бесплодию и ухудшающие показатели, характеризующие эффективность выполняемых программ ЭКО, включают выраженные хромосомные аномалии (анеуплоидии), субмикроскопические хромосомные делеции и дупликации, а также вариации нуклеотидных последовательностей в ДНК отдельных генов, контролирующих огромное количество биологических процессов [171, 175, 181, 185, .

Анеуплоидии являются следствием нарушений, возникающих из-за ошибок расхождения хромосом во время мейотичекого деления ооцитов [53]. Анеуплоидия представляет собой феномен, при котором образующиеся клетки содержат число хромосом, некратное гаплоидному (одинарному). Анеуплоидии делят на трисомии (2n+1), тетрасомии (2n+2), двойные трисомии (2n+1+1), моносомии (2n-1) и нуллисомии (2n-2). Аутосомные моносомии обычно погибают до срока клинического подтверждения беременности, трисомии обусловливают тяжелые поражения плода и часто сопровождаются самопроизвольным прерыванием беременности. Некоторые аутосомные трисомии и анеуплоидии по половым хромосомам совместимы с

жизнью, самая частая из них – трисомия по 21-й хромосоме (синдром Дауна) [85].

Известно, что у женщин мейоз инициируется во время внутриутробного развития плода, останавливается на стадии профазы I перед рождением девочки и возобновляется только в процессе овуляции во взрослом возрасте и происходит циклически вплоть до менопаузы [53]. При этом следует принять во внимание, что в процессе гаметогенеза ооциты более подвержены ошибкам, чем сперматоциты. Поэтому большинство анеуплоидий, обнаруживаемых у эмбрионов человека, происходят из яйцеклетки, а не из сперматозоида [171]. Например, известно, что 88% трисомий по 21-й хромосоме имеют материнское происхождение, 8% - отцовское и 4% возникают вследствие ошибок митоза на ранних стадиях развития эмбриона [111]. Отмеченные закономерности, вероятно, связаны с тем, что регуляция частоты кроссинговера (обмена участками гомологичных хромосом во время конъюгации в профазе первого деления мейоза) менее строго контролируется у женщин, что потенциально может влиять на увеличение числа яйцеклеток с аномальным количеством хромосом [70, 123].

Одним из материнских факторов анеуплоидии могут быть варианты гена RNF212, обусловливающие низкую частоту кроссинговеров в ооцитах [111]. Для начала мейотической рекомбинации создаются разрывы двойной нити ДНК, затем набираются протеины для репарации и формируются локусы рекомбинации. Мутации или полиморфизм генов этих протеинов могут вызывать нарушения синапсов хромосом. Гены MSH4, VSH5, TEX11, HEI10, RNF12 TRIP13 являются кандидатами в отношении регуляции материнской рекомбинации у человека и потенциальными факторами риска повышенной частоты анеуплоидии в ооцитах [111]. Таким образом, можно предположить существование генетической предрасположенности к нарушениям процессов мейотического деления ооцитов, которые сопровождаются возрастанием доли анеуплоидных ооцитов, что препятствует успешной реализации репродуктивной функции из-за дефектов образуемых из таких ооцитов

эмбрионов, обладающих низким потенциалом к имплантации и последующему нормальному развитию.

В модельных экспериментах на животных также было обнаружено достаточно много (более тысячи) других генов, контролирующих важные процессы в репродуктивной сфере, однако лишь небольшая их часть (менее 200) при наличии в них аномалий устойчиво ассоциировалась с бесплодием человека [3, 113, 125]. Исследования последних лет, опирающиеся на данные полноэкзомного и полногеномного секвенирования, привели к открытию новых, а также вариантов уже известных генов, нарушения которых ассоциируются с невозможностью успешного зачатия или вынашивания беременности [102, 181].

Известно, что формирование репродуктивного потенциала у плода женского пола основано на закладке ооцитов, возникших из первичных половых клеток в ходе эмбрионального развития. Определяющая роль в этом процессе отведена циклам митотического и мейотического деления, ключевые этапы которых регулируются на генетическом уровне [82]. Установленные на сегодняшний день гены-регуляторы клеточного деления можно разделить на 2 группы: гены, контролирующие нормальное течение мейоза, и гены, отвечающие за процессы репарации ДНК [62, 63]. Основную роль в ходе мейоза в обеспечении его адекватного течения играют гены, контролирующие коньюгацию и сегрегацию хромосом, такие как: SYCP3, NUP107, PSMC3IP, CEP57, SGO2, SMC1B, BUB1B [22, 129]. Кроме того, ген BUB1B отвечает за сборку веретена деления [3].

В зависимости от характера и локализации конкретных дефектов в генах-регуляторах клеточного деления, и из-за нарушений процессов репарации ДНК у пациенток могут развиваться достаточно серьёзные нарушения в репродуктивной сфере. Установлено, что в эмбриональном периоде при закладке структур репродуктивной системы выраженные отклонения на этапах клеточного деления приводят к дисгенезии женских гонад и полному отсутствию в них фолликулярного аппарата, что в

последующем клинически проявляется первичной аменореей и неспособностью яичников отвечать на гонадотропиновую стимуляцию [94, 176]. Менее значительные генетические аномалии проявляются в виде синдрома преждевременного истощения яичников и синдрома пустых фолликулов [129]. Кроме того, у пациенток с дефектами генов-регуляторов клеточного деления в процессе лечения бесплодия с помощью ЭКО наблюдается ухудшение фертилизации ооцитов, торможение развития эмбрионов, увеличение частоты ранних репродуктивных потерь, а также отмечается повышенный риск передачи аналогичных генетических дефектов потомкам [36, 79].

В ходе окончательного созревания яйцеклеток важную роль играют сигнальные взаимодействия между клетками гранулезы и ооцитами. К субстанциям, осуществляющим такое межклеточное взаимодействие, относят костный морфогенетический белок-15 (BMP-15), который является представителем суперсемейства факторов роста из группы трансформирующего фактора роста-β (TGF-β) и является регулятором многих тканевых процессов [128]. Показано, что гены BMP15 и GDF9 экспрессируются в созревающих ооцитах и вовлечены в каскады регуляторных воздействий, обеспечивающих адекватную пролиферацию и дифференцировку клеток гранулезы [100]. При этом GDF9 является одним из наиболее важных генов, отвечающих за трансформацию первичного фолликула во вторичный, тогда как ген BMP15 обеспечивает регуляцию чувствительности рецепторов клеток гранулезы к ФСГ, а также рост фолликула в гормон независимую фазу [144]. Дефекты генов BMP15 и GDF9 проявляются либо в виде образования незрелого ооцита, либо полного отсутствия ооцита, что клинически характеризуется так синдром пустого фолликула [128, 144]. Полагают, что нарушения генетического контроля продукции BMP15 могут ассоциироваться с возрастанием риска преждевременного истощения яичников, а при выполнении программы ЭКО такие же генетические аномалии вероятно способны провоцировать

ослабление ответа на гонадотропиновую стимуляцию и снижать имплантационный потенциал развивающихся эмбрионов [30, 127].

В ходе достаточно длительного процесса созревания ооцитов, особенно на этапе 1-го (редукционного) деления мейоза, чрезвычайно велика вероятность появление различных генетических ошибок, которые приводят к образованию анеуплоидных ооцитов [111, 149]. В норме, большая часть таких нарушений компенсируется в ходе репарации ДНК, регулируемой генетически. При этом гены репарации ДНК являются тканеспецифичными, что лежит в основе многообразия клинических проявлений дефектов этих генов: от выраженных синдромов до локальных нарушений на уровне различных органов и тканей [3, 77]. Полагают, что количество эуплоидных эмбрионов, получаемых из зрелых ооцитов после оплодотворения, зависит от наличия и функционирования генов репарации яичниковой ткани, к которым относятся MCM8, MCM9, XRCC4, MSH5, BRCA2 и др. [62, 111]. У пациенток с дефектами генов репарации значительно увеличивается количество получаемых анеуплоидных эмбрионов даже при наличии сохранного овариального резерва и фертильности [185].

Большое количество обнаруживаемых нуклеотидных изменений представлено точечными мутациями (транзициями и микроделециями) в генах группы созревания ооцитов (OOMD). Эта группа включает различные гены, как мейоз-специфические, так и неспецефические, объединенные в соответствие с патологией, развивающейся при их дефекте. В основном гены группы OOMD несут функции, связанные с регуляцией транскрипционных процессов. Например, гены PANX I и PATL кодируют белки, участвующие в снятии блока М-1 [88, 49, 112, 170]. Ген TUBB8 кодирует β-тубулин и обеспечивает формирование метафазной пластинки при делении клетки, что необходимо для сборки веретена деления [50]. В ооцитах пациенток-носителей аномальных вариантов этого гена веретено деления или не собирается вовсе, или оказывается организованным с дефектами разной степени выраженности. В таких случаях отделения полярного тельца обычно

не происходит. И даже если первое полярное тельце отделяется, то после оплодотворения яйцеклетки с указанным генетическим дефектом полученные из нее эмбрионы не развиваются дальше стадий 4-8 бластомеров [66, 67].

К группе OOMD относят и такие гены, которые напрямую контролируют построение структурных элементов, играющих важную роль в созревании ооцитов и обеспечении их способности к фертилизации [170]. Такой функцией обладают гены, которые кодируют гликопротеины, являющиеся важнейшими структурными компонентами блестящей оболочки ооцита и обеспечивающими поддержание ее физиологических функций [87]. Хорошо известно, что на эффективность оплодотворения ооцитов влияет способность сперматозоидов распознавать кумулюсные клетки и проходить лучистый венец (corona radiate) в направлении блестящей оболочки (zona pellucida). При этом успеху фертилизации способствует активное рецепторное взаимодействие между сперматозоидом и блестящей оболочкой ооцита, обеспечивающее их связывание между собой, пенетрацию оболочки и последующую активацию ооцита [61, 102, 174]. Распознавание и прикрепление сперматозоидов, а также их последующее проникновение в ооцит обеспечивают входящие в состав блестящей оболочки гликопротеины: ZP1, ZP2, ZP3 и ZP4, которые кодируются одноименными генами [103, 124]. При дефектах генов ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 происходит либо дегенерация ооцита еще до оплодотворения, либо возникает блок оплодотворения [115, 163]. Так, показано, что аутосомное рецессивное носительство дефектов генов ZP1 у женщин ассоциировано с отсутствием zona pellucida вокруг ооцитов, что приводит к их дегенерации еще до наступления овуляции [87]. У женщин с патологическими вариантами нуклеотидных последовательностей гена ZP2 наблюдается дисфункция zona pellucida (нарушение рецепторного взаимодействия между zona pellucida и сперматозоидом) [56, 106]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что у гетерозиготных носителей аномальных вариантов генов ZP3, ZP4 обнаруживаются фолликулы, не содержащие ооцитов [52].

Еще одним представителем группы генов OOMD является ген WEE2, который присутствует исключительно в ооцитах [145, 150]. Причем экспрессия гена WEE2 достигает максимума к моменту овуляции. Данный ген вовлечен в обеспечение целого ряда очень важных процессов, к которым относят поддержание покоя на стадии GV, снятие мейотического блока, завершение мейоза, отделение второго полярного тельца, созревание ооцита и формирование пронуклеусов. Действие этого гена локализовано в строго определенных компартментах ооцитов, что обеспечивает эффективный контроль цепи процессов мейоза [83, 145].

В клинической практике зафиксированы случаи многократно повторяемых неудачных попыток оплодотворения с применением технологии ИКСИ, в которых не удавалось получить полноценную зиготу.

Для объяснения природы таких случаев в исследованиях последних лет с применением полноэкзомного секвенирования предпринимались попытки обнаружить нуклеотидные полиморфизмы гена WEE2, ответственные за неудачи оплодотворения у человека. При этом действительно были обнаружены дефекты гена WEE2 и его гомозиготные мутации, приводящие к нарушениям активации ооцитов и аресту их оплодотворения. Таким образом, удалось подтвердить, что ооциты пациенток с аномальными вариантами гена WEE2 действительно неспособны к оплодотворению из-за невозможности завершить выход из метафазы второго деления мейоза (MII) и образовать второе полярное тельце (PB2) [150].

В практике программ ЭКО при культивировании в дотрансферном периоде часть эмбрионов останавливается в развитии, не «доживая» до 5-го дня, т.е. до стадии бластоцисты. Этот феномен считается проявлением естественного отбора, т.е. своего рода нормой, когда погибают нежизнеспособные эмбрионы [161]. Логично предположить, что естественный отбор при культивировании in vitro полезен, поскольку его результатом становится предотвращение переноса дефектных эмбрионов. Однако на практике могут наблюдаться случаи, когда у молодых женщин при

выполнении эмбриологической части программы ЭКО вообще не удается получить ни одного эмбриона, пригодного для ПЭ, т.е. когда эмбриональная летальность становится тотальной [20]. К группе генов преимплантационной летальности бластоцист (PREMBL) относят гены TLF6, NLRP2 NLRP5, кодирующие ферменты и белки-регуляторы, которые участвуют в первых дроблениях эмбриона [34, 120]. Также к этой группе относят ген PAD16, участвующий не только в регуляции процесса бластуляции на доимплантационном этапе, но и контролирующий в посттрансферном периоде формирование нервной трубки развивающегося эмбриона [133, 177].

Возможно, что из-за нарушений указанных генов группы PREMBL после успешного оплодотворения и образования зиготы в среднем у 30% генерированных эмбрионов наблюдается остановка развития на стадии дробления [34, 120]. Кроме того, преимлантационной гибели эмбрионов вероятно способствует то обстоятельство, что сразу после оплодотворения геном зиготы транскрипционно неактивен и первые стадии дробления зависят исключительно от функционирования материнских генов, которые кодируют многочисленные цитоплазматические факторы, поддерживающих гомеостаз в образующихся бластомерах [105, 109, 179]. При этом активация собственных генов эмбриона, происходящая на последующих стадиях дробления, должна осуществляться своевременно, поскольку именно эти гены участвуют в ремоделировании хроматина и регуляции основных направлений будущей дифференцировки клеток. Полагают, что своевременная активация собственных эмбриональных генов, таких TLE6, NLRP2, NLRP5 и PAD16 является одним из критических этапов формирования эмбриона, поскольку в противном случае наблюдается блок его развития [106, 120, 133, 177]. В этих же сообщений указывается, что дефекты перечисленных генов оказались ответственными за остановку развития эмбриона на стадии дробления (2-3-и сутки культивирования), а также за отсутствие имплантации эмбриона после переноса его в полость матки.

Таким образом, функцию репродукции у человека обеспечивает большое число генов, играющих ведущую роль в фундаментальных процессах дифференцировки клеток, внутри – и межклеточных сигнальных взаимодействий, обладающих тканевой специфичностью, а также регулирующих слаженную работу различных органных систем. Глубина дисбаланса физиологических процессов и степень его клинических проявлений зависят от характера и выраженности генетических дефектов. Повреждения разных генов одного (общего) сигнального пути могут приводить к одинаковым нарушениям, а дефекты одного и того же гена, но локализованные на разных участках цепи его ДНК, способны вызывать целый спектр разнообразных регуляторных нарушений.

В зависимости от конкретных функций тех или иных генов, при их аномалиях могут отмечаться нарушения в функционировании, как эндометрия, так и яичников. В приложении к генетическим нарушениям, которые ассоциируются именно с отклонениями в женским гаметогенезе и эмбриогенезе, следует отметить, что чем более ранние этапы фолликуло- и оогенеза затронуты действием дефектного гена, тем шире диапазон возможных неблагоприятных репродуктивных последствий. В силу большого разнообразия генов-кандидатов, ответственных за те или иные нарушения, ассоциируемые с эмбриональным фактором женского бесплодия, однозначно говорить о роли каждого из них в отдельности – непростая задача. Однако постоянно растущее число исследований с применением полноэкзомного секвенирования позволяет существенно пополнить цепочку причинно-следственных связей.

Внедрение современных высокотехнологичных методов генетических исследований в практику в дополнение к рутинным процедурам ВРТ становится все более перспективным и актуальным подходом, обещающим улучшить терапевтические исходы при лечении бесплодия неясного генеза. Ожидается, что соответствующие молекулярно-генетические исследования, характеризующие эмбриональный фактор диагностируемой женской

инфертильности, помогут составить более четкое представление о патогенетических механизмах некоторой части наблюдаемых случаев БНГ. Можно не сомневаться, что прогресс в понимании фундаментальных причин вариантов БНГ, ассоциируемых с нарушением контроля женского гаметогенеза и эмбриогенеза, предоставит более широкие возможности прогнозирования эффективности существующих лечебных программ ЭКО, помогая определяться в вопросе о возможности использования собственных ооцитов пациентки или целесообразности их замены на ооциты донора.

Глава 2
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования: критерии включения в исследование и порядок его проведения, число и распределение обследованных больных.

Настоящая работа была выполнена на базе Министерства здравоохранения Московской области государственного бюджетного учреждение здравоохранения Московской области «Московского областного института акушерства и гинекологии имени академика В.И. Краснопольского» (ГБУЗ «МО МОНИИАГ им. акад. В.И. Краснопольского») при участии пациенток, проходивших лечение бесплодия в отделении репродуктологии в период с января 2019 г. по январь 2020 г.

Для решения поставленных в работе задач из общего контингента больных бесплодием не старше 35 лет, проходивших лечение в указанном периоде (n=1006), по результатам исходного стандартного обследования под наблюдение было взято (рис. 1):

- 314 женщин с диагнозом «чистого» (т.е. не сочетаемого с другими возможными причинами инфертильности) трубно-перитонеального бесплодия (ТПБ), которые составили **контрольную группу**;

- 58 женщин с бесплодием неясного генеза (БНГ), включенных в **основную группу**.

Из когорты пациенток контрольной группы, у которых после начала нашего исследования по факту удалось добиться наступления клинической беременности после проведения «стартовой» попытки ЭКО, было неселективно отобрано 50 пациенток для включения в условно названную **«идеальную» группу** для составления их «генетического портрета» по генам, относящихся к группам:

- OMD: гены ZP1 (11q12/2); ZP2 (16p2.3-12.2); ZP3 (7q11.23); WEE2 (7q.34); PATL2 (15q21.1); TUBB8 (15q21.1);
- PREMBL: гены TLE6 (19p13.3); PAD16 (1p36.13);

- TGF_{β}: BMP15 (Xp11.22).

Такой генетический потрет (рис. 2), отображающий особенности (пиковую интенсивность) флюоресценции тестируемых последовательностей нуклеотидов, относимых к перечисленным генам у женщин «идеальной группы», рассматривался нами как «эталонный». Эталонность (т.е. идеальность) указанного генетического портрета аргументируется тем, что он был получен от лиц, у которых на практике была продемонстрирована 100% терапевтическая эффективность (по критерию наступления клинической беременности) процедуры ЭКО, причем при первой же попытке ее использования.

С учетом наличия или отсутствия у 58 включенных в основную группу женщин с БНГ отклонений генов OOMD/PREMBL/TGF_{β} (выявляемых при сопоставлении с «эталонным» генетическим портретом) все эти больные были распределены в соответственно в **I и II исследуемые группы**, насчитывавшие 32 и 26 женщин. Сопоставление результатов, полученных в I и II исследуемых группах при исходном стандартном обследовании и в процессе выполнения программы ЭКО, позволяло наглядно продемонстрировать, насколько существенно влияет на любые из изученных параметров наличие или отсутствие отклонений от «эталонного» генетического портрета по генам OOMD/PREMBL/TGF_{β}.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Стандартные методы исследования, использованные до начала выполнения программы ЭКО.

Набор и порядок использования диагностических процедур, примененных при исходном обследовании общего потока инфертильных женщин, проходивших лечение в МОНИИАГ в период выполнения диссертационной работы, соответствовал регламентирующим положениям Приказа МЗ РФ от 30 августа 2012 г №107н «О порядке использования

вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» [25].

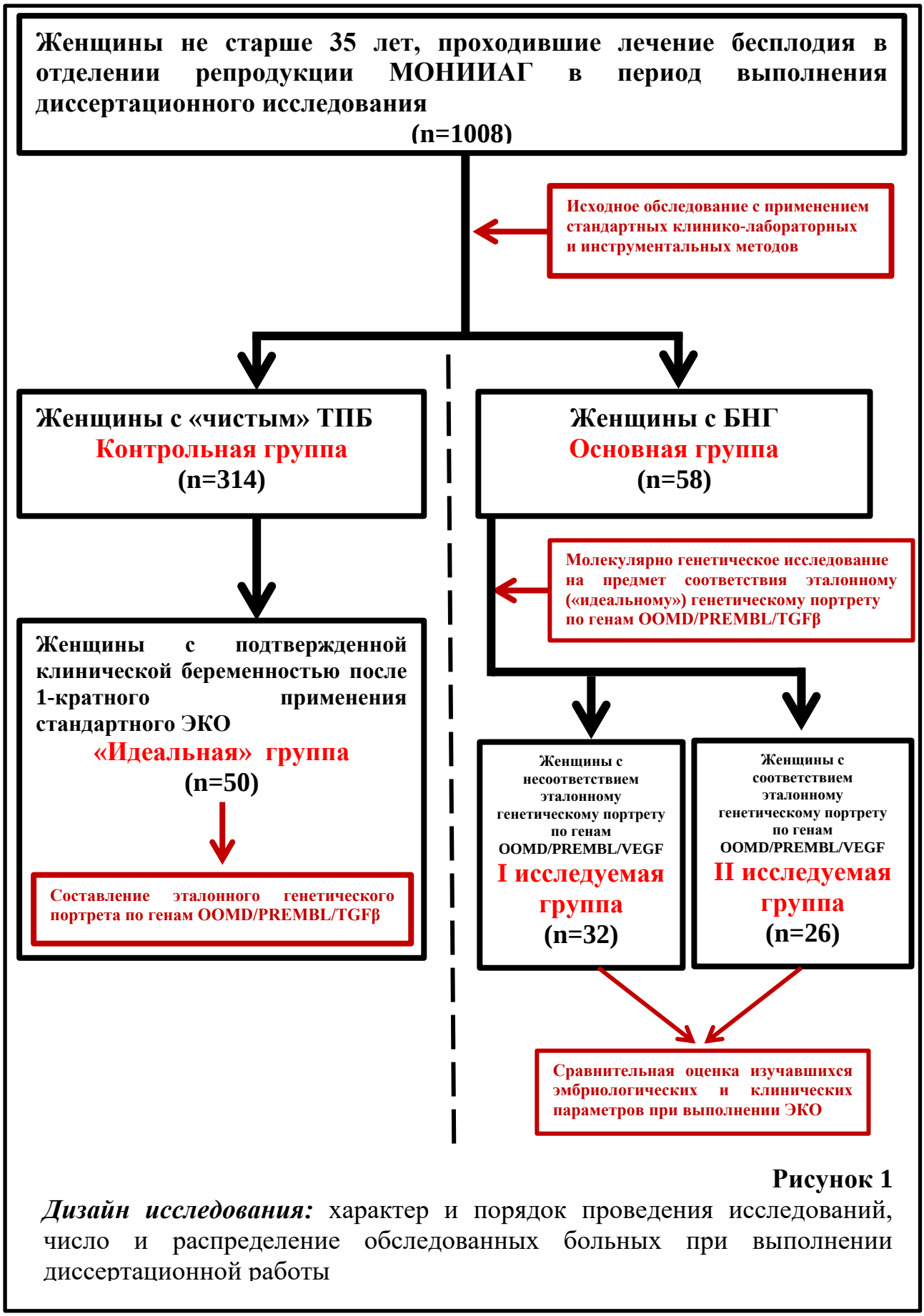

Рисунок 1

Дизайн исследования: характер и порядок проведения исследований, число и распределение обследованных больных при выполнении диссертационной работы

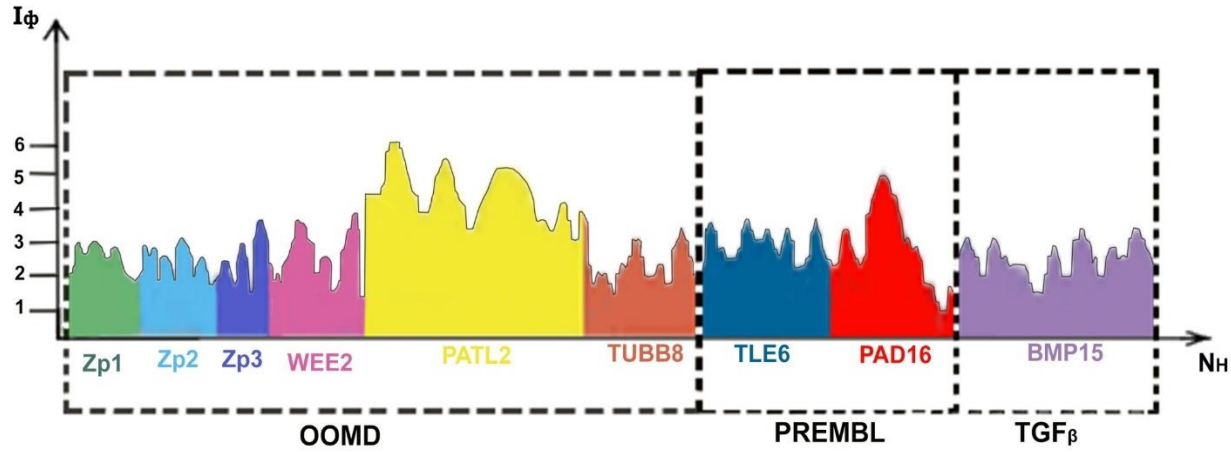

Рисунок 2

Генетические особенности («эталонный генетический портрет») по изучавшимся генам OOMD/PREMBL/TGFβ пациенток «идеальной» группы (женщин не старше 35 лет с «чистым» ТПБ и подтвержденной терапевтической эффективностью 1-кратного использования стандартного ЭКО).

По результатам исходного обследования проходил отбор «профильных» больных, включаемых в контрольную или в основную группы (т.е. осуществлялся отбор пациенток не старше 35 лет исключительно с «чистым» ТПБ или БНГ).

Исходное стандартное обследование женщины включало:

- сбор анамнеза (у пациенток, проходивших в прошлом лечение по поводу бесплодия и/или любых заболеваний, потенциально негативно влияющих на репродуктивную систему, уточняли характер оказанной помощи);
- первичный осмотр;
- рутинное бимануальное гинекологическое исследование и осмотр шейки в зеркалах (при необходимости проводили простую и расширенную кольпоскопию);
- УЗИ матки и яичников;
- гормональную оценку состояния репродуктивной системы (определение базальных значений E_2, ФСГ, ЛГ, соотношения ЛГ/ФСГ),)

и характеристику овариального резерва по гормональным (уровню АМГ) и ультразвуковым критериям;

- общий и биохимический анализ крови, оценку состояния системы гемостаза (тестирование протромбинового индекса, времени свертывания и длительности кровотечения), определение уровня глюкозы натощак, общий анализ мочи;
- инфекционный скрининг (влагалищных мазков и цервикального материала); анализ крови на ВИЧ, австралийский антиген, RW; определение в крови антител к инфекции, входящей в TORCH-комплекс (токсоплазмоз, краснуха, цитомегаловирус, герпес);
- эндоскопические методы (гистеро- и лапароскопию).

У женщин с нарушениями менструальной функции в дополнение к указанным выше гормональным исследованиям назначали определение в крови общего тестостерона, дегидроэпиандростерона сульфата и пролактина, а при подозрении на тиреоидную патологию тестировали уровни трийодтиронина (T_3), тироксина (T_4) и тиреотропного гормона (ТТГ),

В обязательном порядке принимали во внимание заключение терапевта о состоянии соматического здоровья пациентки и отсутствии у нее противопоказаний к беременности и родам.

Обследование мужчины предусматривало 2-кратный (с интервалом в 2 недели) анализ спермы с оценкой ее фертильности по критериям ВОЗ [15].

Состояние овариального резерва у пациенток контрольной и основной групп оценивали по гормональным маркерам (уровню АМГ) и результатам УЗ-исследования яичников, при котором проводили подсчет базального числа малых антральных фолликулов диаметром до 10 мм (чАФ) в обоих яичниках. Перечисленные гормональные и УЗ-маркеры овариального резерва рассматривали в качестве предикторов нормального (адекватного), бедного (гипоергического) и чрезмерного (гиперергического) ответа на планируемую гонадотропиновую стимуляцию в циклах ЭКО (табл.1). С учетом вероятного характера ответа яичников на гонадотропины, прогнозируемого на основе

данных, полученных при оценке овариального резерва, заранее определялись с выбором:

- оптимальной стартовой дозы ФСГ в составе препаратов гонадотропинов;

- протокола, в рамках которого предусматривалось использование агонистов или антагонистов ГнРГ, назначаемых для десенситизации аденогипофиза с целью предотвращения паразитарных пиков ЛГ при стимуляции суперовуляции;

- препаратов гонадотропинов, которые могли представлять из себя «чистый» (рекомбинантный) ФСГ (Гонал-Ф) или комбинацию мочевых ФСГ и ЛГ (Хумог).

Таблица 1

Значения маркеров овариального резерва, используемые в качестве предикторов характера ответа на гонадотропины в стимулируемых циклах ЭКО [19, 159]

Маркер овариального резерва	**Характер ответа яичников при стимуляции суперовуляции**		
	нормергичекий (адекватный)	гиперергичекий (чрезмерный)	гипоергический (бедный)
АМГ, нг/мл	1 - 2,5	> 2,5	< 1
Базальное число антральных фолликулов диаметром 2-10 мм (в обоих яичниках)	7 - 15	> 15	< 7

2.2.2. Методы исследования, использованные в период выполнения программы ЭКО.

Гормональные исследования в период выполнения программы ЭКО предусматривали мониторинг уровня E_2 для подтверждения десенситизации аденогипофиза, а также (наряду с данными ультразвукового мониторинга роста фолликулов) для контроля эффективности используемых стимуляторов овуляции и расчета момента введения триггера овуляции чХГ.

Уровень прогестерона определяли в день введения разрешающей дозы чХГ и в пострансферном периоде (совместно с определениями E_2) для контроля эффективности мероприятий, связанных с поддержкой функции желтого тела в пострансферном периоде.

Ультразвуковые исследования в стимулированных циклах использовали для мониторинга активности индуцируемого фолликулогенеза в его активной фазе (ежедневно с 6-7 дня стимуляции) и для оценки прироста толщины эндометрия. На основании этих данных при необходимости проводили коррекцию (уменьшение или увеличение) суточной дозы

используемых гонадотропинов и рассчитывали время введение триггера овуляции чХГ (при достижении лидирующим фолликулом диаметра 18 мм).

Эмбриологические исследования после выполненной трансвагинальной пункции (ТВП) фолликулов включали:

- оценку степени зрелости выделенных ооцитов с расчетом % зрелых (MII) ооцитов в общей когорте яйцеклеток, полученных при ТВП;
- определение % правильно оплодотворенных ооцитов от общего числа полученных MII ооцитов (нормально оплодотворенными ооцитами считали зиготы с 2 пронуклеусами (2PN) в цитоплазме с симметрично расположенными проядрышками и двумя полярными тельцами (2PB) в перивителлиновом пространстве);
- оценку пригодности полученных бластоцист к переносу в полость матки по критерям D.Gardner [72] (хорошее качество констатировали у бластоцист с параметрами 2-4 AA, AB, BA, BB) и определение частоты бластуляции, отображающей % бластоцист хорошего качества, получаемых из правильно оплодотворенных MII ооцитов.

По результатам эмбриологичеких исследований в контрольной и основной группах определяли % СЦ, в которых имел место:

- **полный блок созревания ооцитов** (тотальное отсутствие ооцитов на стадии MII);

- **полный блок оплодотворения ооцитов** (неполучение ни одной зиготы после выполненной рутинной инсеминации или ИКСИ);

- **полный блок доимплантационного развития эмбрионов, т.е. бластуляции** (неполучение бластоцист из-за остановки развития эмбрионов на разных сроках 5-дневного инкубирования или тотальное отсутствие пригодных для переноса бластоцист из-за их ненадлежащего качества по критериям D.Gardner).

Для ***диагностики беременности*** определяли концентрацию

β-субъединицы ХГ на 14 день после переноса эмбрионов (ПЭ) для уточнения наличия/отсутствия «биохимической» беременности и выполняли УЗИ матки на 28 день после ПЭ для подтверждения «клинической» беременности. Наступление биохимической беременности рассматривали как успешность имплантации переносимых эмбрионов, а ее отсутствие трактовали как **блок имплантации**. Разницу между частотой биохимической и клинической беременности, т.е. потерю биохимически подтвержденной беременности, рассматривали как **блок раннего постимплантационного развития эмбрионов**.

Уточнение инцидентности перечисленных блоков, обусловливающих прекращение проведения лечебного цикла ЭКО в до- и пострансферном периодах (рис. 3), позволяло наглядно продемонстрировать, насколько негативно влияет наличие отклонений по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ на разные этапы выполняемой программы ЭКО и, в конечном итоге, на её терапевтическую эффективность, отображаемую показателем частоты наступления клинической беременности в % от числа выполненных стимулированных циклов (ЧНБсц).

2.2.3. Молекулярно-генетические методы исследования.

При выполнении работы молекулярно-генетические исследования были проведены:

- у 50 пациенток с «чистым» ТПБ и подтвержденным наступлением клинической беременности при 1-кратном стартовом использовании ЭКО (так называемая «идеальная группа») с целью создания «эталонного» генетического портрета по генам групп OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$;

- у 58 больных с БНГ с целью идентификации лиц с несоответствием и соответствием эталонному генетическому портрету по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$,

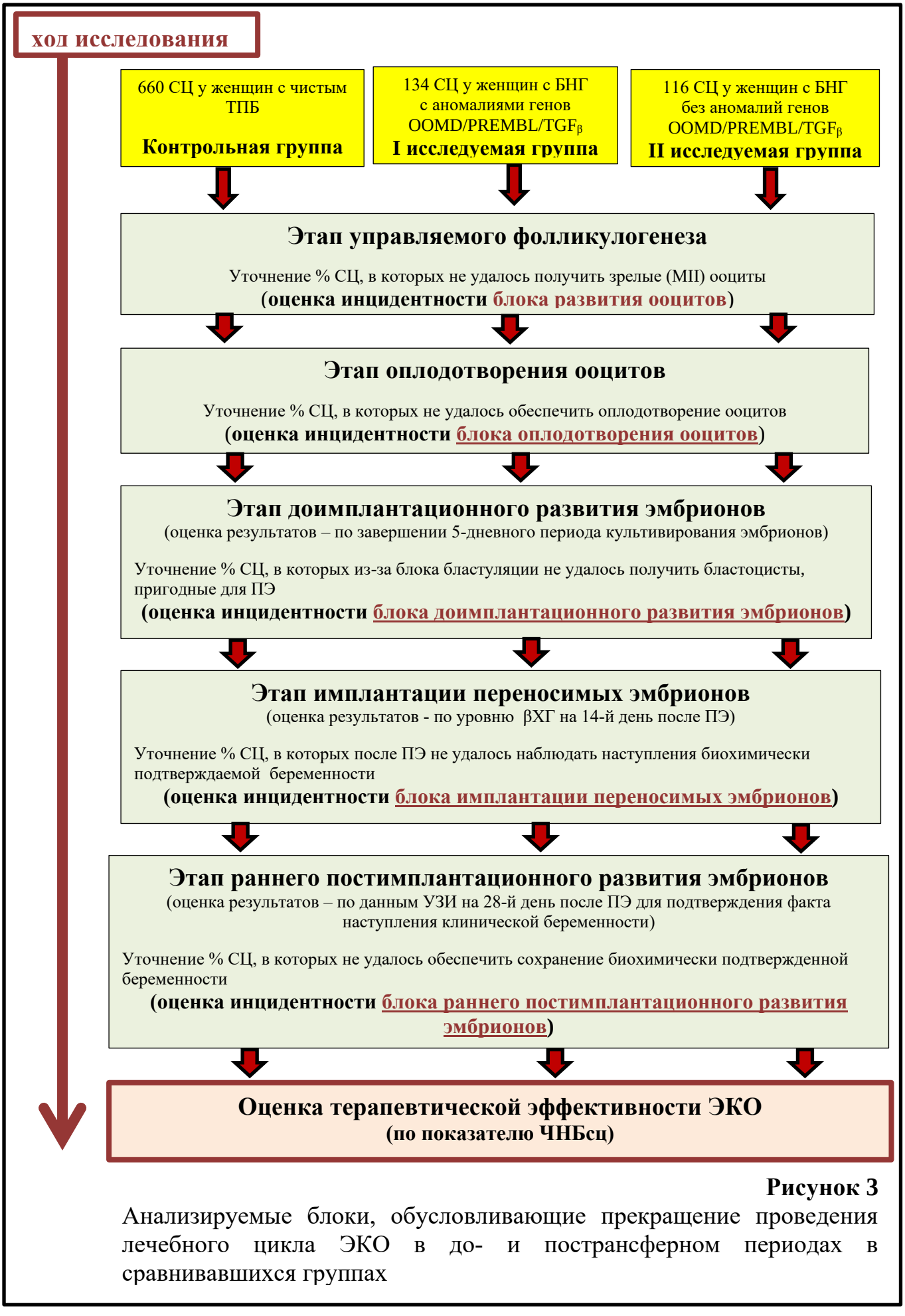

Рисунок 3

Анализируемые блоки, обусловливающие прекращение проведения лечебного цикла ЭКО в до- и пострансферном периодах в сравнивавшихся группах

Для молекулярно-генетического исследования использовали нативную ДНК пациенток, выделенную методом фенольной экстракции из фракции лимфоцитов крови, взятой из локтевой вены. Анализ проб проводили методом ионного полупроводникового секвенирования (секвенирования нового поколения - NGS) с использованием секвинатора Ion Proton Torrent, Thermo Fisher Scientific. В процессе молекулярно-генетического исследования была использована стандартная панель “Female infertility panel” GTR000592369.1, в которую входят 93 гена, ассоциированных с женским бесплодием. При этом, как и у лиц «идеальной» группы, прицельно тестировали структуру промоторов и прилежащих к ним участков генов, относящихся к группам: OMD (ZP1, ZP2, ZP3, WEE2, PATL2, TUBB8), PREMBL (TLE6, PAD16), TGF_{β} (BMP15).

Выбор перечисленных генов (из числа возможных кандидатов) для составления «эталонного» генетического портрета аргументируется данными литературы, согласно которым аномалии именно этих генов в наибольшей степени ассоциируются с нарушениями в репродуктивной сфере, ведущими к бесплодию [54, 181]. Для верификации полученных результатов было повторно проведено секвинирование исследованных проб методом Ф. Сэнгера [146].

Полученный «эталонный» генетический портрет (рис. 2) сохраняли на «облачном» сервере секвенатора и автоматически сопоставляли его со значениями, получаемыми в результате молекулярно-генетического анализа проб пациенток с БНГ.

Заслуживает внимания, что в контрольной группе (у женщин с чистым ТПБ) мы собирали лимфоциты у всех 314 пациенток до начала использования ЭКО и сохраняли их путем криоконсервации до завершения выполнения лечебной программы. Собственно сами молекулярно-генетические исследования сохранявшихся (криоконсервированных) лимфоцитов мы выполняли отсрочено и только с теми клетками, которые были получены от 50

пациенток с подтвержденной клинической беременностью в результате 1-кратного использования ЭКО.

В основной группе (у всех 58 женщин с БНГ) мы также собирали лимфоциты до начала использования ЭКО и сохраняли их (путем криоконсервации) до завершения лечебной программы. Сами генетические исследования проводили также отсрочено и по его результатам ретроспективно распределяли пациенток с собранным массивом анализируемых показателей в I и II исследуемые группы, которые характеризовались, соответственно, наличием и отсутствием генетических аномалий по генам групп OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

2.3. Методы лечения.

Подбор стартовой дозы ФСГ, входящей в состав того или иного препарата гонадотропинов, типа протокола («длинный» с а-ГнРГ или «короткий» с ант-ГнРГ) и конкретного препарата гонадотропинов (содержащего или не содержащего ЛГ в дополнение к ФСГ) осуществляли на основе рекомендаций, регламентирующих решение этих вопросов с учетом наличия/отсутствия у пациентки рисков гипер- или гипоергической реакции яичников, т.е. повышенной вероятности развития у нее раннего синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) или бедного ответа (табл. 1) [15].

В ходе лечения у большинства (56%) пациенток применяли «длинный протокол» down-регуляции с назначением агонистов ГнРГ(дифферелин 0,1мг) в комбинации с ЛГ-содержащими препаратами человеческих мочевых гонадотропинов (Хумог). Остальные пациентки (44%) в стимулированных циклах проходили лечение с использованием «короткого протокола» с антагонистами ГнРГ (цетротид 0,2мг) в комбинации с «чистым» рекомбинантным (синтетическим) ФСГ (Гонал Ф), который назначали при достижении лидирующим фолликулом диаметра 14 мм.

Контроль за индуцируемым фолликулогенезом проводили с помощью УЗИ. Во всех случаях максимальная суточная доза ФСГ в составе любого из

назначавшихся препаратов гонадотропинов была лимитирована уровнем не более 375 МЕ.

При достижении лидирующим фолликулом диаметра 18-20 мм вводили 5-10 тыс. МЕ триггера овуляции человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) и через 34-36 часов выполняли трансвагинальную пункцию всех фолликулов диаметром более 15 мм. Выделение ооцитов, их оплодотворение (путём рутинной инсеминации или ИКСИ), культивирование и перенос эмбрионов выполняли в соответствии с существующими стандартными рекомендациями [15]. Следует указать, что у всех женщин с БНГ для оплодотворения ооцитов применяли исключительно технологию ИКСИ,также как и в контрольной группе (у женщин с чистым ТПБ) с целью сохранения референсности данных.

После ТВП в течение 5 дней (до переноса эмбрионов – ПЭ) осуществляли подготовку эндометрия препаратами прогестерона (Утрожестан 200мг/сут). Аналогичную терапию продолжали:

- до биохимического подтверждения/исключения беременности (14-й день после ПЭ) - у всех пациенток;

- у женщин с биохимически подтвержденной беременностью - до констатации клинической беременности (28-й день после ПЭ);

- у пациенток с клинически подтвержденной беременностью - до завершения 14 недели беременности.

2.4. Методы статистического анализа

Анализ полученных данных проводили с использованием программы «Statistica-6», включающей все необходимые методы описательной и вариационной статистики. Переменные количественные показатели представляли в тексте, таблицах и на рисунках в виде их средних значений (M) ± одно стандартное отклонение (±SD).

При сравнении средних значений двух групп количественных показателей, имеющих нормальное распределение, использовали стандартный критерий Стьюдента (t-тест). Для определения того, является ли распределение нормальным, применяли критерий Колмогорова-Смирнова. Для оценки достоверности различий между сопоставляемыми группами по качественным признакам использовали непараметрический критерий Пирсона (χ2-тест), рассчитываемый на основе анализа сопряженности наблюдаемых и ожидаемых чисел в таблице 2x2. Сравнение частот выполняли с аппроксимацией нормального распределения.

Различия между сравнивавшимися группами по анализируемым количественным или качественным признакам во всех случаях расценивали как достоверные при уровне значимости $p < 0,05$.

2.5. Работа с литературными источниками

Приводимые в списке литературы источники представляют опубликованные за последние 40 лет сообщения отечественных и зарубежных авторов, рассматривавших вопросы, обсуждаемые в диссертации. Для получения необходимой информации использовали материал, содержащийся в российских и международных электронных библиотеках и в реферативных базах данных специализированых научных журналов на интернет-платформах:

- PubMED (англоязычная текстовая база данных Национальной медицинской библиотеки США);

- Web of Science (поисковая интернет-платформа, объединяющая базы данных научных журналов и патентов);
- Scopus (библиографическая и реферативная база данных 24 тысяч научных изданий);
- РИНЦ (Российский индекс научного цитирования - библиографическая база данных научных публикаций российских ученых).

2.6. Этические аспекты

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinic Practice) и принципами Хельсинской Декларации. Протокол исследования одобрен Этическим Комитетом ГБУЗ МО МОНИИАГ. У всех участников получено добровольное информированное письменное согласие.

Глава 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Инцидентность БНГ с изучавшимися генетическими особенностями в общем контингенте инфертильных женщин не старше 35 лет.

Исходное обследование с применением стандартных клинико-лабораторных и инструментальных методов позволило установить, что инцидентность БНГ среди 1006 проходивших лечением инфертильных женщин не старше 35 лет составила 5,8% (n=58). Последующее молекулярно-генетическое исследование показало, что в контингенте пациенток с БНГ частота лиц с аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ достигает 55% (рис. 4). Из этих наблюдений следует, что БНГ как причину инфертильности

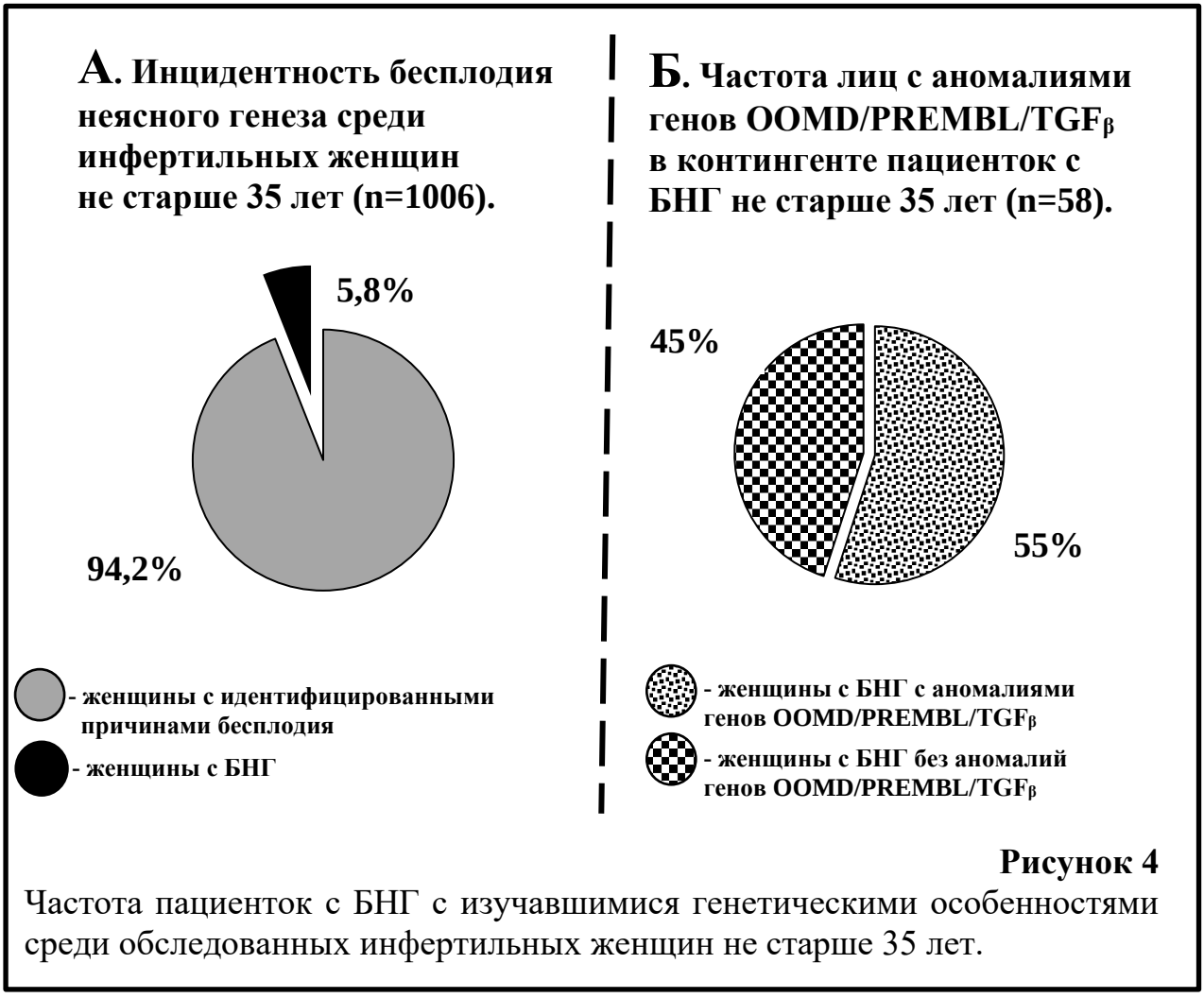

Рисунок 4

Частота пациенток с БНГ с изучавшимися генетическими особенностями среди обследованных инфертильных женщин не старше 35 лет.

TGF$_\beta$

констатируют относительно редко, однако, среди женщин с таким диагнозом больше чем у половины обнаруживаются искажения (отклонения от эталонного) генетического портрета по тестированным генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

3.2. Характеристика длительности и типа бесплодия, гормональной регуляции репродуктивной системы и состояния овариального резерва у наблюдавшихся женщин с БНГ

Сопоставление типа и длительности бесплодия у больных контрольной и основной групп показало, что у женщин с БНГ, независимо от наличия/отсутствия аномалий тестированных генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, в сравнении с пациентками с «чистым» ТПБ, отмечается исключительно первичное бесплодие и более длительный период инфертильности (табл. 2). Для женщин с «чистым» ТПБ более типичным (встречающимся в 64,3% случаев) было вторичное бесплодие, а продолжительность периода инфертильности в сравнении с пациентками с БНГ была достоверно меньше в среднем на 2 года.

При исследовании сывороточных концентраций гипофизарных гормонов-регуляторов репродуктивной системы было установлено, что уровни ФСГ, ЛГ и соотношение ЛГ/ФСГ у женщин сравнивавшихся групп укладываются в рамки их нормативных значений (табл.3). Тем не менее, у лиц с БНГ как с наличием, так и с отсутствием тестированных генетических аномалий (ГА), в сравнении с контрольной группой отмечались относительно более низкие значения ЛГ и соотношения ЛГ/ФСГ ($p<0,001$). Из этих наблюдений следует, что у женщин с БНГ активность продукции ЛГ имеет тенденцию к снижению, однако наблюдаемые уровни этого гормона продолжают соответствовать норме, что не позволяет констатировать ЛГ-дефицитное состояние у этих больных. Тот факт, что в I и II исследуемых группах уровни ФСГ, ЛГ и соотношение ЛГ/ФСГ были сопоставимы ($p>0,05$)

Таблица 2

Тип и длительность бесплодия у пациенток с «чистым» ТПБ и БНГ с наличием и отсутствием генетических аномалий (ГА) генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

Показатели			**Контрольная группа** (чистое ТПБ) n=314	**Основная группа** (БНГ)	
				I исследуемая группа (БНГ с ГА) n=32	**II исследуемая группа** (БНГ без ГА) n=26
Бесплодие	первичное	абс	112	32	26
		%	35,7	100	100
	вторичное	абс	202	-	-
		%	64,3	-	-
Длительность бесплодия, лет			3,2±1,7	4,6±2,4*	5,2±2,2*

* - p < 0,05 от контрольной группы

Таблица 3

Уровни гипофизарных гормонов-регуляторов репродуктивной системы у пациенток с «чистым» ТПБ и БНГ с наличием и отсутствием генетических аномалий (ГА) генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

Гормоны-регуляторы репродуктивной системы	**Контрольная группа** (чистое ТПБ) n=314	**Основная группа** (БНГ)				
		I исследуемая группа (БНГ с ГА) n=32		**II исследуемая группа** (БНГ без ГА) n=26		
	показатели	показатели	P_1	показатели	P_2	P_3
Базальный ФСГ, мМЕ/мл	7,42±3,94	6,87±2,72	0,445	7,29±3,34	0,871	0,602
Базальный ЛГ, мМЕ/мл	9,52±2,61	5,43±1,88	<0,001	6,12±2,43	<0,001	0,229
Соотношение базальных ЛГ/ФСГ	1,28±0,55	0,79±0,36	<0,001	0,83±0,41	<0,001	0,694

p_1 – различие между контрольной и I исследуемой группой
p_2 – различие между контрольной и II исследуемой группой
p_3 – различие между I и II исследуемой группой

указывает на то, что наличие или отсутствие изучавшихся ГА никак не влияет гипофизарную гормональную регуляцию репродуктивной системы.

Изучение состояния овариального резерва в сравнивавшихся группах показало, что у лиц с чистым ТПБ и БНГ с наличием и отсутствием изучавшихся ГА тестированные гормональные (АМГ) и ультразвуковые (чАФ) маркеры оказываются вполне сопоставимыми (при всех межгрупповых сравнениях $p>0,05$) и не имеют отклонений от нормы (табл. 4). Полученные результаты наглядно демонстрируют, что наличие или отсутствие изучавшихся ГА у лиц с БНГ не отражается на состоянии их овариального резерва, который оказывается вполне сохранным, т.е. не имеет признаков редукции.

Таблица 4

Характеристика овариального резерва по гормональным и УЗ-критериям у пациенток с «чистым» ТПБ и БНГ с наличием и отсутствием генетических аномалий (ГА) генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

Маркеры овариального резерва	**Контрольная группа** (чистое ТПБ) n=314	**Основная группа** (БНГ)				
		I исследуемая группа (БНГ с ГА) n=32		**II исследуемая группа** (БНГ без ГА) n=26		
	показатели	показатели	P_1	показатели	P_2	P_3
АМГ, нг/мл	3,61±2,04	2,89±1,56	0,059	2,78±1,63	0,052	0,795
Базальное чАФ (шт)	13,1±3,7	12,9±4,2	0,775	12,6±3,9	0,515	0,781

p_1 – различие между контрольной и I исследуемой группой
p_2 – различие между контрольной и II исследуемой группой
p_3 – различие между I и II исследуемой группой

3.3. Результаты выполнения программы ЭКО в дотрансферном периоде у пациенток с БНГ с изучавшимися генетическими особенностями

3.3.1. Этап управляемого фолликулогенеза

При оценке показателей, характеризующих этап управляемого фолликулогенеза, было установлено, что сравнивавшиеся группы достоверно не различались между собой (p>0,05) по длительности стимуляции (в среднем 10-11 дней), курсовой дозе ФСГ (в среднем 1,5-2,5 тыс. МЕ) и общему числу полученных ооцитов (в среднем 10-14 шт) (табл. 5).

Таблица 5

Характеристика этапа управляемого фолликулогенеза в стимулированных циклах (СЦ) у пациенток с «чистым» ТПБ и БНГ с наличием и отсутствием генетических аномалий (ГА) генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

Показатели	**Контрольная группа** (чистое ТПБ) СЦ=660	**Основная группа** (БНГ)				
		I исследуемая группа (БНГ с ГА) СЦ=134		**II исследуемая группа** (БНГ без ГА) СЦ=116		
	показатели	показатели	P_1	показатели	P_2	P_3
Длительность стимуляции, дни	10,3±1,2	10,5±1,4	0,089	10,5±1,5	0,089	0,114
Курсовая доза ФСГ, МЕ	1966±458	2031±498	0,142	2053±507	0,065	0,73
Общее число полученных ооцитов, шт	12,2±2,7	11,9±2,2	0,229	12,0±2,4	0,466	0,731
Число полученных зрелых (MII) ооцитов, шт	10,3±0,7	7,1±0,9	<0,001	8,3±0,6	<0,001	<0,001
% зрелых (MII) ооцитов в общей когорте полученных яйцеклеток	84,4±5,8	59,7±7,6	<0,001	69,2±5,0	<0,001	<0,001

p_1 – различие между контрольной и I исследуемой группой
p_2 – различие между контрольной и II исследуемой группой
p_3 – различие между I и II исследуемой группой

Однако, у женщин с чистым ТПБ доля зрелых ооцитов в их общей когорте (84,4±5,8%) была достоверно больше, чем у пациенток с БНГ с наличием и отсутствием изучавшихся ГА (соответственно 59,7±7,6% и 69,2+5,0%). Сопоставление по этому показателю пациенток I и II исследуемых групп позволяет констатировать, что наличие у пациентки с БНГ аномалий генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ ассоциируется с более выраженным сокращением доли получаемых зрелых ооцитов.

Важно отметить, что инцидентность случаев отмены начатых СЦ из-за полного блока созревания ооцитов в контрольной группе составила всего лишь 0,8% (5 случаев на 660 СЦ). У лиц с БНГ с наличием и отсутствием изучавшихся ГА частота случаев отмены СЦ по указанной причине была заметно выше и достигала соответственно 8,2% и 4,3% (рис. 5).

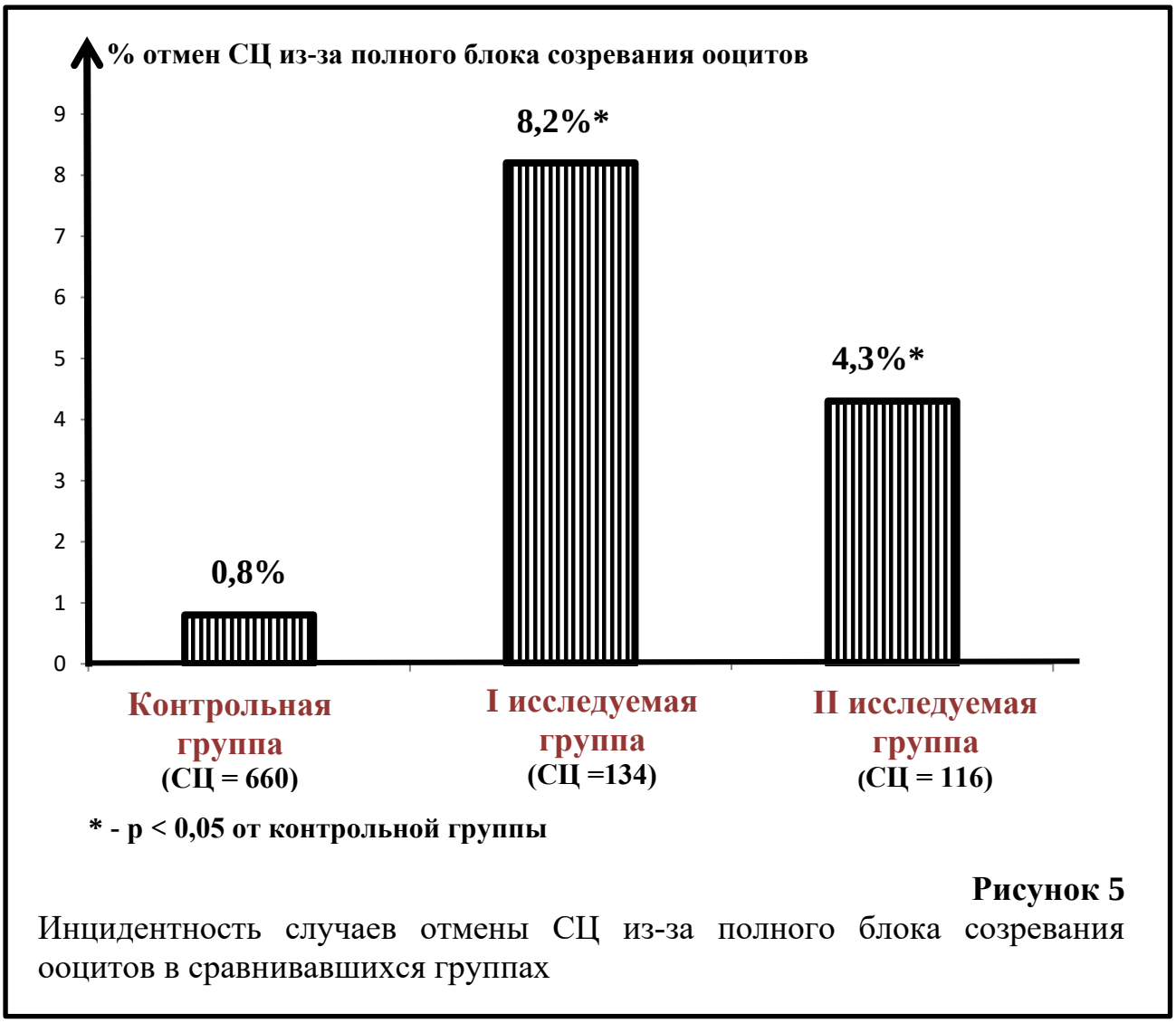

Рисунок 5

Инцидентность случаев отмены СЦ из-за полного блока созревания ооцитов в сравнивавшихся группах

Полученные результаты указывают на то, что БНГ явно ассоциируется с увеличением риска прекращения проведения лечебного цикла ЭКО из-за тотального отсутствия зрелых ооцитов. При этом, если у пациентки с БНГ обнаруживаются аномалии генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, то в таких случаях вероятность отмены выполняемого цикла возрастает двукратно, т.е. примерно с 4 до 8% от числа всех начатых СЦ.

3.3.2. Этап оплодотворения ооцитов

При фертилизации ооцитов частота их правильного оплодотворения в контрольной группе достигала 79,6%, тогда как в I и II исследуемых группах этот показатель оказался достоверно более низким, составив, соответственно, 71,8±5,9% и 74,7+6,5% (табл. 6). По этой причине среднее число нормальных зигот у лиц с наличием и отсутствием изучавшихся ГА не превышало 5,1±0,3 и 6,2±0,4, тогда как у женщин с чистым ТПБ оно было достоверно выше - 8,2±0,6.

Сопоставление результатов оплодотворения ооцитов в I и II исследуемых группах показало, что у пациенток с аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ наблюдается статистически подтверждаемое более выраженное снижение % фертилизации зрелых женских гамет и уменьшение среднего числа правильно оплодотворенных ооцитов. Это наблюдение, во-первых, подтверждает существование связи БНГ с ухудшением процесса фертилизации ооцитов, и, во-вторых, позволяет констатировать, что такая связь проявляет себя более контрастно в случаях наличия у пациентки с БНГ аномалий генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

Отмеченное ухудшение (при сравнении с контрольной группой) результатов фертилизации ооцитов у пациенток с БНГ без изучавшихся ГА указывает на то, что при БНГ снижение эффективности оплодотворения может быть связано не только с рассмотренными в нашей работе аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, но и с какими-то другими пока ещё неидентифицированными причинами.

Таблица 6

Характеристика этапа оплодотворения ооцитов в стимулированных циклах (СЦ), не сопровождавшихся блоком созревания яйцеклеток, у пациенток сравнивавшихся групп

Показатели	**Контрольная группа** (чистое ТПБ) СЦ=655	**Основная группа** (БНГ)				
		I исследуемая группа (БНГ с ГА) СЦ=123		**II исследуемая группа** (БНГ без ГА) СЦ=111		
	показатели	показатели	P_1	показатели	P_2	P_3
Правильно оплодотворенные ооциты (2PN, 2PB), шт	8,2±0,6	5,1±0,3	<0,001	6,2±0,4	<0,001	<0,001
% правильного оплодотворения зрелых ооцитов	79,6±7,3	71,8±5,9	<0,001	74,7±6,5	<0,001	<0,001

p_1 – различие между контрольной и I исследуемой группой
p_2 – различие между контрольной и II исследуемой группой
p_3 – различие между I и II исследуемой группой

Необходимо указать, что у женщин с БНГ с аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF_β отмечалось не только снижение % фертилизации ооцитов, но и достоверное возрастание инцидентности случаев прерывания лечебных циклов ЭКО (до 47,2% от числа начатых СЦ) из-за неполучения ни одной правильно оплодотворенной зиготы (рис. 6). У лиц с БНГ без изучавшихся ГА частота таких осложнений соответствовала уровню, регистрируемому в контрольной группе (соответственно 11,3 и 11,7% от числа СЦ). Полученные результаты показывают, что наличие аномалий генов OOMD/PREMBL/TGF_β у лиц с БНГ ассоциируются с заметным возрастанием риска прерывания лечебной программы ЭКО на этапе оплодотворения ооцитов.

* - p < 0,001 от контрольной группы
нд – p > 0,05 от контрольной группы (недостоверное отличие)

Рисунок 6

Инцидентность случаев отмены СЦ с полученными зрелыми ооцитами из-за последующего полного блока их оплодотворения в сравнивавшихся группах

3.3.3. Этап доимплантационного развития эмбрионов

Изучение доимплантационного развития эмбрионов в сравнивавшихся группах позволило установить (табл. 7), что у лиц с БНГ с наличием аномалий генов OOMD/PREMBL/VEGF частота бластуляции (20,0±18,4%) оказалась достоверно ниже, чем в контрольной (37,8±16,9%) и II исследуемой группе (34,0±19,7%) (табл. 7).

Таблица 7

Характеристика этапа доимплантационного развития эмбрионов в стимулированных циклах (СЦ) с подтвержденным правильным оплодотворением ооцитов у пациенток сравнивавшихся групп

Показатели	**Контрольная группа** (чистое ТПБ) СЦ=581	**Основная группа** (БНГ)				
		I исследуемая группа (БНГ с ГА) СЦ=65		**II исследуемая группа** (БНГ без ГА) СЦ=98		
	показатели	показатели	P_1	показатели	P_2	P_3
Бластоцисты, пригодные для переноса, шт	3,19±1,38	1,02±0,94	<0,001	2,11±1,22	<0,001	<0,001
% бластуляции (% полученных бластоцист хорошего качества от числа правильно оплодотворенных ооцитов)	37,8±16,9	20,0±18,4	<0,001	34,0±19,7	0,051	<0,001

p_1 – различие между контрольной и I исследуемой группой
p_2 – различие между контрольной и II исследуемой группой
p_3 – различие между I и II исследуемой группой

Инцидентность случаев отмены СЦ с полученными правильно оплодотворенными ооцитами из-за последующего полного блока бластуляции у лиц с БНГ с изучавшимися ГА достигала 86,7%. что было заметно выше аналогичного показателя, рассчитанного у женщин с БНГ без аномалий генов OOMD/PREMBL/TGF_β (60,2%). У пациенток с чистым ТПБ частота такого осложнения не превышала 12,5%.

Из полученных результатов следует, что БНГ ассоциируется с существенным возрастанием риска прерывания лечебного цикла ЭКО из-за полного блока бластуляции, причем в случаях наличия у пациентки с БНГ аномалий генов OOMD/PREMBL/TGF_β такой риск становится ещё большим. На практике описанная негативная закономерность у женщин с БНГ и наличием изучавшихся ГА приводит к невозможности продолжения программы ЭКО в подавляющем большинстве выполняемых лечебных циклов.

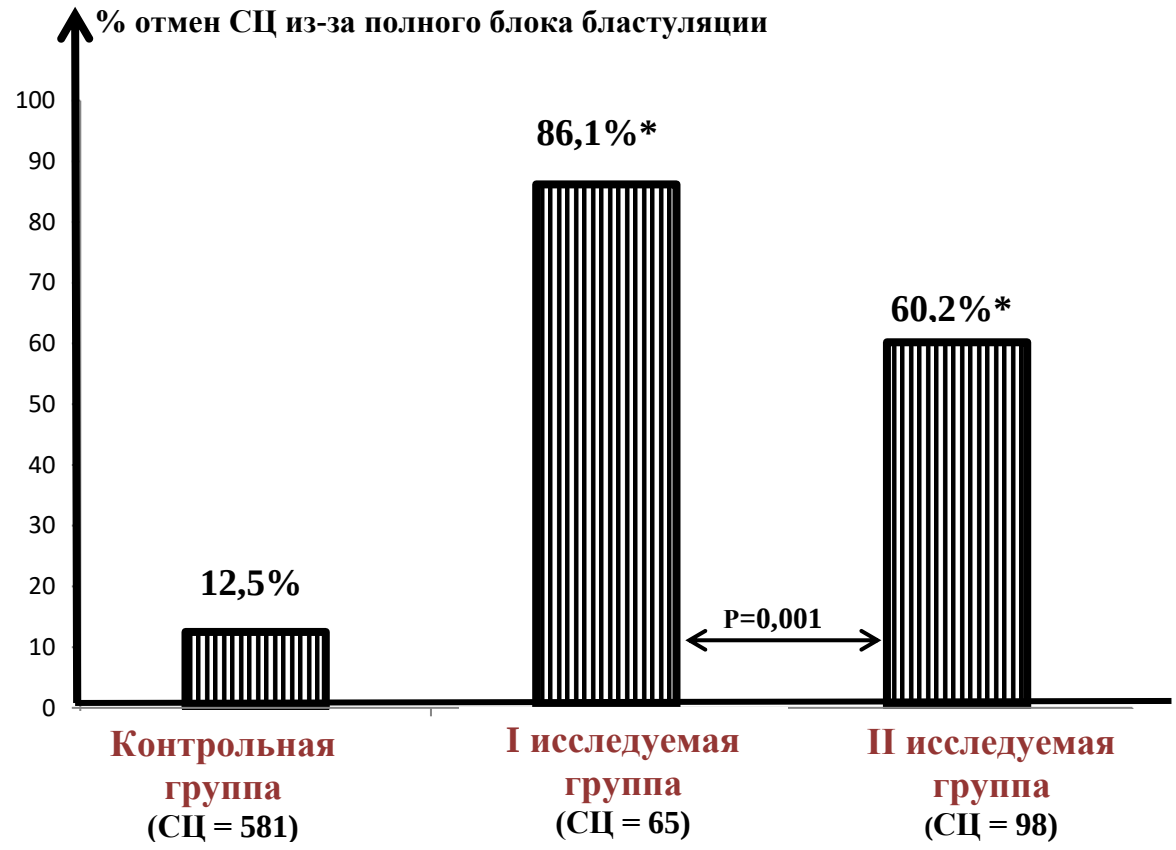

Рисунок 7

Инцидентность случаев отмены СЦ с полученными правильно оплодотворенными ооцитами из-за последующего полного блока бластуляции в сравнивавшихся группах.

3.4. Результаты выполнения программы ЭКО в посттрансферном периоде у пациенток с БНГ с изучавшимися генетическими особенностями

3.4.1. Этап имплантации переносимых эмбрионов

После выполненного ПЭ частота биохимического подтверждения беременности в контрольной группе составила 43,3% (табл. 8). У лиц с БНГ без наличия изучавшихся ГА данный показатель оказался ниже, чем у женщин с чистым ТПБ, на 5%, однако это различие не имело статистического подтверждения (p=0,561). В противоположность этому, у

пациенток с БНГ и аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ при переносе эмбрионов вообще не было зарегистрировано ни одного случая их успешной имплантации, т.е. ни одной биохимически подтвержденной беременности.

Таблица 8

Характеристика этапа имплантации в стимулированных циклах с выполненным переносом эмбрионов (СЦ с ПЭ) у пациенток сравнивавшихся групп

Показатели		**Контрольная группа** (чистое ТПБ)	**Основная группа** (БНГ)				
			I исследуемая группа (БНГ с ГА)		**II исследуемая группа** (БНГ без ГА)		
		показатели	показатели	P_1	показатели	P_2	P_3
Число СЦ с ПЭ		508	9	-	39	-	-
Биохимическое подтверждение беременности	абс	220	0	-	15	0,561	-
	% от СЦ с ПЭ	43,3	0		38,5		

p_1 – различие между контрольной и I исследуемой группой
p_2 – различие между контрольной и II исследуемой группой
p_3 – различие между I и II исследуемой группой

Вполне очевидно, что циклы лечения, не сопровождавшиеся биохимическим подтверждением беременности, приходилось прерывать. Инцидентность таких случаев, ассоциируемых с блоком имплантации переносимых бластоцист, достигала 56,6% в контрольной группе и 61,5% во II исследуемой группе (рис. 8). У лиц I исследуемой группы блок имплантации (отсутствие биохимически подтверждаемой беременности) наблюдался в 100% СЦ с выполненным ПЭ. Из этих наблюдений следует, что в лечебных циклах ЭКО у пациенток с БНГ и аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$

практически нет шансов добиться терапевтического успеха на этапе переноса эмбрионов из-за полного блока их плантации.

Рисунок 8
Инцидентность случаев отмены программы ЭКО после ПЭ из-за отсутствия биохимического подтверждения беременности (вследствие блока имплантации) в сравнивавшихся группах

3.4.2. Этап раннего постимплантационного развития эмбрионов (до срока подтверждения клинической беременности).

Частота диагностированной клинической беременности от числа СЦ с ПЭ и биохимически подтвержденной успешной имплантацией в контрольной группе была достоверно выше, чем во II исследуемой группе - 75,9% против 66,7%, p=0,016 (табл.9). В I исследуемой группе данный показатель не

рассчитывался по причине отсутствия хотя бы одного случая биохимического подтверждения беременности после выполненного ПЭ.

Таблица 9

Характеристика этапа раннего постимплантационного развития эмбрионов в стимулированных циклах с биохимически подтвержденной беременностью после ПЭ

Показатели		**Контрольная группа** (чистое ТПБ)	**Основная группа** (БНГ)				
			I исследуемая группа (БНГ с ГА)		**II исследуемая группа** (БНГ без ГА)		
		показатели	показатели	P_1	показатели	P_2	P_3
Число СЦ с ПЭ с биохимически подтвержденной беременностью		220	0	-	15	-	-
Клиническое подтверждение беременности	абс	167	-	-	10	0,016	-
	% от СЦ с ПЭ с биохимически подтвержденной беременностью	75,9	-		66,7		

p_1 – различие между контрольной и I исследуемой группой
p_2 – различие между контрольной и II исследуемой группой
p_3 – различие между I и II исследуемой группой

Полученные данные показывают, что инцидентность случаев прекращения проводимого лечения из-за потери биохимически подтвержденной беременности у женщин с чистым ТПБ может достигать 24,1%.

При наличии БНГ без изучавшихся ГА частота прекращения лечения из-за выше указанной причины возрастала до 33,3%, причем обнаруженная разница по этому показателю между контрольной и II исследуемой группой носила достоверный характер (p=0,016).

Что касается лиц с БНГ и аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, то в отношении них невозможно судить о том, наскольно негативно могут влиять такие генетические нарушения на процессы раннего постимплантационного развития эмбрионов в периоде между биохимическим и клиническим подтверждением беременности, поскольку у таких больных не происходит имплантации переносимых эмбрионов.

Рисунок 9

Инцидентность случаев отмены программы ЭКО после ПЭ из-за потери биохимически подтвержденной беременности (вследствие блока раннего постимплантационного развития эмбрионов) в сравнивавшихся группах

3.5. Итоговая оценка терапевтической эффективности ЭКО у пациенток не старше 35 лет с БНГ с анализом значимости изучавшихся генетических аномалий для результатов лечения.

При итоговой оценке терапевтической эффективности процедуры ЭКО (характеризуемой показателями клинической ЧНБпэ и ЧНБсц) было подтверждено существенное отличие результатов, полученных в сравнивавшихся когортах больных. Так, если у женщин с чистым ТПБ указанные показатели достигали соответственно 25,3% и 38,8%, то у лиц с БНГ (суммарно входивших в I и II исследуемые группы) они не превышали 4% и 20,8%, причем выявленная значительная разница между их числовыми значениями в контрольной и основной группах подтверждалась статистически ($p<0,001$) (рис. 10).

Заслуживает внимания, что аналогичное сопоставление результатов ЭКО, собранных в контрольной и основной группах с учетом особенностей генетического портрета у женщин с БНГ, позволило установить, что наличие аномалий генов OOMD/PREMBL/TGF_{β} вообще нивелируют вероятность преодоления бесплодия. Об этом весьма красноречиво свидетельствуют нулевые значения показателей ЧНБсц и ЧНБпэ в I исследуемой группе. По этой причине результаты лечения, регистрируемые отдельно во II исследуемой группе, заметно улучшались в сравнении с общей когортой лиц с БНГ, составлявших основную группу. Данное наблюдение указывает на то, что пациентки с БНГ и отсутствием изучавшихся ГА при выполнении ЭКО имеют определенные шансы на преодоление бесплодия. При этом, однако, вероятность терапевтического успеха у этих больных заметно уступает результатам, получаемым у женщин с чистым ТПБ. Так, в сравнении с контрольной группой у лиц II исследуемой группы показатель ЧНБпэ оказался ниже в 1,5 раза (25,6% против 38,8%, $p < 0,001$), а показатель ЧНБсц – ниже в 3 раза (8,6% против 25,3%, $p < 0,001$).

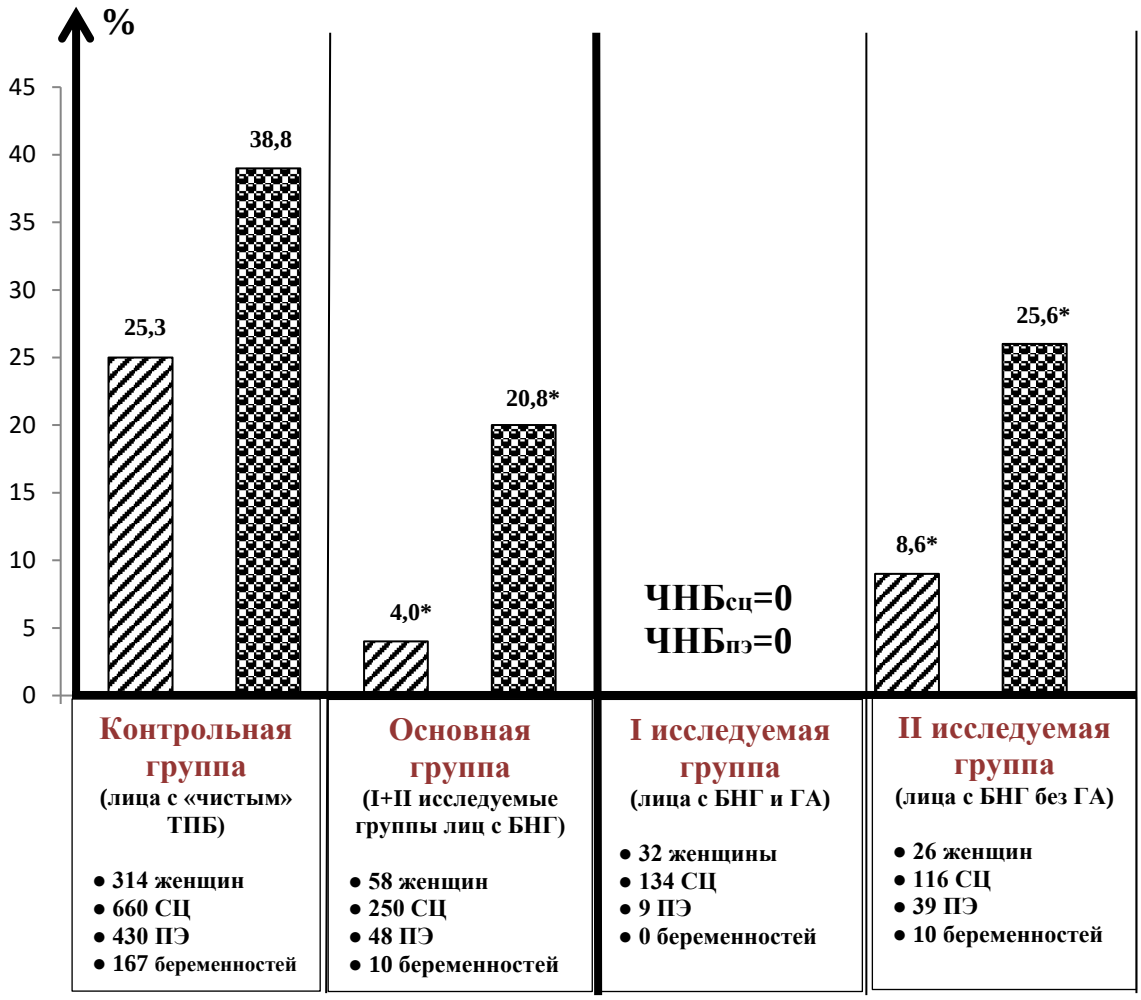

Рисунок 10

Характеристика терапевтической эффективности ЭКО по показателям клинической ЧНБсц и ЧНБпэ в сравнивавшихся группах

Изучение структуры прерванных циклов ЭКО до срока подтверждения клинической беременности (28-й день после ПЭ) показало (рис. 11), что у лиц с чистым ТПБ главной причиной, ухудшающей показатели ЧНБпэ и ЧНБсц, является отсутствие имплантации переносимых эмбрионов. На долю именно этой причины, подтверждаемой при констатации отсутствия

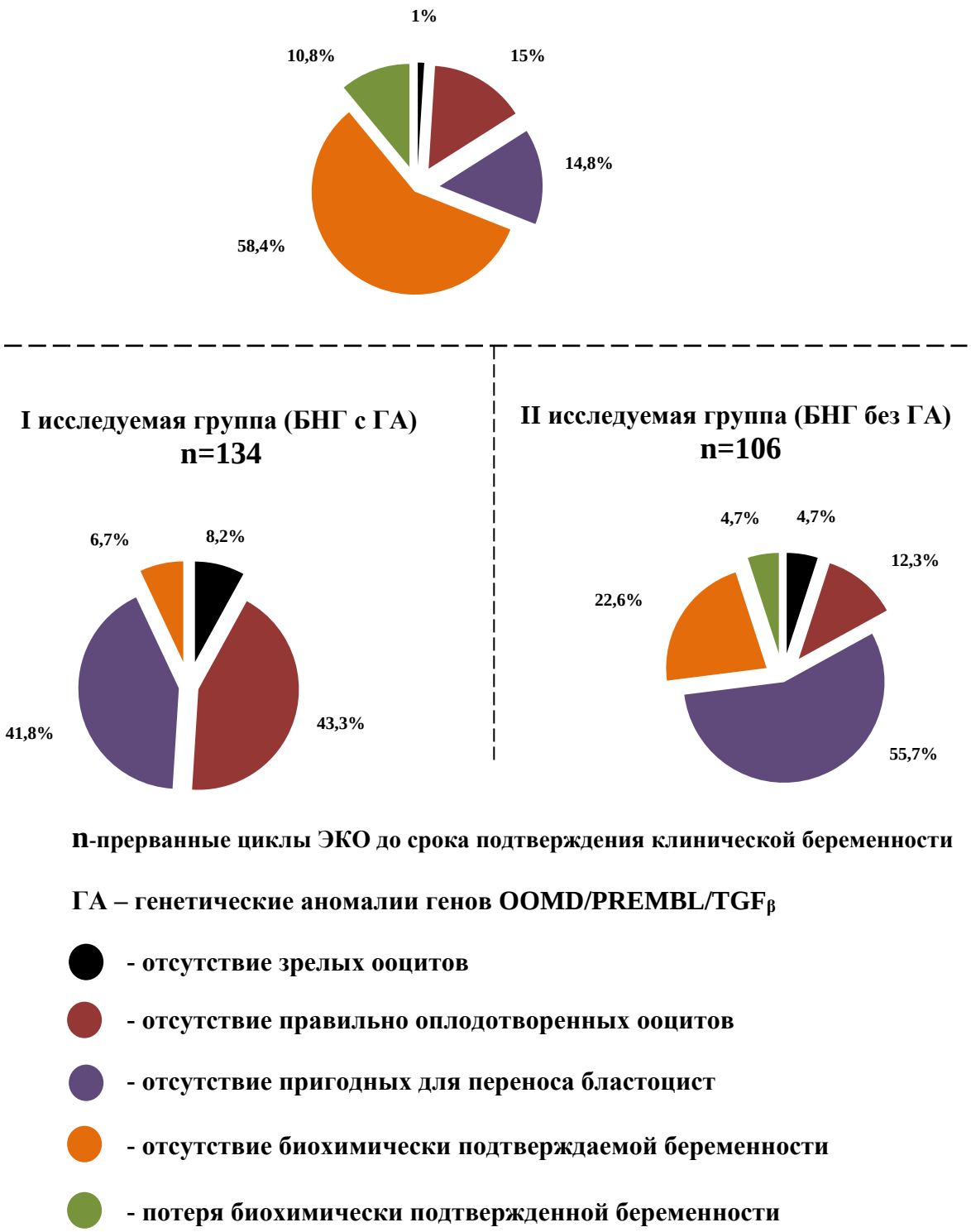

Рисунок 11

Структура причин прерывания циклов ЭКО до срока подтверждения клинической беременности (28-й день после ПЭ) в сравнивавшихся группах

биохимической беременности, пришлось 58,4% всех прерванных СЦ в контрольной группе.

У пациенток с БНГ и изучаемыми ГА в структуре причин прерывания циклов ЭКО в равной степени доминировали факторы, связанные с отсутствием правильно оплодотворенных ооцитов и неполучением пригодных к переносу бластоцист (соответственно 43,3% и 41,8% от всех остановленных программ ЭКО в данной группе). Незначительная доля прерванных лечебных циклов из-за блока имплантации (т.е. из-за неподтверждения биохимической беременности) в I исследуемой группе объясняется тем, что пациенток с БНГ и изучаемыми ГА очень редко удавалось довести до этапа переноса эмбрионов (всего 9 выполненных ПЭ в 135 СЦ). А в структуре причин прекращения программ ЭКО в I исследуемой группе отсутствие доли, отражающей потерю биохимически подтвержденной беременности, вполне очевидно ассоциируется с отсутствием хотя бы одного зарегистрированного случая успешной имплантации переносимых эмбрионов, оцениваемой по уровню βХГ на 14-й день после ПЭ.

У женщин с БНГ без изучаемых ГА прекращение выполняемых программ ЭКО в основном было связано с неполучением пригодных для переноса бластоцист, т.е. с блоком бластуляции (55,7% от всех прерванных лечебных циклов). Достаточно существенной оказалась и доля случаев прекращения лечения из-за блока имплантации, т.е. из-за отсутствия биохимически подтверждаемой беременности (22,6% от числа остановленных программ ЭКО во II исследуемой группе).

Помимо оценки частоты причинных факторов, заставлявших останавливать выполняемую программу ЭКО, мы уточнили динамику нарастания числа прерванных лечебных циклов на всех пяти этапах периода ведения больных сравнивавшихся групп от начала СЦ до срока подтверждения/исключения клинической беременности, определяемого 28-м

днем после ПЭ по данным УЗИ матки. Были получены следующие результаты (рис. 12):

У женщин с чистым ТПБ суммарная частота остановленных программ ЭКО к моменту подтверждения клинической беременности составила 74,7% (493 случая на 660 начатых СЦ). При этом основной «скачок» числа прерванных СЦ (288 из 493 случаев) приходился на этап имплантации переносимых эмбрионов.

У пациенток с БНГ и изучавшимися ГА все 100% выполнявшихся СЦ (n=134) были прерваны до срока подтверждения клинической беременности. Причем последние из начатых СЦ были прекращены в указанной когорте на этапе, когда уточнялась эффективность имплантации переносимых эмбрионов по факту подтверждения биохимической беременности. Поэтому у таких больных было невозможно отслеживать потери выполняемых СЦ в периоде между биохимическим и клиническим подтверждением беременности. Основные «скачки» числа прерванных СЦ у женщин с БНГ и аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ происходили на этапах оплодотворения ооцитов (58 из 134 случаев) и бластуляции (56 из 134 случаев).

У женщин с БНГ и отсутствием изучавшихся ГА суммарная частота прекращения лечебных циклов ЭКО до срока подтверждения клинической беременности составила 91,3% (106 случаев на 116 начатых СЦ). Наиболее существенные «скачки» числа прерываний СЦ в этой когорте приходились на этапы бластуляции (59 из 106 случаев) и имплантации переносимых эмбрионов (24 из 106 случаев).

Представленные данные, характеризующие результаты применения ЭКО и причинные факторы, приводящие к их ухудшению в сравнивавшихся группах, позволяют констатировать крайне негативное влияние на возможность преодоления бесплодия у лиц с БНГ фактора наличия у них аномалий генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

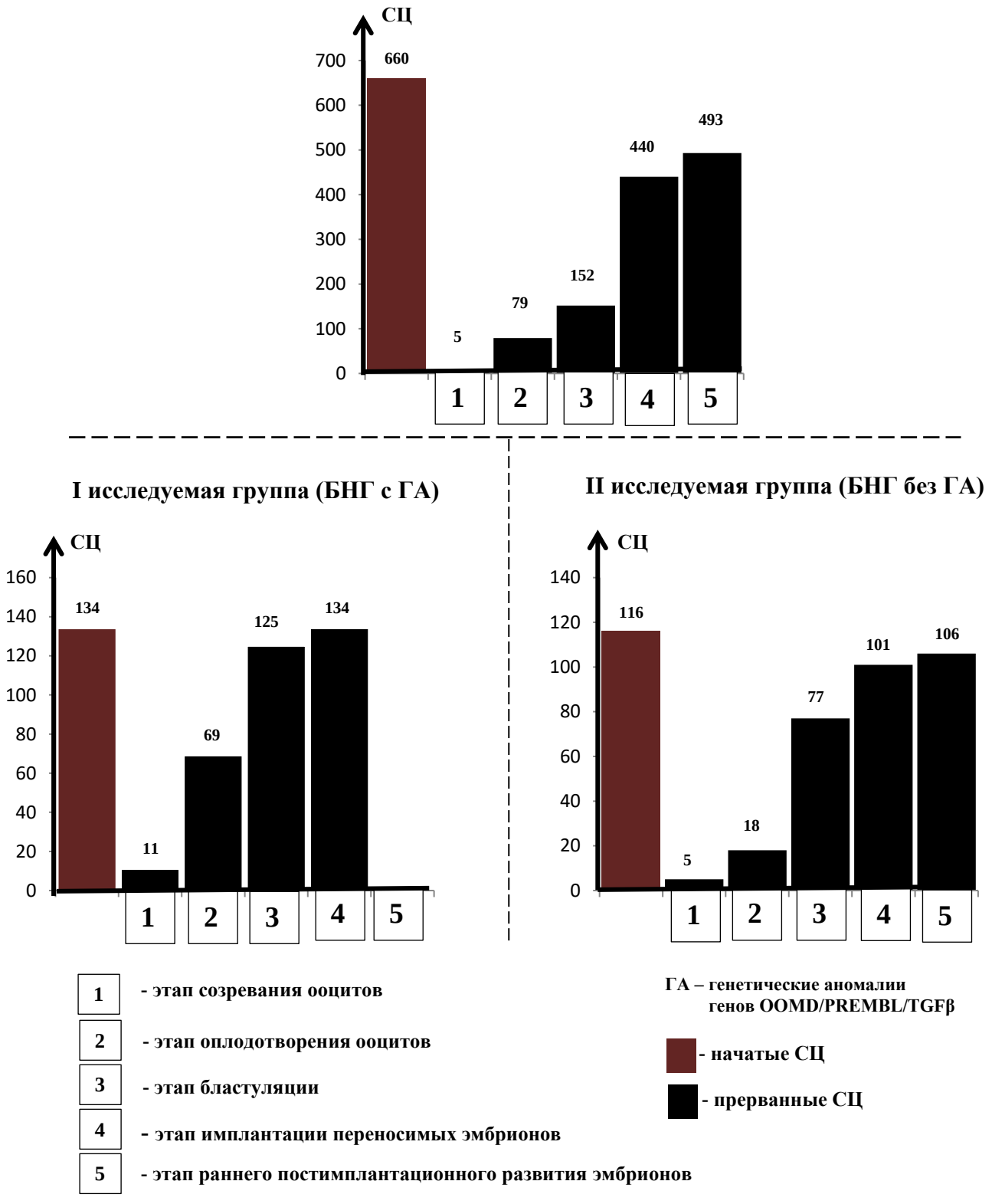

Рисунок 12

Динамика нарастания числа прерванных стимулированных циклов (СЦ) до срока подтверждения клинической беременности в сравнивавшихся группах

У женщин с БНГ в случаях отсутствия изучавшихся ГА итоги лечения с применением вспомогательных репродуктивных технологий оказываются заметно лучше, однако они продолжают существенно уступать показателям терапевтической эффективности ЭКО, регистрируемым у пациенток с чистым ТПБ.

Сопоставление результатов использования ЭКО в I и II исследуемых группах, а также между ними и контрольной группой указывает на то, что у лиц с БНГ нарушение генетического портрета по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ является хотя и очень важным, но не единственным фактором, ухудшающим терапевтические исходы программ ЭКО.

Наиболее существенными причинами, сокращающими число начатых СЦ в программах ЭКО у женщин с БНГ и аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, являются полные блоки оплодотворения ооцитов и бластуляции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно сообщениям разных авторов, доля бесплодия неясного генеза (БНГ) в структуре причинных факторов женской инфертильности колеблется от 5 до 40% [74, 75, 96, 140]. Столь большой разброс в оценке инцидентности БНГ вероятно связан с тем, что число пациенток с таким диагнозом может зависеть от качества клинических обследований, практикуемых в разных клиниках. Очевидно, что на частоту постановок диагноза БНГ, связанного с объемом и тщательностью выполняемого обследования инфертильных женщин, оказывает влияние набор диагностических процедур, характеристики используемой аппаратуры, инструментария и лабораторного обеспечения, а также степень компетентности и опыт самих специалистов, осуществляющих оценку массива получаемых данных. С учетом этих обстоятельств, мы посчитали нужным уточнить место БНГ в структуре женского бесплодия. Причем при решении данной задачи мы использовали набор диагностических процедур и порядок их использования, практикуемый именно в Российской Федерации и жестко регламентируемый Приказом МЗ РФ от 30 августа 2012 г №107н. [25]. При этом мы опирались на технологический потенциал МОНИИАГ и профессионализм его сотрудников, оказывавших помощь в сборе клинических и лабораторных данных, необходимых для выполнения настоящей работы.

С учетом того, что мы исходно планировали уточнить связь между изучавшимися генетическими аномалиями (ГА) у женщин с БНГ и результатами выполнения программ ЭКО в до- и посттрансферных периодах, в наше исследование включали только пациенток с неустановленными причинами инфертильности не старше 35 лет. Исключение из исследования лиц старше 35 лет аргументировалось целесообразностью нивелировать возможное влияние возрастного фактора на получаемые результаты. Здесь следует пояснить, что в позднем репродуктивном периоде с увеличением его длительности пропорционально возрастает частота анеуплоидий и разного

рода отклонений гомеостаза в ооцитах [27, 71, 80]. В результате этой тенденции в общем пуле получаемых на этапе ТВП яйцеклеток возрастает число ооцитов с пониженным потенциалом к развитию (до стадии MII) и оплодотворению, а также с изменениями, ухудшающими в последующем (после генерации эмбрионов из таких ооцитов) процесс бластуляции, имплантации и последующего постимплантационного развития эмбрионов. На практике все это сопровождается у женщин позднего репродуктивного возраста заметным снижением терапевтической эффективности ЭКО, отражаемой показателями клинической ЧНБсц, ЧНБпэ и, как следствие, частоты родов, рассчитываемых на число подтвержденных клинических беременностей и, в особенности, на число начатых СЦ [21, 178].

Проведенное нами исследование инцидентности БНГ у женщин оптимального репродуктивного возраста (т.е. у лиц не старше 35 лет) показало, что такой вариант бесплодия в нашей клинике констатируют достаточно редко (не более чем у 5,8% инфертильных пациенток указанной возрастной группы). Данный факт лишний раз подчеркивает высокий профессионализм специалистов МОНИИАГ, предупреждающих гипердиагностику БНГ из-за элементарного недообследования больных или ошибок в интерпретации получаемых данных.

При оценке терапевтической эффективности стандартного (с собственными ооцитами) ЭКО у пациенток с БНГ в контрольную группу, с которой проводили сравнение получаемых показателей, мы отбирали сопоставимых по возрасту женщин с исключительно «чистым» (не сочетаемым с другими возможными причинами инфертильности) ТПБ. Выбор для контрольной группы пациенток с чистым ТПБ обосновывается тем, что, по общему мнению специалистов-репродуктологов, у такой когорты инфертильных женщин удается достичь максимально высоких показателей терапевтической эффективности ЭКО [15]. А выполняемое сравнение именно с такой контрольной группой получаемых результатов от лиц с любыми из вариантов бесплодия позволяет весьма наглядно продемонстрировать,

насколько та или иная изучаемая причина инфертильности способна ухудшить «максимально достижимые» (регистрируемые в контрольной группе) показатели, характеризующие успех проводимого лечения.

Сопоставление терапевтической эффективности стандартного ЭКО у пациенток с БНГ и чистым ТПБ показало, что у лиц с неустановленными причинами инфертильности отмечается существенное снижение показателей клинической ЧНБпэ (почти в 2 раза) и в особенности, ЧНБсц (почти в 6 раз). Из этого наблюдения следует, что БНГ хотя и занимает небольшое место в структуре выделяемых вариантов женской инфертильности, однако пациентки с таким диагнозом явно представляют собой группу «трудных» пациенток из-за их повышенной резистентности к лечению бесплодия с применением стандартного ЭКО. Заслуживает внимания, что у женщин с БНГ при сравнении с контрольной группой наблюдаемое снижение ЧНБсц заметно превышало снижение ЧНБпэ. Это наблюдение указывает на то, что у лиц с БНГ падение эффективности ЭКО (уменьшение частоты диагностируемой клинической ЧНБ) ассоциируется в большей степени с неудачами (прекращением выполняемых программ ЭКО) в доотрансферном периоде, к которому относят этапы созревания и оплодотворения ооцитов и процесс бластуляции.

Для объяснения полученных результатов применения ЭКО у лиц с БНГ мы провели комплекс молекулярно-генетических исследований с применением панели “Female Infertility Panel” GTR000592369, в которую входят 93 гена, ассоциированных с женским бесплодием. Первым шагом этих исследований стало уточнение «эталонного» (типичного для нормы) генетического портрета по генам, относимым к группам:

- OMD: гены ZP1 (11q12/2); ZP2 (16p2.3-12.2); ZP3 (7q11.23); WEE2 (7q.34); PATL2 (15q21.1); TUBB8 (10p15.3);
- PREMBL: гены TLE6 (19p13.3); PAD16 (1p36.13);
- TGF_{β}: BMP15 (Xp11.22).

Включение в состав «эталонного» генетического портрета перечисленных генов из их общего числа, которое можно было характеризовать с помощью использованной в нашей работе диагностической панели, аргументируется тем, что, по данным литературы, нарушения в этих генах в наибольшей степени ассоциируются с отклонениями в эмбриогенезе в до- и постимплантационном периодах [34, 66, 112, 145, 170, 181]. Характеристика интересующих генов осуществлялась с применением полупроводникового секвенатора Photon Ion Torrent (“Thermo Fisher Scientific”, USA), позволявшего оценивать интенсивность флюоресценции тестируемых последовательностей нуклеотидов с последующим графическим отображением получаемых результатов.

Для составления описанного «эталонного» генетического портрета мы использовали лимфоциты, полученные от пациенток исключительно с чистым ТПБ и подтвержденной клинической беременностью в результате однократного применения ЭКО. Сам факт достижения клинической беременности с первой же попытки ЭКО у больных с чистым ТПБ, по нашему мнению, весьма наглядно демонстрировал, что у таких женщин нет никаких, в том числе и генетических, предпосылок к ухудшению результатов лечения бесплодия, оцениваемому по клинической ЧНБ. Именно это обстоятельство служило аргументом к тому, что только такие больные могут быть использованы для создания «эталонных» (характеризующих норму) генетических портретов для любых генов, в том числе и тех, которые были предметом исследования в нашей работе.

Составив «эталонный» генетический портрет по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, мы использовали его для выделения из общего контингента женщин с БНГ тех пациенток, которые либо полностью соответствовали этому портрету (т.е. не имели аномалий указанных генов) либо нет. Такое разделение лиц с БНГ при сопоставлении результатов ЭКО, полученных в группах с наличием и отсутствием генетических нарушений по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, позволяло установить, в какой степени влияют

на любые из оцениваемых параметров отклонения перечисленных генов от их «эталонного» портрета.

При уточнении уровней гипофизарных гормонов-регуляторов репродуктивной системы (ФСГ, ЛГ и соотношения ЛГ/ФСГ) не было выявлено никаких различий между лицами с БНГ с наличием и отсутствием отклонений изучавшихся генов, а также между ними и женщинами контрольной группы. Из этих наблюдений следует, что для лиц с БНГ, независимо от наличия или отсутствия у них аномалий по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ вообще нетипичы какие-либо нарушения гипофизарной регуляции репродуктивной системы.

Тем не менее, все же следует отметить, что в нашем исследовании уровень ЛГ в крови больных с БНГ, оставаясь в пределах нормы, в среднем был достоверно ниже, чем у пациенток с чистым ТПБ. Наблюдалось и соответствующие уменьшение отношения ЛГ/ФСГ. Комментируя эти находки, следует принять во внимание, что к настоящему времени накоплено достаточно много информации о том, как влияют на гаметогенез уровень ЛГ и соотношение ЛГ/ФСГ [17]. При этом имеются сообщения о том, что существует некий пороговый уровень эндогенного ЛГ в диапазоне относительно невысоких базальных значений 5–8 мМЕ/мл, который может ассоциироваться со многими негативными событиями в процессе гаметогенеза [51, 132, 173, 180]. Обусловленные пониженным базальным уровнем ЛГ нарушения созревания ооцитов, приводят к образованию из них анеуплоидных эмбрионов с пониженной способностью к имплантации или подвергающихся экспульсии на ранних сроках гестации в тех случаях, когда зачатие все же происходит [39, 89, 142, 172, 183]. Рядом авторов утверждается, что при недостаточном уровне эндогенного ЛГ наблюдается еще и снижение рецептивности эндометрия, а также потеря эмбрионально-эндометриальной синхронизации [41, 91, 160], что в свою очередь уменьшает эффективность ЭКО на этапе выполняемого ПЭ. Таким образом, ухудшение результатов ЭКО у пациенток с физиологическим дефицитом ЛГ, по мнению ряда

исследователей [68], может быть следствием сочетания как эмбриональных, так и эндометриальных факторов инфертильности.

Подытоживая литературные данные и обнаруженные нами различия в содержании ЛГ и соотношении концентраций ЛГ/ФСГ у пациенток с БНГ по сравнению с контролем, можно констатировать, что возможно существует некая связь между ослаблением продукции ЛГ (отражаемым его низким базальным уровнем) и риском развития БНГ. Однако следует подчеркнуть, что на такой риск (если он действительно существует) наличие или отсутствие аномалий изучавшихся генов не оказывает никакого влияния, поскольку базальные уровни ЛГ и соотношения ЛГ/ФСГ у женщин с БНГ с нормальным и искаженным генетическим портретом по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ оказались практически одинаковыми. Эти наблюдения позволяют констатировать, что патогенез БНГ многообразен и что наличие или отсутствие аномалий генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ не может служить единственным объяснением возникновения всех случаев БНГ. То есть можно допустить, что какие-то случаи БНГ теоретически могут быть связаны с ослаблением эффектов ЛГ. Однако мы подчеркиваем, что они не имеют никакой связи с возможными нарушениями «эталонного» генетического портрета по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$. К этому необходимо добавить, что регистрируемые у лиц с БНГ относительно низкие (в сравнении с контролем) базальные уровни ЛГ и соотношение ЛГ/ФСГ укладывались в интервал нормативных значений. Данный факт не позволяет подтвердить наличие при БНГ действительно выраженного ЛГ-дефицитного состояния, диагностируемого при сравнении результатов гормональных исследований с общепринятыми нормативами для тестируемых гормонов. При этом нужно принять во внимание, что предположения о связи БНГ с низкими, но остающимися в пределах нормы, базальными значениями ЛГ и соотношения ЛГ/ФСГ [68], все еще носят гипотетический (весьма спекулятивный) характер и нуждаются в уточнении. Здесь следует указать, что ряд специалистов отрицает негативное влияние низкого базального уровня ЛГ (<5 мМЕ/мл) на

терапевтическую эффективность ЭКО, оцениваемую по ЧНБ [60, 78, 118, 138]. В нашей работе мы не ставили задачей проверку гипотезы о связи низких физиологических значений ЛГ с ухудшением терапевтических исходов ЭКО в связи с тем, что нами было установлено отсутствие какой-либо связи между патологическими изменениями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ и активностью продукции ЛГ, отражаемой его сывороточным уровнем и соотношением ЛГ/ФСГ.

Уточнение состояния овариального резерва по показателям АМГ и базального чАФ у пациенток с ТПБ и БНГ не выявило статистически подтверждаемых различий между этими когортами. При этом не имело значения, обнаруживались или нет у пациенток с БНГ изучавшиеся генетические аномалии.

При анализе результатов индуцируемого фоллулогенеза было установлено, что курсовая доза ФСГ, продолжительность гонадотропиновой стимуляции и число полученных ооцитов у женщин сравнивавшихся групп оказались вполне сопоставимыми. Данное наблюдение иллюстрирует отсутствие какого-либо негативного влияния на указанные параметры изучавшихся генов у пациенток с БНГ.

Собранные нами данные о состоянии овариального резерва у лиц с БНГ и о реакции их яичников на гонадотропиновую стимуляцию не подтверждают сообщения авторов [98, 153, 182], которые указывают на будто бы имеющую место у таких больных тенденцию к редукции овариального резерва и падение чувствительности к гонадотропинам. Расхождения в результатах, полученных нами и указанными авторами, возможно, связаны с тем, что эти исследователи, в отличие от нас, в группу лиц с БНГ включали еще и женщин старше 35 лет. Весьма вероятно, что из-за присутствия в общей когорте наблюдавшихся пациенток с БНГ женщин в позднем репродуктивном возрасте отмечалось ухудшение средних значений показателей овариального резерва и увеличение средней курсовой дозы расходуемого ФСГ в составе препаратов гонадотропинов.

При оценке показателя частоты зрелых (MII) ооцитов, рассчитываемого от числа всех ооцитов, полученных путем ТВП, было установлено, что у лиц с БНГ этот показатель был достоверно ниже, чем у пациенток с чистым ТПБ. При этом в когорте женщин с БНГ и аномалиями изучавшихся генов падение показателя % полученных зрелых ооцитов было выражено более контрастно. Из этих результатов следует, что наличие БНГ даже без изучавшихся ГА ассоциируется с ухудшением созревания ооцитов. Однако если у лиц с БНГ имеют место аномалии генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, то в таких случаях процесс созревания ооцитов тормозится в еще большей степени.

На этапах оплодотворения ооцитов и бластуляции соответствующие показатели эмбриогенеза (частота правильного оплодотворения яйцеклеток и % пригодных для переноса бластоцист, рассчитанный от числа правильно оплодотворенных зигот) у лиц с БНГ также были меньше, чем в контроле. Если у женщин с БНГ обнаруживались еще и аномалии изучавшихся генов, то это сопровождалось достоверно более выраженным ухудшением показателей, характеризующих указанные этапы эмбриогенеза.

В пострансферном периоде на этапе имплантации переносимых эмбрионов частота диагностированной биохимической беременности у женщин с БНГ без отклонений генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ была достоверно меньше, чем в контроле, тогда как у пациенток с БНГ и изучавшимися ГА мы вообще не наблюдали ни одного случая подтвержденной биохимической беременности..

В периоде между констатацией биохимической и клинической беременности у женщин с БНГ без изучавшихся ГА частота потерь биохимической беременности была выше, чем в контроле. Что касается пациенток с БНГ и аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, то у них определить аналогичный показатель не представлялось возможным, из-за отсутствия случаев подтвержденной биохимической беременности.

Необходимо отметить, что, по нашему мнению, наиболее ярко характеризует негативное влияние на результаты ЭКО (по показателю

клинической ЧНБ) у лиц с БНГ с аномалиями генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ число отмен начатых СЦ на разных этапах выполнения программы ЭКО. Приходится констатировать, что у пациенток с БНГ и изучавшимися ГА все начатые СЦ не были доведены до срока подтверждения биохимической беременности, причем в структуре причин прекращения ЭКО в равной степени доминировали случаи, связанные с полным блоком оплодотворения ооцитов и полным блоком бластуляции правильно оплодотворенных зигот. У женщин с БНГ и отсутствием аномалий генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ частота отмен начатых СЦ на всех этапах выполнения программ ЭКО была меньше, чем у лиц с БНГ и наличием изучавшихся ГА, однако превышала аналогичные показатели, рассчитанные у женщин с чистым ТПБ.

Таким образом, наши наблюдения позволяют констатировать, что женщины с БНГ и изучавшимися генетическими аномалиями фактически не имеют шансов довести программу ЭКО не только до срока подтверждения клинической, но даже биохимической беременности. В отличие от них, лица с БНГ с соответствием «эталонному» генетическому портрету по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ при выполнении программы ЭКО могут быть успешно доведены до срока подтверждения клинической беременности, хотя частота таких случаев оказывается меньше, чем у женщин с чистым ТПБ.

Подытоживая представленный материал можно констатировать, что собранные нами данные о связи БНГ с ухудшением эмбриологических параметров выполняемых программ ЭКО и низкой ЧНБ вполне согласуются с сообщениями многих авторов, в разное время изучавших эти вопросы [102, 126, 131, 181]. Однако совершенно новым в выполненной работе представляется использованный подход, согласно которому все женщины с БНГ рассматривались как когорты с наличием и отсутствием аномалий по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$.

Результаты нашего исследования показали, что лица с БНГ, в зависимости от наличия/отсутствия у них нарушений изучавшихся генов,

имеют совершенно разный прогноз успешного использования ЭКО. Данный факт имеет чрезвычайно важный практический аспект, поскольку в отделении репродуктологии МОНИАГ по программам ЭКО проходят лечение больные в рамках обязательного медицинского страхования (ОМС) по квотам Министерства Здравоохранения Московской области. Такие квоты подразумевают осмысленное и эффективное расходование страхового бюджета, что в приложении к пациенткам с БНГ означает полезность выделения среди них лиц, у которых лечение может оказаться более эффективным и потому оправданным к назначению за счет средств ОМС. С этой точки зрения мы полагаем, что процедуру стандартного ЭКО с собственными ооцитами в рамках ОМС имеет смысл назначать пациенткам с БНГ только в том случае, если у них подтверждается соответствие «эталонному» генетическому портрету по тестированным в нашей работе генам OOMD/PREMBL/TGF_{β}.

Женщинам с БНГ и наличием аномалий изучавшихся генов для преодоления бесплодия целесообразно рекомендовать специализированную программу ЭКО с ооцитами донора.

ВЫВОДЫ

1. Доля необъяснимого бесплодия в общей структуре причинных факторов инфертильности у пациенток не старше 35 лет, включаемых в программы ЭКО, составляет 5,8%.
2. У женщин с БНГ продолжительность бесплодия оказывается в среднем на 3-4 года больше, чем у лиц с ТПБ, причем у всех пациенток с БНГ имеет место первичное бесплодие, тогда как у женщин с ТПБ доминирует (обнаруживается с частотой 85%) вторичное бесплодие.
3. Среди больных с диагнозом БНГ частота лиц с наличием и отсутствием дефектов в группах генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ составляет соответственно 56% и 44%.
4. Пациентки с БНГ, независимо от наличия или отсутствия у них аномалий по генам OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, характеризуются: а) отсутствием нарушений гипофизарной регуляции репродуктивной системы; б) нормальным состоянием овариального резерва; в) адекватной реакцией на гонадотропиновую стимуляцию, оцениваемую по курсовой дозе ФСГ, числу дней стимуляции и количеству получаемых ооцитов.
5. У женщин с БНГ и отсутствием генетических аномалий в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ частота клинической беременности, лишь на 10% уступает результатам в группе с «чистым» ТПБ, тогда как у лиц с БНГ и наличием изученных генетических дефектов случаев клинической беременности не наблюдается вообще.
6. В программах ЭКО у женщин с БНГ и дефектами в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ не удается обеспечить клинической беременности по причине возрастания частоты блоков созревания и оплодотворения ооцитов, блоков доимплантационного развития эмбрионов и (в редких случаях доведения программы ЭКО до трансферного этапа) из-за отсутствия имплантации переносимых эмбрионов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У пациенток с диагнозом БНГ, установленным по результатам стандартного обследования, целесообразно выполнять молекулярно-генетическое исследование с целью уточнения наличия/отсутствия дефектов в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ для решения вопроса о целесообразности использования собственных ооцитов или ооцитов донора в программах ЭКО.
2. Женщин с БНГ и наличием аномалий в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ следует предупреждать о крайне низкой (по нашим данным – фактически нулевой) вероятности достижения беременности с помощью ЭКО с собственными ооцитами и рекомендовать им использование ооцитов донора.
3. Поскольку все случаи наступления клинической беременности у пациенток с БНГ по нашим наблюдениям приходятся на женщин, не имеющих дефектов в генах OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$, это оправдывает возможность использования у таких больных в программах ЭКО собственных ооцитов, хотя эффективность лечения будет оставаться ниже, чем у лиц с ТПБ.
4. Составленную нами референсную базу («генетический портрет») для генов OOMD/PREMBL/TGF$_\beta$ представляется полезным использовать на практике для идентификации лиц с дефектами указанных генов при любых формах женского бесплодия, что будет облегчать решение вопроса о целесообразности использования донорских ооцитов в случаях повторных неудач ЭКО с собственными ооцитами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамян Л.В., Салимова Л.Ф., Кондратович Л.М. Патогенетические аспекты эндометриоз-ассоциированного бесплодия. //Проблемы репродукции. -2015. –т.21. -№6. –с. 82-88.
2. Айламазян Э.К., Габелова К.А., Гзгзян А.М., Потин В.В. Аутоиммунный оофарит (патогенез, диагностика, перспективы лечения). //Акушерство и гинекология. -2002. -№2. –с. 7-9.
3. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. //СПб.: Издательство Н-Л, 2007. -640 с.
4. Божедомов В.А., Николаева М.А., Голубева Е.Л. и др. Проблема диагностики иммунологической причины мужского бесплодия. //Проблемы репродукции. -2007. –т.11. -№2. – с.81-89.
5. Бурлев В.А. Роль растворимых и клеточных селектинов в наступлении беременности при лиганд-рецепторных взаимодействиях эмбрионов в эндометрии. //Проблемы репродукции. -2014. –т.20. -№5. –с. 41-52.
6. Бурлев В.А., Кузьмичев Л.Н., Онищенко А.С. и др. Функциональная активность эндометрия влияет на результату ЭКО и перенос эмбрионов: молекулярные механизмы регуляции фертильности. //Проблемы репродукции. -2010. –т.16. -№2. –с. 41-52.
7. Габелова К.А., Гзгзян А.М., Потин В.В., Рулев В.В. Аутоиммунный оофарит (патогенез, клиника, диагностика, лечение). Пособие для врачей. //СПб, Издательство Н-Л., 2010. -30 с.
8. Девятова Е.А., Цатурова К.А., Вартанян Э.В., Роль оценки перистальтики эндометрия в прогнозировании успеха имплантации. //Проблемы репродукции. -2016. –т.22. -№4. –с. 47-51.
9. Келлэт Е.П. Особенности клиники и иммунологические нарушения у супружеских пар с бесплодием неясного генеза. //Дис. ... канд. мед. наук. – М, 2011. -124 с.

10. Келлэт Е.П., Шуршалина А.в., Корнеева И.Е. Роль эндометрия в реализации репродуктивной функции. //Проблемы репродукции. -2010. – т.16. -№2. –с. 16-20.
11. Корсак В.С., Смирнова А.А., Шурыгина О.В. Регистр ВРТ Общероссийской общественной организации «Российская Ассоциация Репродукции Человека». Отчет за 2021 год. //Проблемы репродукции. -2023. –т.29. -№6. –с. 25-40.
12. Краснопольская К.В. Лечение бесплодия при эндометриозе: взгляд репродуктолога. //М.: МЕДпресс-информ, 2019. -112 с.
13. Краснопольская К.В., Бурумкулова Ф.Ф., Гутуева Ч.Г., Соколова Е.А., Исакова К.М. Эффективность программ экстракорпорального оплодотворения у пациенток с заболеваниями щитовидной железы. Российский вестник акушера-гинеколога. -2020. –т.20. -№2. –с. 64-70.
14. Краснопольская К.В., Коган И.Ю. Миома матки и бесплодие: стратегия преодоления: руководство для врачей. //М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. -144 с.
15. Краснопольская К.В., Назаренко Т.А. Клинические аспекты лечения бесплодия в браке. Диагностические и терапевтические программы с использованием методов восстановления естественной фертильности и вспомогательных репродуктивных технологий: руководство. //М: ГЭОТАР-Медиа, 2013. -376 с.
16. Краснопольская К.В., Назаренко Т.А., Здановский В.М., Анкина О.А., Бочарова Т.В. Влияние количественных параметров фолликулогенеза при контролируемой стимуляции яичников на эффективность ЭКО. //Проблемы репродукции. -2017. –т.23. -№3. –с. 55-61.
17. Краснопольская К.В., Соколова Е.А., Бекетова А.Н. ЛГ-содержащие препараты гонадотропинов в программах ЭКО (обзор литературы). //Проблемы репродукции. -2019. -25. -№3. –с. 72-81.
18. Кулаков В.И., Манухин И.Б., Савельева Г.М. Гинекология: национальное руководство. //М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. –с. 581-627.

19. Назаренко Т.Ф., Краснопольская К.В. Бедный ответ. Тактика ведения пациенток со сниженной реакцией на стимуляцию гонадотропиннами в программах ЭКО. //М.: МЕДпресс-информ, 2012. -80 с.
20. Назаренко Т.А., Краснопольская К.В., Сесина Н.И., Санакоева А.В., Куликова О.Р., Бедник Д.Ю. Клиническая характеристика пациенток с нарушением показателей раннего эмбриогенеза в программах ЭКО. //Проблемы репродукции. -2019. –т.25. -№2. –с. 60-66.
21. Назаренко Т.А., Мишиева Н.Г. Бесплодие и возраст: пути решения проблемы. //М.: МЕДпресс-информ, 2010. -208 с.
22. Никитин А., Воробьева О. Факторы регуляции дифференцировки соматических клеток фолликулов яичников млекопитающих. //Цитология. – 1988. –т.30. -№10. –с. 1155-1171.
23. Озерская И.А. Эхография в гинекологии. //М.: Издательский дом Видар-М, 2020. -704 с.
24. Охтырская Т.А., Яворовская К.А., Шуршалина А.В. и др. Роль PAI-1 в повторных неудачах ЭКО. Состояние молекулярного имплантационного окна: роль в исходах ЭКО (обзор литературы). //Проблемы репродукции. -2011. –т.17. -№4. –с. 24-28.
25. Приказ МЗ РФ от 30 августа 2012 107н «Порядок использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказания и ограничения к их применению». М, 2012.
26. Серебренникова К.Г., Кузнецова Е.П., Ванке Е.С. и др. Подготовка эндометрия к программам ВРТ у пациенток с бесплодием. //Проблемы репродукции. -2014. –т.20. -№4. –с. 62-67.
27. Смирнова А.А., Зыряева Н.А., Аншина М.Б. Возрастные изменения и риск хромосомных аномалий в ооцитах человека. //Проблемы репродукции. -2019. –т.25. -№2. –с 16-26.
28. Сухих Г.Т., Назаренко Т.А. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению. //М.ГЭОТАР-Медиа, 2010. -784 с.

29. Толибова Г.Х. Патогенетические детерминанты эндометриальной дисфункции у пациенток с миомой матки. //Журнал акушерства и женских болезней. -2018. –т.67. -№1. –с. 65-67.

30. Abir R., Fish B., Johnson M.H. BMP15, fertility and the ovary. //Reprod. Biomed. Online. -2014. –v.29. –N.5. –pp. 525-526.

31. Abubakirov A., Vacheyshvili T., Krechetova L., Ziganshina M., Demura T., Nazarenko T. A high discriminative value of LIF assessment in cervical mucus for endometrial receptive evaluation.//Hum. Reprod. -2010. –v.25. –Suppl 1: Abstract Book. –P-279. –i.224.

32. Achache H., Revel A. Endometrium receptive markers, the journey to successful embryo implantation. //Hum. Reprod. Update. -2006. –v.12. - N6. –pp. 731-746.

33. Achrekar S.K., Modi D.N., Desai S.K. Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism. //Reprod. Biomed. Online. -2009. –v.18. pp. 509-515.

34. Alazami AM., Awad SM., Coskun S., Al-Hassan S., Hijazi H., et al. TLE6 mutation causes the earliest known human embryonic letality. //Genome Biol. – 2015. –v.16. –p.240.

35. Altmae S., Esteban E.J., Stavreus-Evers A. et al. Guidelines for the design, analysis and interpretation of “omics’ data: focus on human endometrium. //Hum. Reprod Update. -2014. –v.20. -№1. -12-28.

36. Almeida P., Bolton V. The relationship between chromosomal abnormality in the human preimplantation embryo and development in-vitro. //Reprod. Fertil. Dev. –1996. –v.8. –pp..235-241.

37. Altuntas G.Z., Johnson J.M., Tuohy V.K. Autoimmune targeted disruption of the pituitary-ovarian axis causes premature ovarian failure. //J. Immunology. – v.177. –pp. 1988-1996.

38. Bakalov V.K., Anasti J.N., Calis K.A., Vanderhoof V.H., Premkumar A. et al. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. //Fertil. Steril. -2005. –v.84. –pp. 958-965.

39. Ben-Ami I., Komsky A., Bern O., Kasterstein E., Komarovsky D., Ron-El R. In vitro maturation of human germinal vesicle-stage oocytes: role of epidermal growth factor-like growth factors in the culture medium. //Hum. Reprod. -2011. –v.26. -N1. –pp. 76–81.

40. Berlanga O., Bradshaw H.B., Vilella-Mitjana F. et al. How endometrial secretomics can help in predicting implantation. //Placenta. -2011. –v.32. -№3. –pp. -271-274.

41. Berndt S., Perrier d'Hauterive S., Blacher S., Pequeux C., Lorquet S., Munaut C.et al. Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. //The FASEB Journal. -2006. -v.20. -N14. –pp. 2630-2632.

42. Bhattacharya S., Siristatidis C. Unexplained infertility: does it really exist? //Humю Reprod. -2007. –v.22. -N8. –pp.2084-2087.

43. Bielfeld P., Krussel J.S., Polfind M.L., Simon C. Regulation of embryonic implantation. //Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol. -2003. –v.110. –Suppl.1. –pp. 2-9.

44. Bo Wang, Jian-Zhong Sheng, Rong-Huan He. Et al. High expression of L-selectin ligand in secretory endometrium in associated with better endometrial receptivity and facilities embryo implantation in human being. //Am J Reprod Immunol. -2008. –v.60. –pp. 127-134.

45. Brosens I., Derwig J., Brosens L., Fusi G., Benagiano R. The enigmatic uterine junctional zone: the missing link between reproductive disorders and major obstetrical disorders? //Hum. Reprod. -2010. –v.25. –Is3. –pp. 569-574.

46. Bruse C., Guan Y. Carlberg M. et al. Basal release of urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, and soluble plasminogen activator receptor from separated and cultured endometriotic and endometrial stromal and epithelial cells. //Fertil. Steril. -2005. -v.83. -N1. –pp. 1155-1160.

47. Byung Chul Jee, Chang Suk Suh, Ki Chul Kim et al. Expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptor-1 in a luteal endometrium in patients with repeated in vitro fertilization failure. //Fertil. Steril. -2009. –v.91. -N2. –pp. 528-534.

48. Cakmak H., Taylor H.S. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. //Hum. Reprod. -2011. -v.26. -N2. -pp. 242-253

49. Chen B., Zhang Z., Sun X., Kuang Y., Mao X., et al. Biallelic mutations in PATL2 cause female infertility characterized by oocyte maturation arrest. //Am. J. Hum. Genet. –2017a. –v.101. –pp. 609-615.

50. Chen B., Li B., Li D., Yan Z., Mao X., et al. Novel mutations and structural depletion in TUBB8: expanding mutational and phenotypic spectrum of patients with arrest in oocyte maturation, fertilization or early embryonic development// Hum.Reprod. –2017b. –v.32. – pp. 457-464.

51. Chen C.D., Chiang Y.T., Yang P.K. et al. Frequency of low serum LH is associated with increased early pregnancy loss in IVF/ICSI cycles. //Reprod. BioMed. Online. -2016. –v.33. -N4. –pp. 449-457.

52. Chen N., Bian Y., Liu X., Zhao S., Wu K., Yan L. et al. A recurrent missense mutation in ZP3 causes empty follicle syndrome and female infertility. //Am. J. Hum. Genet. -2017. –v.101. -459-465.

53. Chiang T., Schultz R.M., Lampson M.A. Meiotic origins of maternal age-related aneuploidy. //Biol. Reprod. -2012. –v.86. -N1. –pp.1-7.

54. Conti M., Franciosi M. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. //Hum. Reprod. Update. -2018. –v.24. –pp. 245-266.

55. Da Broi M.G., Navarro P.A. Oxidative stress and oocyte quality: etiopathogenetic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility. //Cell Tis. Res. -2016. –v.364. –N1. –pp. 1-7.

56. Dai C., Hu L., Gong F., Tan Y., Cai S., Zhang S. et al. ZP2 pathogenic variants cause in vitro fertilization failure and female infertility. //Genet. Med. -2019. –v.21. –pp. 431-440.

57. Desai S.S., Achrekar S.K., Pathak B.R. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (G−29A) is associated with altered level of receptor expression in Granulosa cells. //J. Clin. Endocrinol. Metab. -2011. –v.96. –pp.:2805-2812

58. Diaz-Gimeno P., Horcajadas J.A., Matinez-Conejro J.A., et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. //Fertil. Steril. -2011. –v.95. –pp. 50-60.

59. Donaghay M., Lessey M. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. //Semin Reprod Med, -2007. –v.25. –pp. 461-475.

60. Doody K., Devroey P., Gordon K., Witjes H., Mannaerts B. LH concentrations do not correlate with pregnancy in rFSH/GnRH antagonist cycles. //Reprod. BioMed. Online. -2010. –v.20. –N.4. –pp. 565-567.

61. Ducibella T., Huneau D., Angelichio E., Xu Z., Schultz RM., et al. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca2+oscillation number. //Dev. Biol. –2002. –v.250. – pp. 280-291

62. Edirisinghe W., Murch A, Yovich J. Cytogenetic analysis of human oocytes and embrios in an in-vitro fertilization programme. // Hum. Reprod. –1992. – v.7. –N.2. –pp. 230-236].

63. Eggers S., Ohnesorg T., Sinclai A. Genetic regulation of mammalian gonad development. //Nat. Rev. Endocrinol. -2014. –v.11. –pp.673-683

64. Ezzati M., Djahanbakhch O., Arian S., Carr B.R. Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology. //J. Assist. Reprod. Genet. -2014. –v.31. –pp. 1337–47.

65. Falorni A., Laureti S., Candeloro P., Perrino S., Coronella C., Antonio Bizzarro A. et al. Steroid-cell autoantibodies are preferentially expressed in

women with premature ovarian failure who have adrenal autoimmunity. //Fertil. Steril. -2002. –v.78. –pp. 270-279.

66. Feng R., Sang Q., Kuang Y., Sun X., Yan Z., Zhang S. et al. Mutations in TUBB8 and human oocyte meiotic arrest. //N. Engl. J. Med. -2016. -374. –pp. 223-232.

67. Feng R., Yan Z., Li B., Yu M., Sang Q., Tian G. et al. Mutations in TUBB8 cause a multiplicity of phenotypes in human oocytes and early embryos. //J. Med. Genet. -2016. –v.53. –pp. 662-671.

68. Fleming R. and Jenkins J. The source and implications of progesterone rise during the follicular phase of assisted reproduction cycles. //Reprod. BioMed. Online. -2010. –v.21. -N4. –pp. 446–449.

69. Foulk R.,Zdraykovic T., Genbacev O. et al. Expression of L-selectin ligand MECA-79 as predictive marker of human uterine receptivity. //J Ass Reprod Genet. -2007. -v.24. –pp. 316-321.

70. Fragouli E., Escalona A., Gutierrez-Mateo C., Tormasi S., Alfarawati S., Sepulveda S. et al. Comparative genomic hybridization of oocytes and first polar bodies from young donor. //Reprod. BioMed. Online. -2009. –v.19. –N2. –pp. 228-237.

71. Fragouli E., AlfawaratiS., Spath K., Jarouri S., Sarasa J., Enciso M. et al. The origin and impact of embryonic aneuploidy. //Hum. Genet. -2013. -132. –pp. 1001-1013.

72. Gardner D.K. In vitro fertilization: a practical approach. //Informa Healthcare Usa, Inc. – New York – London, 2007. -507 p.

73. Garrido-Gomez T., Ruiz-Alonso M., Blesa D. et al. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. //Fertil. Steril. -2013. –v.32. -№4. –pp. 1078-1085.

74. Gelbaya T.A., Potdar N., Jeve Y.B., Nardo L.G.. Definition and epidemiology of unexplained infertility. //Obstet. Gynecol. Surv. -2014 –v.69. -N2. –pp. 109-115.

75. Gleicher N., Barad D. Unexplained infertility: does it really exist? //Hum. Reprod. -2006. –v.21. –pp.1951-1955.

76. Gnoth C., Godehardt E., Frank-Herrmann P., Friol K. et al. Definition and prevalence of subfertility and infertility. //Hum. Reprod. -2005. –v.20. N5. –pp 1144-1147.

77. Grey S., Cohen PE. Control of meiotic crossovers: from double-strand break formation to designation. //Annu. Rev. Genet. –2016. –v.50. -pp. 175-210.

78. Griesinger G., Shapiro D.B., Kolibianakis E.M., Witjes H., Mannaerts B.M. No association between endogenous LH and pregnancy in a GnRH antagonist protocol: part II, recombinant FSH. //Reprod. BioMed. Online. -2011. –v.23. N4. –pp. 457–465.

79. Griffin D. The incidence, origin and etiology of aneuploidy //Int. Rev. Cytol. –1996. –v.167. –pp. 263-295.

80. Grondahl M.L., Andersen C.Y., Bogstad J., Nielsen F.C., Meinertz H., Borup R. Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. //Hum. Reprod. -2010. –v.25. –pp. 957-968.

81. Gupta S.M., Meheri R.K., Reddy V.R. Expression of integrin receptors on peripheral lymphocytes: correlation with endometrial receptivity. //Am. J. Reprod. Immunol. -2001. –v.46. -N3. –pp. 188-195.

82. Handel M.A., Schimenti J.C.Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. //Nat. Rev. Genet. -2010. –v.11. –pp. 124-136.

83. Hanna C.B., Yao S., Patta M.C., Jensen J.T., Wu X. WEE2 is an oocyte-specific meiosis inhibitor in rhesus macaque monkeys. //Biol. Reprod. –2010. –v.82. –pp.1190-1197.

84. Harb H., Gallos I., Chu J., Harb M,. Coomarasamy A. The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: A systematic review and meta-analysis. //BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol. -2013. -120. –pp. 1308–1320.

85. Hassold T., Hunt P. To err (meyotically) in human: the genesis of human aneuploidy. //Nat. Rev. Genet. -2001. –v.2. –N4. –pp. 280-291.

86. Hess A.P., Hamilton A.E., Talbi S. et al. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. //Biol. Reprod. -2007. –v.76. –pp. 102-117.

87. Huang H.L., Lv C., Zhao Y.C., Li V., He X.M. et al. ZP1 in familial infertility. //N. Eng. J. Med. -2014. -370(3). -pp. 1220-1226.

88. Huang L., Tong X., Wang F., Luo L., Jin R., Fu Y. et al. Novel mutations in PATL2 cause female infertility with oocyte germinal vesicle arrest. //Hum. Reprod. – 2018. –v.33. –pp. 1183-1190.

89. Huang Y., Zhao Y., Yu, Y., Li R., Lin S., Zhang C., Liu P., and Qiao J. Altered amphiregulin expression induced by diverse luteinizing hormone receptor reactivity in granulosa cells affects IVF outcomes. //Reprod. BioMed. Online. -2015. –v.30. -N6. –pp. 593–601.

90. Hughes E.G., Beecroft M.L., Wilkie V., Burville L., Claman P., Tummon I., Greenblatt E., Fluker M., Thorpe K. A multicentre randomized controlled trial of expectant management versus IVF in women with Fallopian tube patency. //Hum. Reprod. -2004. -v.19. –pp. 1105–9.

91. Hugues J.N., Masse-Laroche E., Reboul-Marty J., Boiko O., Meynan C., Cedrin-Durnerin I. Impact of endogenous luteinizing hormone serum levels on progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotropin administration. //Fertil. Steril. -2011. –v.96. -N3. –pp. 600-604.

92. Ijland M., Evers J., Dunselman G., Volovics L., Hoogland H. Relation between endometrial wavelike activity and fecundability in spontaneous cycles. //Fertil. Steril. -1997. –v.67. –N3. –pp. 492-496.

93. Ijland M., Evers J., Dunselman G., Hoogland H. Endometrial wavelike activity, endometrial thickness and ultrasound texture in controlled ovarian hyperstimulation cycles. // Fertil. Steril. -1998. –v.70. –N2. –pp. 279-283.

94. Jacobs P., Hassold T. The origin of numerical chromosome abnormalities //Adv. Genet. –1995. –v.33. –pp. 101-133.

95. Johnson L.N., Sasson I.E., Sammel M.D., Dokras A. Does intracytoplasmic sperm injection improve fertilization rate and decrease the total fertilization

failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. //Fertil. Steril. –2013. –v.100. – pp.7 04-711.

96. Ka-Yan J., Man A., Parker A., Broughton S., Ikhlaq H., Das M. Should IUI replace IVF as first-line treatment for unexplained infertility? A literature review. //BMC Womens Health. -2023. –v.23. –N1. –p. 557

97. Kelkar R.L., Meherji P.K., Kadam S.S., Gupta S.K., Nandedkar T.D. Circulating auto-antibodies against the zona pellucida and thyroid microsomal antigen in women with premature ovarian failure. //J. Reprod. Immunol. -2005. –v.66. –pp. 53-67.

98. Kelly A.G., Pereira N., Lekovich J., Kligman I., Rosenwaks Z. Women with unexplained infertility exhibit lower ovarian reserve and ovarian response compared to age-matched controls. //Fertil. Sterril. -2017. –v.108. –Is3. –Suppl. –E216-217.

99. Krassas G.E., Poppe K., Glinoer D.. Thyroid Function and Human Reproductive Health. //Endocr Rev. -2010. –v.31. -N5. –pp. 702–755.

100. Kumar R., Alwani M., Kosta S., Kaur R., Agarwal S. BMP15 and GDF9 gene mutations in premature ovarian failure.. //J. Reprod. Infertil. -2017. –v.18.- pp. 185-189.

101. Latif S., Saridogan E. Endometriosis, Oocyte, and Embryo Quality. //J. Clin. Med. -2023. –v.12. -N13. –p.4186.

102. Layman L.C. The genetic bases of female reproductive disorders: etiology and clinical testing. //Mol. Cell. Endocrinol. –2013. –v.370. – pp. 138-148

103. Lee S.H., Lee J.H., Park Y.S., Yang K.M., Lim C.K. Comparison of clinical outcomes between in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in IVF-ICSI split insemination cycles. //Clin. Exp. Reprod. Med. –2017. –v.44. – pp. 96-104.

104. Li T., Li Y. –G., Pu D. –M. Matrix metalloproteinase- 2 and -9 expression correlated with angiogenesis in human adenomyosis. //Gyn Obstet Invest. -2006. –v.62. -N4. - pp. 229–235.

105. Liu C., Ma Y., Shang Y., Huo R., Li W. Post-transitional regulation of the maternal-to-zygotic transition. //Cell Mol. Life Sci. –2018. –v.75. –pp. 1707-1722.

106. Liu W., Bai D., ChenJ., Gao S., Additive-effect pattern of both ZP2 and ZP3 in human and mouse. //Hum. Genet. -2017. –v.136. -1493-1495.

107. Lombardo F., Gandini L., Lenzi A. et al. Antisperm immunity in assisted reproduction. //J Reprod Immunol. -2004. –v.62. -№1-2. – pp. 101-109.

108. Loutradis D., Patsoula E.. Minas V. FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs.//J. Assist. Reprod. Genet. -2006. –v.23. –pp.177-184.

109. Lu X., Gao Z., Qin D., Li L. A maternal functional module in mammalian oocyte-to- embryo transition. //Trend Mol. Med. –2017. –v..23. –pp. 1014-1023.

110. Luborsky J., Llanes B., Roussev R., Coulam C. Ovarian antibodies, FSH and inhibin B: independent markers associated with unexplained infertility. //Hum. Reprod. -2000. –v.15. -N5. –pp. 1046-1051.

111. MacLennan M., Crichton J.H., Playfoot C.J., Adams I.R. Oocyte development meiosis and aneuploidy. // Semin. Cell. Dev.Biol. –2015.-v.45. – pp. 68-76.

112. Maddirevula S., Coskun S., Alhassan S., Elnour A., Alsaif H.S. Female infertility caused by mutations in the oocyte-specific translational repressor PATL2. //Hum. Genet. –2017. –v.101. –pp. 603-608.

113. Martin J., Asan Yi.Y., Alberola T., Rodríguez-Iglesias B., Jiménez-Almazán J., Li Q. et al. Comprehensive carrier genetic test using next-generation deoxyribonucleic acid sequencing in infertile couples wishing to conceive through assisted reproductive technology. //Fertil. Steril. -2015. –v.104. –pp. 1286–1293.

114. Mascarenhas M.N., Flaxman S.R., Boerma T., Vanderpoel S., Stevens G.A. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. //PloS Med. -2012. -9(12). -e1001356.

115. Matzuk M.M., Lamb D.J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. //Nat. Med. –2008. –v.14. – pp. 1197-1213.

116. Mazumbar S., Levine A.S. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. //Fertil Steril. -1998.-v.70. –pp. 799-810.

117. Menezo Y.J., Silvestris E., Dale B., Elder K. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. //Reprod. BioMed. Online. -2016. –v.33. -N6. –pp. -668-683.

118. Merviel P., Antoine J.M., Mathieu E., Millot F., Mandelbaum J., Uzan S. Luteinizing hormone concentrations after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration do not influence pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer. //Fertil. Steril. -2004. –v.82. -N1. –pp. 119–125.

119. Minici F., Tiberi F., Tropea A. et al. Paracrine regulation of endometriotic tissue. //Gynecol Endocrinol. -2007. –v.23. –pp. 574–580.

120. Mu J., Wang W., Chen B., Wu L., Li B., et al. Mutations in NLRP2 and NLRP5 cause female infertility characterized by early embryonic arrest. //J. Med. Genet. –2019. –v.56. –N.7. –pp. 471-480.

121. Nandi A., Gudi A., Shah A., Homburg R.. An online survey of specialists' opinion on first line management options for unexplained subfertility. //Hum. Fertility. -2015. –v.18. -N1. –pp.:48–53.

122. Novosad J.A., Kalantaridou S.N., Tong Z-B., Nelson L.M. Ovarian antibodies as detected by indirect immunofluorescence are unreliable in the diagnosis of autoimmune premature ovarian failure: a controlled evaluation. //BMC Women's Health. -2003. –v.3. –pp. 2-9.

123. Obradors A., Rius M., Cuzzi J., Daina G., Gutierrez-Mateo C., Pujol A. et al. Errors in mitotic segregation early in oogenesis and first meiotic division in oocytes from donor females^ comparative genomic hybridization analyses in methaphase II oocytes and their first polar body. //Fertil. Steril. -2010. –v.93. – N2. –pp. 675-679.

124. Oh JS., Susor A., Conti M. Protein tyrosine kinase WEE 1B is essential for metaphase 2 exit in mouse oocytes. //Science. –2011. –v.332. – pp. 462-465.

125. Ono M., Harley V.R. Disorders of sex development: new genes, new concepts. //Nat. Rev. Endocrinol. -2013. -2. –pp. 79-91.

126. Pandian Z., Gibreel A., Bhattacharya S. In vitro fertilisation for unexplained subfertility. //Cochrane Database Syst Rev. -2012 -18(4):CD003357.

127. Patiño L.C., Walton K.L., Mueller T.D., Johnson K.E., Stocker W., Richani D. et al. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency reduce expression, activity, or synergy with GDF9. //J. Clin. Endocrinol. Metab.-2017. – v.102. –pp. 1009-1019.

128. Persani L., Rossetti R., Di Pasquale E., Cacciatore C., Fabr S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. //Hum Reprod Update. -2014. –v.20, - pp. 869-883.

129. Plachot M. Cytogenetic analysis and developmetal capacity of normal and abnormal embryos after IVF. //Hum. Reprod. –1989 –v.4. -N1. –pp..99-103.

130. Prescott J., Farland L., Tobias D., Gaskins A., Spiegelman D., Chavarro J. et al. A prospective cohort study of endometriosis and subsequent risk of infertility. //Hum. Reprod.- 2016 –v.31. -N7. –pp.1475–1482.

131. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. //Effectiveness and treatment for unexplained infertility. //Fertil. Steril. -2006. – v.86 -S111-S114.

132. Propst A.M., Hill M.J., Bates G.W., Palumbo M., Van Horne A.K., and Retzloff M.G. 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. //Fertil. Steril. -2011. –v.96. -N4. –pp. 898–904.

133. Qian J., Nguyen NMP., Rezaei M, Huang B.,Tao Y., et al. Biallelic PAD16 variants linking infertility, miscarriages, and hydatidiform moles. //Eur. J. Hum. Genet. – 2018. –v.26. –N.7. –pp. 1007-1013.

134. Qin Y., Jiao X.,· Simpson J.L. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. //Hum. Reprod. Update. -2015. –v.21. –pp. 787-808.

135. Qingxian Wei M.A., Benjamin J., Clair St. et al. Reduced expression of biomarkers associated with implantation window in women with endometriosis. //Fertil Steril. -2009. –v.91. -№5. –pp. 1686-1691.

136. Quaas A., Dokras A. Diagnosis and treatment of unexplained infertility. //Rev. Obstet. Gynecol. -2008. -1(2). -pp. 69–76.

137. Rackow B.W., Taylor H.S. Submucosal uterine leiomyomas have a global effect on molecular determinants of endometrial receptivity. //Fertil Steril. -2010. –v.93. –pp. 2027-2034.

138. Ramachandran A., Jamdade K., Kumar P., Adiga S.K., Bhat R.G., and Ferrao S.R. Is there a Need for luteinizing hormone (LH) estimation in patients undergoing ovarian stimulation with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists and recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH)? //J. Clin. Diagn. Res. -2014. –v.8. -N1. –pp. 90–92.

139. Raperport C., Desai J., Qureshi D., Rustin E., Balaji A., Chronopoulou E. et al. The definition of unexplained infertility: A systematic review. //BJOG. -2024. –v.131. -N7. –pp. :880-897.

140. Ray A., Shah A., Gudi A., Homburg R. Unexplained infertility: an update and review of practice. //Reprod. BioMed Online. -2012. –v.24. -N6. –pp. 591-602.

141. Ruiz-Alonso M., Blesa D., Simon C. The genomics of the human endometrium. //Biochim. Biophys. Acta. -2012.-1822. –pp. 1931-1942.

142. Ruvolo G., Bosco L., Pane, A., Morici G., Cittadini E., and Roccheri M.C. Lower apoptosis rate in human cumulus cells after administration of recombinant luteinizing hormone to women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization procedures. //Fertil. Steril. -2007. –v.87. -N3. –pp. 542–546.

143. Salamansen L.A., Hannan N.J., Dimitriadis E. Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. //Semin Reprod Med. -2007. –v.25. -№6. –pp. 437-444.

144. Sanfins A., Rodrigues P., Albertini D.F. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. //J. Assist. Reprod. Genet. -2018. –v.35. –pp. 1741—1750.

145. Sang Q., Li B., Kuang Y., Wang X., Zhang Z., Chen B. et al. Homozygous mutations in WEE2 cause fertilization failure and female infertility. //Am. J. Hum. Genet. -2018. –v.102. –pp. 649-657.

146. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. //Procl. Natl. Acad. Sci. USA. -1977. -v.74. -N12. –pp. 5463-5467.

147. Sassi A., · Desir J.. · Janssens, V. Novel inactivating follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) mutations in a patient with premature ovarian insufficiency identified by next generation sequencing gene panel analysis. //F S Rep. -2020. -1. –pp.193-201.

148. Sauer R.I., Roussev R., Jeyendran R.S., Stern J., Coulam C.B., Prevalence of antiphospholipid antibodies among women with unexplained infertility. //Ferti. Steril. -2009. –v.92. –Is3. –S116.

149. Shahine L.K., Marshall L., Lamb J.D., Hickok L.R. Higher rates of aneuploidy in blastocysts and higher risk of no embryo transfer in recurrent pregnancy loss patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization. //Fertil. Steril. -2016. –v.106. –pp. 1124–1128.

150. Shuai Zh., Tailai C.H., Mengru Yu., Yuehong B., Yongzhi CA. et al. Novel WEE2 gene variants identified in patients with fertilization failure and female infertility. //Fertil. Sterility. –2019. –v.111. –pp. 519-526

151. Siddhartha C., Rajib G.C., Sandip D., Vishnu P.. Minor tubal defects—the unnoticed causes of unexplained infertility. //J. Obstet. Gynaecol. India. -2010. –v.60. –pp. 331–336.

152. Simoni M., Nieschlag E., Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. //Hum. Reprod. Update. -2002. –v.8. -413-421.

153. Siristatidis C., Bhattacharya S. Unexplained infertility: does it really exist? Does it matter? //Hum. Reprod. -2007 –v.22. -N8. –pp. :2084-72087.

154. Somigliana E., Vigano P., Benaglia L., Busnelli A., Berlanda N., Vercellini P. Management of Endometriosis in the Infertile Patient. //Semin. Reprod. Med. -2017. –v.35. –pp. 31–37.

155. Stavreus-Evers A., Aghajanova L., Nikas Y. et al. Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation. //Mol. Hum. Reprod. -2002. –v.8. –pp. 765-769.

156. Stavreus-Evers A., Mandelin E., Koistenen R. et al. Glycodelin is present in pinopodes of receptive phase human endometrium, and its presence is associated with down regulation of progesterone receptor B. //Fertil Steril. -2006. –v.85. -N6. –pp. 1803-1811.

157. Sudo S.. Kudo M.. · Wada S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. //Mol. Hum. Reprod. -2002. –v.8. –pp. 893-899.

158. Tanbo T., Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. //Acta Obst. Gyn. Scand. -2017. –v.96. N6. –pp. 659-667.

159. Tal R., Seifer D.B. Ovarian reserve testing: a user’s guide. //Am. J. Obstet. Gynecol. -2017. –v.217. -N2. -pp. 129-140.

160. Tesarik J., Hazout A., and Mendoza C. Luteinizing hormone affects uterine receptivity independently of ovarian function. //Reprod. BioMed. Online. -2003; v.7. -N1. –pp. 59–64.

161. Tiegs A.W., Franasik J. The embryo day 5 versus day 5 ET. //Encyclopedia of Reproduction (Second Edition), Elsevier, 2018, v.5. –pp. 578-583.

162. Tonacchera M., Ferrarini E., Dimida A., Agretti P., De Marco G., De Servi M. et al. Gonadotrophin receptor blocking antibodies measured by the use of cell lines stably expressing human gonadotrophin receptors are not detectable in women with 46,XX premature ovarian failure. //Clin. Endocrinol. -2004. –v.61. – pp. 376-381.

163. Tosti E., Menezo Y. Gamete activation: basic knowledge and clinical applications. // Hum. Reprod. Update. –2016. –v.22. – pp. 420-439.

164. Tsigkou A., Marzotti S., Borges L., Brozzetti A., Reis P., Candeloro P. et al. High Serum Inhibin Concentration Discriminates Autoimmune Oophoritis from Other Forms of Primary Ovarian Insufficiency. //J. Clin. Endocrinol. Metab. -2008. –v.93. –N4. –pp. 1263-1269.

165. Tsiligiannis S.. · Panay N., · Stevenson J.C. Premature ovarian insufficiency and long-term health consequences. //Curr. Vasc. Pharmacol. -2019. –v.17. – pp.604-609

166. Tsuji I., Ami K., Miyazaki A., Hujinami N., Hoshiai H. Benefit of diagnostic laparoscopy for patients with unexplained infertility and normal hysterosalpingography findings. //Tohoku J Exp Med. -2009. -219. -pp. 39–42.

167. Tung K.S., Garza K.M., Lou Y., Bagavant H. Autoimmune Ovarian Disease: Mechanism of Induction and Prevention. //J. Soc. Gynecol. Invest. -2001. –v.8. – Suppl.1. –S49-S51.

168. Van Gestel H., Bafort C., Meuleman C., Tomassetti C., Vanhie A. The prevalence of endometriosis in unexplained infertility: a systematic review //Reprod. Biomed. Online. -2024 –v.49. N3:103848.

169. Vissenberg R., Manders V.D., Mastenbroek S., Fliers E., Afink G.B., Ris-Stalpers C., et al. . Pathophysiological Aspects of Thyroid Hormone Disorders/Thyroid Peroxidase Autoantibodies and Reproduction. //Hum. Reprod. Update -2015. –v.21. -N3. –pp. 378–387.

170. Wang X., Song D., Mykytenko D., Kuang Y., Li B., et al. Novel mutations in genes encoding subcortical maternal complex proteins may cause human embryonic developmental arrest. //Reprod. BioMed. Online. –2018. –v.36. –pp. 698-704.

171. Webster A., Schuh M. Mechanisms of aneuploidy in human eggs. //Trends in Cell Biol. //2017. –v.27. -N1. –pp.55-68.

172. Weghofer A., Munne S., Brannath W., Chen S, Tomkin G., Cekleniak N. et al. The impact of LH-containing gonadotropins on diploidy rates in preimplantation embryos: long protocol stimulation. //Hum. Reprod. -2008. -23. -N3. –pp. 499-503.

173. Westergaard L.G., Laursen S.D., Andersen C.Y. Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction. Hum. Reprod. -2000. –v.15. -N5 –pp. 1003-1008.

174. Wood M.A., Raikovic A. Genomic markers of ovarian reserve. //Semin. Reprod. Med. –2013. –v.31. –pp. 399-415.

175. Wramsby H., Fredga K., Lienholm P. Chromosomes analysis of human oocytes recovered from preovulatory follicles in stimulated cycles. //N. Engl. J. Med. –1987. –v.316. -N3. –pp. 121-124.

176. Xu B., Guo N., Zhang X.M., Shi W., Tong X.H., Iqbal F. et al. Oocyte quality is decreased in women with minimal or mild endometriosis. //Scientific Reports. -2015. -5. -10779.

177. Xu Y., Shi Y., Fu J., Yu M., Feng R., Sang Q., Liang B. et al. Mutations in PADI6 cause female infertility characterized by early embryonic arrest. //Am. J. Hum. Genet. -2016. –v.99. –pp. 744-752.

178. Yan J.H., Wu K.L., Tang R., Ding L.L., Chen Z.J. Effect of maternal age on the outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). //Sci. China Life Sci. -2012. –v.55. –pp. 694-698.

179. Yanez L.Z., Han J., Behr B.B., Reijo Pera R.A., Camarillo D.B. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. //Nat. Commun. –2016. –v.7. –pp. 108-109.

180. Yang P.K., Wu M.Y., Chao K.H., Chang C.H., Chenb M.J., Chen S.U.. Lower rate of early pregnancy loss in patients experiencing early-onset low LH in GnRH antagonist cycles supplemented with menotropin. //Journal of the Formosan Medical Association. -2019. -118(1/1). –pp. 92-98.

181. Yatsenko S.A., Rajkovic A. Genetics of human female infertility. //Biol. Reprod. -2019. –v.101 –Is.3. –pp. 549–566.

182. Yücel B., Kelekci S., Demirel E. Decline in ovarian reserve may be an undiagnosed reason for unexplained infertility: a cohort study. //Arch. Med. Sci. -2018. –v.14. –N3. –pp. 527-531.

183. Zamah A.M., Hsieh M., Chen J., Vigne J.L., Rosen M.P., Cedars M.I., Conti M. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. //Hum. Reprod. -2010. –v.25. –N10. –pp. 2569–2578.

184. Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., Dyer S,. Racowsky C., de Mouzon J., Sokol R., et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care. 2017. //Fertil. Steril. -2017. -v.108. -N3. –pp.:393–406.

185. Zichler D., Kleckner N. Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. //Cold Spring Harb Perspect Biol. –2015. –v.l7 –pp.16-26.