

На правах рукописи

ДЕНИСЕНКО МАРГАРИТА ВЛАДИМИРОВНА

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
СОСТОЯНИЯ ООЦИТ-ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ В ОЦЕНКЕ
ОВАРИАЛЬНОГО РЕЗЕРВА**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва - 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН

Курцер Марк Аркадьевич

доктор биологических наук, профессор

Курило Любовь Федоровна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор **Назаренко Татьяна Алексеевна**
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, директор института репродуктивной медицины

Доктор медицинских наук, профессор **Серебренникова Клара Георгиевна**
Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Центральная клиническая больница Российской академии наук», научный руководитель по акушерству и гинекологии

Ведущая организация:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Защита диссертации состоится «___»_____2018 года в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета Д208.072.15 на базе ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И.Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1; и на сайте: www.rsmu.ru

Автореферат разослан «___»_____2018 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

Доктор медицинских наук, профессор

Хашукоева Асият Зульчифовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В мировой литературе сообщения о методах, определяющих состояние овариального резерва (ОР), стали появляться с конца 1980-х годов. В настоящее время интерес к изучению этого вопроса не ослабевает. Обсуждают роль новых факторов (Боярский К.Ю., 2009), способных наиболее точно отразить функциональное состояние яичников, которое во многом отражает репродуктивный потенциал организма и эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Обобщая известные в литературе сведения, можно выделить предлагаемые в настоящее время следующие показатели и методы определения состояния ОР:

- оценка клинических данных: возраст пациентки, наличие гинекологических заболеваний (воспалительных, яичниковых образований), перенесенных оперативных вмешательств на яичниках, химиотерапии по поводу онкологических заболеваний;
- ультразвуковой метод: измерение объема яичников, определение количества антральных фолликулов (КАФ);
- определение уровня антимюллера гормона (АМГ) в сыворотке крови;
- гистологический метод: количественный анализ числа фолликулов в биоптатах яичников, полученных при лапароскопии.

Влияние различных факторов на функциональное состояние яичников определяет значительную вариабельность биохимических и ультразвуковых характеристик, что нивелирует их диагностическую значимость в дефиниции овариального резерва.

Роль биопсии яичников в оценке состояния резерва фолликулов в настоящее время широко обсуждают. Биопсия яичников позволяет получить необходимые данные о состоянии преантральных и антральных фолликулов и может являться информативным методом изучения фолликулогенеза. Massin N. et al. (2004) была доказана более высокая диагностическая значимость биопсии яичника по сравнению с определением КАФ при помощи УЗИ.

Использование лапароскопии дает возможность производить биопсию

яичниковой ткани во время операций на органах малого таза, не влияя на дальнейшее функционирование яичников (Кулаков В.И., 1997; Кузьмичев Л.Н., 2001).

Разнородность применяемых методов в репродуктологии, отсутствие сравнения эффективности различных методов позволяют говорить о множестве нерешенных задач в данной проблеме.

Цель исследования

Повысить качество диагностики состояния ОР и определить его прогностическое значение в репродуктивной функции.

Задачи исследования

1. Дать оценку следующим методам определения состояния ОР: УЗИ (КАФ, объем яичников), измерение концентрации АМГ в сыворотке крови. Сопоставить их с гистологическим методом исследования (состоянием ооцит-фолликулярной системы).
2. Определить факторы, способствующие снижению ОР.
3. На основании изучения состояния примордиального пула, растущих фолликулов при биопсии минимального количества яичниковой ткани пациенток определить параметры нормального и сниженного ОР.
4. Оценить прогностическое значение параметров, характеризующих ОР, в отношении наступления беременности.
5. Оценить значимость нормальных и патологических форм ооцитов в частоте наступления беременности.
6. Выявить категории пациенток, которым для достижения беременности показано использование донорских ооцитов в рамках программы ЭКО.

Научная новизна исследования

Не отвергая ценность УЗ-параметров и измерение концентрации АМГ в сыворотке крови для оценки состояния ОР, доказана наибольшая значимость гистологического исследования биоптатов яичников. УЗ-параметры и уровень АМГ в сыворотке крови умеренно коррелируют с количеством растущих фолликулов на гистологических срезах биоптатов яичников.

У пациенток с клинически предполагаемым сниженным ОР научно обоснована необходимость оценки состояния ооцит-фолликулярной системы на срезах биоптатов яичников и показано преимущество гистологического метода исследования в прогнозировании наступления беременности.

Измененное качество ооцитов (крупные вакуоли в ооплазме, ооциты неправильной формы, толщина зоны пеллюциды (ZP) более 18мкм) свидетельствует о неблагоприятном прогнозе в отношении наступления беременности.

Доказана целесообразность проведения биопсии яичника у пациенток с бесплодием во время любого оперативного вмешательства на органах малого таза, производимого лапароскопическим доступом.

Практическая значимость

Определение УЗ-параметров, уровня АМГ в сыворотке крови имеет безусловное скрининговое значение в оценке состояния ОР, особенно у женщин позднего репродуктивного возраста.

Гистологическое исследование биоптатов яичников является надежным методом оценки фолликулярного аппарата, так как даже при малых размерах биоптата возможно обнаружить ранний фолликулярный рост (фолликулы до 2мм в диаметре), что невозможно сделать при УЗИ, при котором определяются фолликулы более 2 мм в диаметре.

Большое значение имеет не только количество фолликулов, но и качество ооцитов в фолликулах разных стадий развития при гистологическом исследовании.

При крайне низком ОР (отсутствие примордиальных, растущих преантральных фолликулов по данным гистологического исследования) для достижения беременности следует использовать донорские ооциты в рамках программы ЭКО.

Установленные характеристики разных типов фолликулов и ооцитов позволяют расширить сведения о состоянии ОР и подтвердить ценность

полученной информации для диагностики и прогноза репродуктивных возможностей женщины.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Объем яичников и КАФ при УЗИ органов малого таза, уровень АМГ в сыворотке крови являются важными скрининговыми методами в определении состояния ОР, но не имеют значения в прогнозе наступления беременности.
2. Важное диагностическое и прогностическое значение в наступлении беременности имеет наличие в яичниках примордиальных фолликулов, **первичных однослойных фолликулов среднего диаметра менее 62 мкм.**
3. Биоптат яичника целесообразно получать у пациенток с бесплодием с предполагаемым сниженным ОР при лапароскопии по поводу доброкачественных образований яичников, трубно-перитонеального бесплодия.
4. Патологические формы ооцитов, обнаруженные в биоптатах яичников снижают частоту наступления беременности.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты проведенной работы внедрены в практику гинекологического отделения ГБУЗ ЦПСиР, отделения ВРТ Перинатального медицинского центра «Мать и дитя», лаборатории нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетического научного центра», а также используются в педагогическом процессе на лекциях и практических занятиях со студентами, ординаторами, аспирантами, курсантами ФУВ на кафедре акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Международной научно-практической конференции «Репродуктивные

технологии в онкологии» (г. Обнинск, май 2015 г); Международном форуме «Новые горизонты репродуктивного здоровья» (г. Москва, июль 2015г.); III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (г. Москва, ноябрь 2017г.)

Апробация диссертации состоялась на совместной научно-практической конференции сотрудников кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России, Факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, врачей ГБУЗ ЦПСиР ДЗ г.Москвы и Перинатального медицинского центра «Мать и дитя».

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 4 – в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ.

Личный вклад автора

Автором обследованы пациентки с предполагаемым сниженным ОР, проведены ультразвуковые исследования органов малого таза, произведены забор крови для определения концентрации АМГ, биоптатов. Соискатель принимал непосредственное участие в микроскопическом исследовании гистологических срезов яичников. Количественный анализ, интерпретация, изложение полученных данных, формулирование выводов и практических рекомендаций выполнены автором лично. Осуществлен статистический анализ полученных результатов и внедрены в практику результаты данного исследования.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 116 страницах печатного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы, включающего 37 отечественных и 106 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 17 таблицами, 17 графиками и 21 рисунком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в период с 2014 по 2017 год на кафедре акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова (зав. кафедрой – академик РАН, д.м.н., профессор М.А. Курцер), на клинических базах кафедры: Центр Планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения г. Москвы (главный врач – к.м.н. О.А. Латышкевич), Перинатальный медицинский центр «Мать и дитя» (главный врач – Т.О. Нормантович); лаборатории генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетического научного центра» (д.б.н., проф. Л.Ф. Курило). Все пациентки дали согласие на участие в исследовании, протокол которого одобрен локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И.Пирогова.

Согласно поставленным цели и задачам, исследовано состояние ОР у 89 пациенток с доброкачественными образованиями яичников (ДОЯ) (n=37), с трубно-перитонеальным фактором бесплодия (ТПФ) (n=50), лимфопролиферативным заболеванием (n=2). Проведена оценка менструальной и репродуктивной функций.

Критерием включения были пациентки в возрасте от 18 до 43 лет, подготовленные к плановой лапароскопии на органах малого таза.

Критерии исключения – тяжелые соматические заболевания, возраст более 43 лет.

На дооперационном этапе все пациентки проходили общеклиническое, эхографическое, клиничко-лабораторное обследование. Всем обследованным было выполнено оперативное вмешательство лапароскопическим доступом по стандартной общепринятой методике. Для гистологической оценки состояния ОР во время лапароскопии проводили биопсию одного из яичников.

На *первом этапе* работы у обследованных пациенток произведена оценка состояния ОР с помощью: УЗИ органов малого таза (n=89); измерения концентрации АМГ в сыворотке крови (n=72); подсчета количества фолликулов различных стадий развития и оценки их качества на гистологических срезах биоптатов яичников (n=89).

УЗИ яичников выполняли в первую фазу цикла с помощью ультразвукового аппарата экспертного класса LOGIQ P6 (GE, США) по стандартной методике с транвагинальным датчиком (3,7-9,3МГц): подсчитывали КАФ (2-5 мм в диаметре); объем яичника (V) рассчитывали по упрощенной формуле эллипса как произведение длины (L), толщины (Т) и высоты (W) яичника, умноженное на 0,532: $V=W*L*T*0,532$.

Изучили состояние ОР у всех пациенток по УЗ-параметрам (при нормальном ОР (n=38) объем яичника более 8см^3 , КАФ более 5 в каждом яичнике; при сниженном ОР (n=51) объем яичника менее или равен 8см^3 , КАФ менее или равно 5 в каждом яичнике). Выяснили, как изменяются УЗ-параметры с возрастом. Сравнили V (см^3) яичников и КАФ до лапароскопии у пациенток, перенесших операции на яичниках, тубэктомии.

Забор крови для определения концентрации АМГ выполняли перед оперативным вмешательством. Пробирки с кровью доставляли в лабораторию, где методом центрифугирования получали сыворотку. Далее определяли концентрацию гормона методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) с помощью наборов реактивов фирмы Beckman Coulter (USA).

Определили состояние ОР по уровню АМГ в сыворотке крови (при нормальном ОР концентрация АМГ от 1,0 до 12,5 нг/мл; при сниженном ОР концентрация АМГ от 0,2 до 0,9 нг/мл. Выяснили, как меняется концентрации АМГ в сыворотке крови в зависимости от возраста пациенток. Сравнили концентрацию АМГ до лапароскопии у пациенток, перенесших операции на яичниках, тубэктомии.

Для оценки состояния ооцит-фолликулярной системы яичников у всех пациенток выполняли биопсию одного из яичников во время плановой лапароскопии на органах малого таза. Пациентками были подписаны добровольные информированные согласия. Биопсию у оперированных по поводу ДОЯ проводили биопсийными щипцами следующим образом: при вылушивании кист (n=21) – из ложа; при резекции яичника (n=16) – с поверхности стенки образования. У больных с ТПФ одновременно с рассечением спаек проводили

забор биоптата с коркового слоя яичника (биопсию выполняли согласно Приказу МЗ РФ от 1.11.2012г №572н, «Приложение №20»). Биоптаты объемом 0,5 см³ фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (n=46) или в смеси Буэна (n=43), приготовленного *ex tempore*. Далее фиксированные биоптаты доставляли в лабораторию, где после гистологической проводки в спиртах восходящих концентраций, ксилолах и заливки в парафин, серийные срезы толщиной 7-8 мкм, размещенные на предметные стекла, окрашивали гематоксилином Эрлиха с подкраской эозином, обезвоживали и заключали в канадский бальзам.

Гистологическое исследование биоптатов яичников выполняли в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», в лаборатории генетики нарушений репродукции (зав. лаб. - д.б.н., проф. Курило Л.Ф.) с помощью микроскопа «Биомед 4». Подсчет числа примордиальных и растущих, полостных фолликулов, оценку состояния структур ооцитов проводили по методу, разработанному для парафиновых срезов яичников при увеличении микроскопа в 100 и 400 раз (Курило Л.Ф., Патент на изобретение №2367949-03/IV - 2008). Подсчитывали число растущих фолликулов согласно международной гистологической номенклатуре (Gougeon A., 1996).

В ходе работы проводили оценку состояния ОР по среднему диаметру первичных однослойных фолликулов (при нормальном ОР средний диаметр ПвФ менее 62мкм n=18; при сниженном ОР средний диаметр ПвФ более 62мкм n=71). Установили связь количества ПФ с возрастом. Сравнивали средний диаметр ПвФ у пациенток, перенесших операции на яичниках, тубэктомии. Сопоставляли количество примордиальных, первичных однослойных и двухслойных фолликулов, а также средний диаметр примордиальных, первичных одно-, двух- и трехслойных фолликулов.

После объективной оценки морфо-функционального состояния яичников была окончательно установлена ценность каждого метода определения ОР. Проведен анализ объема яичников, КАФ и концентрации АМГ в сыворотке крови; сопоставлены УЗИ-параметры и уровень АМГ с количеством фолликулов

разных стадий развития на срезах биоптатов яичников.

На *втором этапе* определены прогностические критерии наступления беременности у пациенток с бесплодием.

Выявлена частота наступления беременности при оценке состояния ОР по УЗ – параметрам, по уровню АМГ в сыворотке крови, по среднему диаметру первичных однослойных фолликулов; определено оптимальное пороговое значение среднего диаметра первичных однослойных фолликулов, при котором наступает беременность, с помощью ROC-анализа.

Проведена оценка качества фолликулов всех стадий развития у пациенток с наступившей (n=22) и не наступившей беременностью (n=28) в течение года после проведенной лапароскопии.

Определена категория пациенток, которым для достижения беременности показано использование донорских ооцитов в рамках программы ЭКО.

Для статистической обработки результатов исследования использовали следующие программные пакеты: Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics 23.0. Количественные показатели представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение (Mean – среднее, SD – стандартное отклонение). Качественные показатели представляли в виде частоты и доли (%). Для оценки меры связи между парами количественных показателей использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень значимости для всех критериев и тестов принимали равным 5%, т.е. нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. Если не указано иное, использовали двухсторонние варианты статистических критериев.

Для сравнения уровня количественных показателей по группам ОР, наступлению беременности использовали одномерный дисперсионный анализ (общая линейная модель) с последующим апостериорным анализом методами наименьшей значимой разницы, по Шеффе, Бонферрони. Для сравнения частоты наступления беременности по группам и факторам риска использовали критерий χ -квадрат или точный критерий Фишера (при ожидаемом числе хотя бы в одной ячейке таблицы сопряженности меньше 5).

Для оценки предсказательной ценности различных количественных и качественных факторов в плане наступления беременности использовали метод бинарной логистической регрессии с последовательным включением значимых факторов предсказания по Вальду. Качество подобранной регрессионной модели оценивали при помощи ROC-анализа (Receiver Operating Characteristic analysis). Принципом ROC-анализа является сопоставление чувствительности и специфичности для данной регрессионной модели. ROC-кривые представляют собой график зависимости истинно положительных от ложно положительных решений, принимаемых наблюдателем при оценке результатов тестов. В нашем исследовании мы руководствовались тем, что чувствительность – это доля положительных результатов теста среди пациенток с наступившей беременностью, специфичность – доля отрицательных тестов среди пациенток, у которых беременность не наступила. При анализе ROC-кривых придерживаются следующего принципа: чем ближе к левому верхнему углу координатной сетки расположена кривая (т.е. чем больше площадь под ROC-кривой), тем выше информативность исследуемого признака. Если кривая прилежит к диагонали (или совпадает), то информативность признака ничтожна.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Жалобы на отсутствие беременности предъявляли 52 пациентки. Продолжительность бесплодия у данных пациенток составила от полугода до 15 лет. Остальные женщины хотели бы реализовать репродуктивную функцию менее, чем через год. Первичное и вторичное бесплодие встречалось примерно с одинаковой частотой (33,7 и 22,5% соответственно).

У 23 из всех обследованных пациенток (25,8%) в анамнезе были роды: у 17(19,1%) - одни, у 5(5,6%) - двое, у 1(1,12%) – трое. У 66 (74,2%) не была реализована репродуктивная функция.

Известно, что важнейшим физиологическим фактором, определяющим благополучие репродуктивной функции, а также успех лечения бесплодия, является возраст женщины. Возраст всех обследованных колебался от 18 до 43

лет, составив в среднем $31 \pm 6,25$ лет. 17 пациенток (19,1%) были позднего репродуктивного возраста (старше 35 лет): 36-38 лет – 9 (10,1%), 39-40 лет – 3 (3,4%), 41-42 года - 4 (4,5%) и 43 года - 1 (1,1%). Из них 7 с ДОЯ, 10 с ТПФ; у 6 – одни роды в анамнезе, у 4 – двое родов в анамнезе, у 7 не была реализована репродуктивная функция.

Значительное влияние на состояние ОР могут оказывать оперативные вмешательства на органах малого таза, интоксикации, химиотерапия онкологических заболеваний. У 7 пациенток из всех обследованных (7,87%) в анамнезе были операции на яичниках по поводу доброкачественного образования, у 6 (6,74%) – тубэктомия в связи с трубной беременностью, у 25 (28,09%) – хронический сальпингоофорит, у 2 пациенток (2,25%) химиотерапия по поводу лимфогранулематоза.

На первом этапе работы при оценке состояния ОР по УЗ-параметрам мы выяснили, что 42,70% пациенток имели нормальный ОР (объем яичника более 8 см^3 , КАФ более 5 в каждом яичнике). 57,30% имели сниженный ОР (объем яичника менее или равен 8 см^3 , КАФ менее или равно 5 в каждом яичнике).

При исследовании установлено: средний объем яичников в возрасте старше 35 лет составил $7,3 \pm 3,8 \text{ см}^3$ для правого яичника, $9,5 \pm 6,4 \text{ см}^3$ – для левого яичника. Среднее значение КАФ в возрасте старше 35 лет составило $6,0 \pm 2,8$ для правого яичника, $5,0 \pm 2,0$ – для левого яичника. При увеличении возраста достоверно снижаются объем яичников (для правого яичника $p=0,029$, для левого яичника $p=0,007$) и КАФ ($p=0,026$, $p=0,036$ для правого и левого яичника соответственно), что подтверждает литературные данные (график. 1).

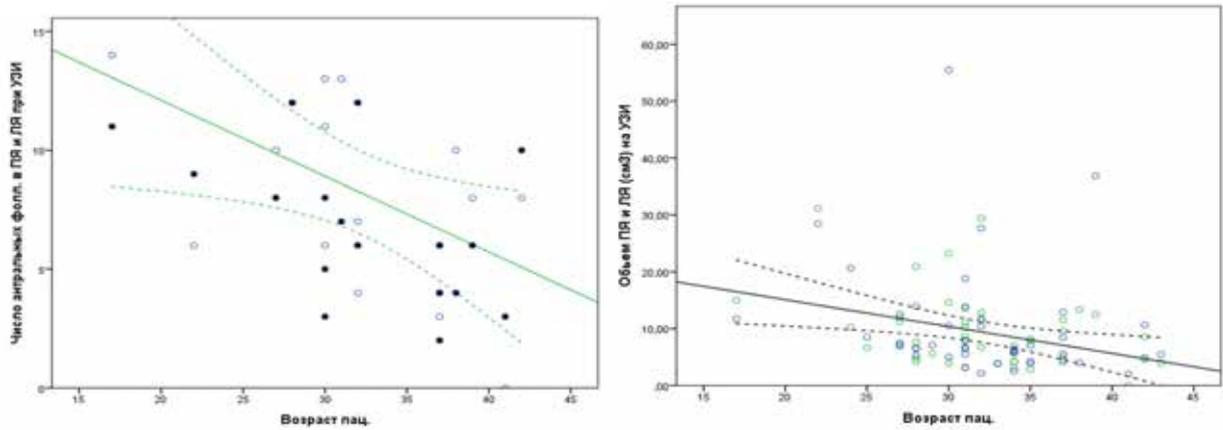


График 1. Количество андральных фолликулов и объем яичников по данным УЗИ и возраст пациенток, подвергшихся биопсии яичника

Сниженный ОР, определенный по УЗ-параметрам до лапароскопии, был у 60,0% пациенток с хроническим сальпингоофоритом; у 83,0%, перенесших тубэктомия; у 85,7%, перенесших операцию на яичниках; у 100%, перенесших химиотерапию по поводу лимфогранулематоза, у 27,0% пациенток с эндометриоидными образованиями яичников.

Таким образом, УЗ-параметры изменяются с возрастом, зависят от перенесенных операций на органах малого таза, химиотерапии, наличия эндометриоидных образований яичников. Этот метод оценки состояния ОР можно рассматривать как значимый.

В нашей работе концентрация АМГ в сыворотке крови оказалась достоверно ниже у пациенток позднего репродуктивного возраста ($p=0,021$), составив $2,0 \pm 1,8$ нг/мл. (график 2).

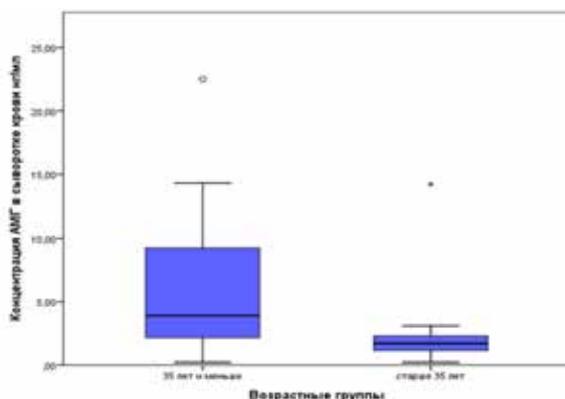


График 2. Концентрация АМГ в сыворотке крови у пациенток до и после 35 лет.

Нормальный ОР, определенный по уровню АМГ в сыворотке крови до лапароскопии, выявлен у пациенток с хроническим сальпингоофоритом, перенесших операции на яичниках, тубэктомии или лимфогранулематоз (АМГ 1,0-12,5 нг/мл), что не соответствует данным УЗИ. Следует предполагать, что концентрация АМГ в сыворотке крови не отражает истинное состояние фолликулярного аппарата яичников.

Таким образом, концентрация АМГ в сыворотке крови коррелирует с возрастом пациенток. Этот метод оценки состояния ОР, так же как и УЗ-метод, можно рассматривать как значимый у пациенток позднего репродуктивного возраста.

При гистологическом исследовании в среднем на один биоптат объемом 0,5 см³ приходилось 96 ± 34 серийных срезов толщиной 7-8 мкм. Общее число проанализированных срезов у всех пациенток составило 8284. На срезах подсчитывали количество примордиальных (ПФ), первичных однослойных (ПвФ), первичных двух-трехслойных (Дв.Ф., Тр.Ф), многослойных – вторичных преантральных (Мн.Ф), вторичных малых антральных фолликулов (Ант.Ф), измеряли их диаметр, оценивали состояние ооцитов в них.

Ввиду отсутствия в литературе данных о нормальном и сниженном ОР на основании гистологических параметров, мы приняли за основу критерий наступления беременности в зависимости от состояния ооцит-фолликулярной системы. Были выбраны количественные показатели (число и средний диаметр фолликулов разных стадий развития), которые включили в логистическую регрессионную модель предсказания наступления беременности. Использовали подход последовательного включения значимых факторов по Вальду. Эмпирическим путем выяснено, что с частотой наступления беременности коррелирует только **средний диаметр первичных однослойных фолликулов** ($p=0,018$; отношение шансов 2,16 (ДИ 2,03-2,31)). Это дало нам возможность разделить пациенток на две группы: в группу с нормальным ОР (средний диаметр ПвФ менее 62 мкм) вошли 20,2% пациенток ($n=18$), в группу со сниженным ОР (средний диаметр ПвФ более 62 мкм) - 79,8% пациенток ($n=71$).

У пациенток позднего репродуктивного возраста количество ПФ было достоверно меньше ($39,0 \pm 33,8$ в биоптате) в сравнении с их количеством в возрасте до 35 лет ($184,0 \pm 163,0$ в биоптате) [$p=0,004$], что соответствует данным литературы. У 2 пациенток позднего репродуктивного возраста ни одного ПФ и растущего фолликула не было обнаружено во всем биоптате. У пациенток старше 35 лет выражен фиброз стромы яичниковой ткани с незначительным количеством или отсутствием примордиальных и растущих фолликулов.

Выявлен сниженный ОР по гистологическим данным (диаметр ПФ более 62 мкм) у 76,1% пациенток с хроническим сальпингоофоритом, у 85,8% после операций на яичниках, у 50% после тубэктомии, у 100% после химиотерапии.

У пациенток после лечения лимфогранулематоза и у 2 с эндометриозными образованиями обоих яичников больших размеров ни одного ПФ и растущего фолликула не было обнаружено во всем биоптате. Причиной бесплодия могут быть повышенный апоптотический индекс клеток гранулезы, дегенерация ооцитов, дистрофические и дегенеративные процессы в гранулезных и тека-клетках фолликулов, нарушенный стероидогенез в гранулезных клетках фолликулов. Таким пациенткам для достижения беременности можно рекомендовать программу ЭКО с использованием донорских ооцитов.

После объективной оценки морфо-функционального состояния яичников окончательно установлена ценность каждого метода определения ОР.

При анализе объема яичников, КАФ при УЗИ и концентрации АМГ в сыворотке крови получены следующие данные: при большем объеме яичников и большем количестве антральных фолликулов концентрация АМГ в сыворотке крови достоверно выше: $p>0,05$ (график 3).

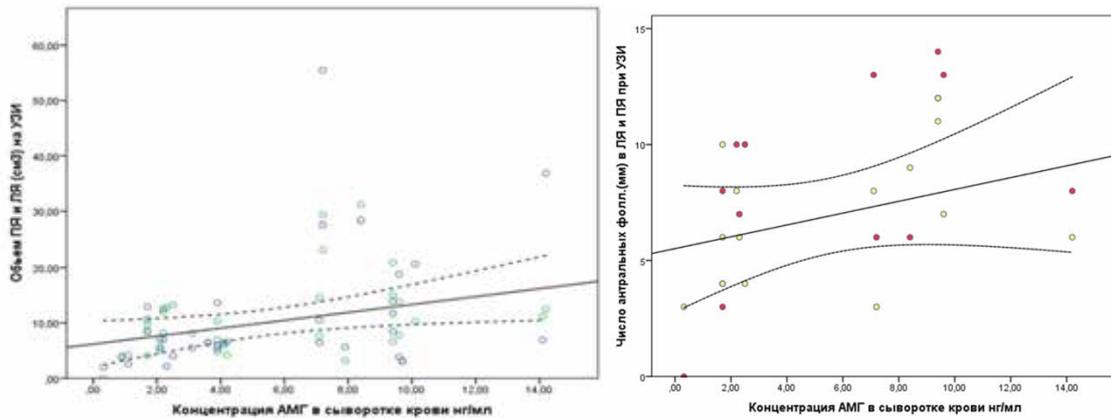


График 3. Объем яичников и КАФ при УЗИ и концентрация АМГ.

Известно, что при УЗИ возможно оценить лишь КАФ диаметром более 2 мм, в то время как основной фолликулярный запас остается неисследованным. Проведен сравнительный анализ КАФ (более 2мм в диаметре) при УЗИ и количества малых антральных фолликулов (менее 2 мм в диаметре) при гистологическом исследовании: выявлена прямая корреляция между исследуемыми параметрами: $r=0,02$ (график 4).

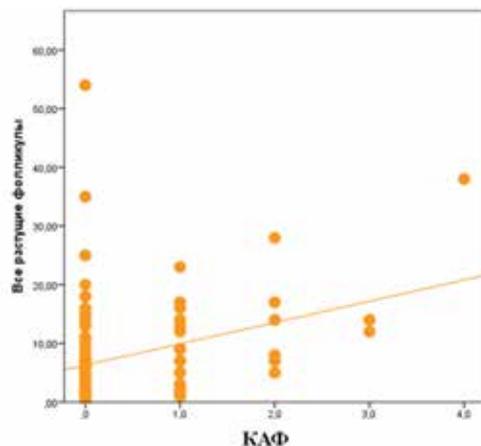


График 4. Количество антральных фолликулов при УЗИ и количество растущих фолликулов при гистологическом исследовании

Полученные данные подчеркивают значимость подсчета КАФ как скринингового метода оценки состояния ОР.

Можно предположить, что АМГ, секретируемый преимущественно растущими фолликулами, косвенно отражает размеры пула примордиальных фолликулов. Учитывая эти данные, исследовано наличие или отсутствие корреляции между уровнем АМГ и количеством фолликулов разных стадий

развития в биоптатах яичников (примордиальные, первичные однослойные, двухслойные, трехслойные, многослойные - вторичные преантральные, вторичные антральные). Пациентки были разделены на две группы соответственно показателям АМГ. При сравнении гистологических параметров ОР пациенток выявлено: при сниженном ОР, определенном по уровню АМГ, количество ПФ было в 2,8 раза меньше, количество ПвФ в 2 раза меньше. Вероятно выраженная тенденция прямой зависимости уровня АМГ от количества ПФ и ПвФ не была статистически значимой ($p=0,12$) ввиду малой численности группы пациенток со сниженным ОР, определенном по уровню АМГ ($n=7$).

В ходе работы проведено сравнение количества всех растущих (малых антральных) фолликулов при гистологическом исследовании с концентрацией АМГ в сыворотке крови: прослеживалась тенденция прямой зависимости между исследуемыми параметрами, однако статистической достоверности не выявлено: $p=0,178$ (график 5).

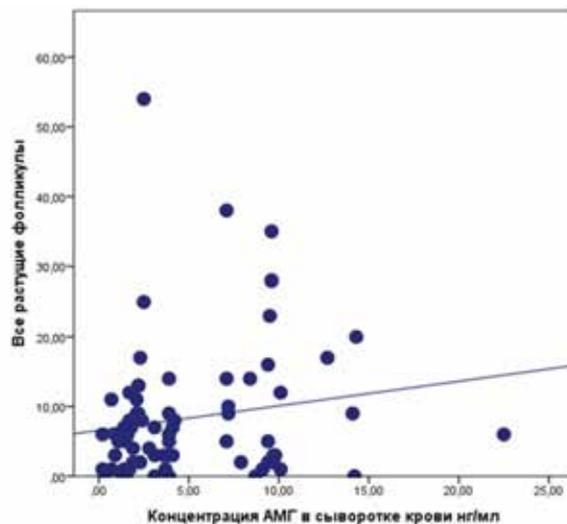


График 5. Концентрация АМГ в сыворотке крови и количество растущих фолликулов при гистологическом исследовании.

На втором этапе работы проведено сравнение частоты наступления беременности при нормальном и сниженном ОР на основании оценки его состояния по УЗ – параметрам, уровню АМГ в сыворотке крови, диаметру первичных однослойных фолликулов.

Сопоставление УЗ-параметров и частоты наступления беременности проведено у 50 пациенток.

У 22 из 50 пациенток наступила беременность (44,0%). При этом у 20 (40,0%) пациенток моложе 35 лет (у 12 (24,0%) – самопроизвольная, у 7 (14,0%) – после ЭКО, у 3 (6,0%) – после КИО) и у 2 (4,0%) старше 35 лет (беременность после ЭКО). Частота наступления беременности у пациенток с нормальным и сниженным ОР по данным УЗИ значимо не различалась: $p=0,833$ (рис.4).

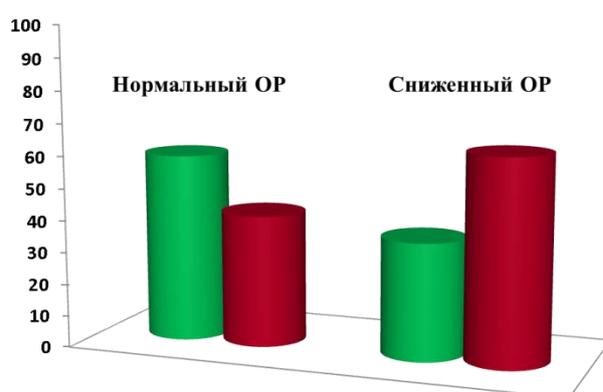


Рис. 4. Частота наступления беременности и состояние ОР, определенное по УЗ – параметрам. ● – наступила беременность, ● – не наступила беременность

На основании полученных данных, УЗ-метод оценки состояния ОР не является надежным в отношении прогноза наступления беременности у пациенток с бесплодием, что подтверждает литературные данные. Подсчет КАФ или измерение объема яичников может быть полезным в определении протокола стимуляции и выбора начальной дозы фолликулостимулирующего гормона, однако не определяет вероятность наступления беременности (Hsu A., 2010).

Проведено сопоставление уровня АМГ в сыворотке крови и частоты наступления беременности у 44 пациенток.

Беременность наступила у 18 (40,9%) из 44 пациенток, из них самопроизвольная беременность – у 11 (25,0%): у 10 с нормальным ОР (22,7%), у 1 – со сниженным ОР (2,3%). У 4 (9,1%) пациенток с нормальным ОР беременность наступила после ЭКО, у 3 (6,8%) – после контролируемой индукции овуляции (КИО) (рис. 5).

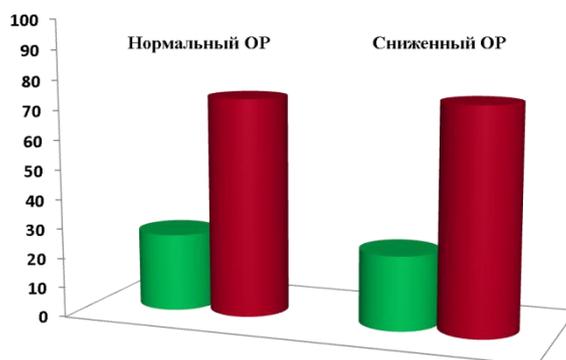


Рис. 5. Частота наступления беременности и состояние ОР, определенное по уровню АМГ в сыворотке крови.

Концентрация АМГ не позволяет статистически значимо предполагать наступление беременности у обследованных пациенток: $p=0,294$.

В процессе работы проведено сопоставление данных гистологических параметров и частоты наступления беременности у 50 пациенток. В группе с нормальным ОР беременность наступила у 72,7% пациенток, в группе со сниженным ОР беременность наступила у 21,4% пациенток. Самопроизвольная беременность – у 12 (24,0%): у 9 (18,0%) с нормальным ОР, у 3 (6,0%) со сниженным ОР. У 7 (14,0%) пациенток беременность наступила после ЭКО: у 5 (10,0%) – с нормальным ОР, у 2 (4%) – со сниженным ОР. У 3 (6%) – после КИО: у 2 (4%) с нормальным ОР, у 1 (2%) со сниженным ОР (рис.6).

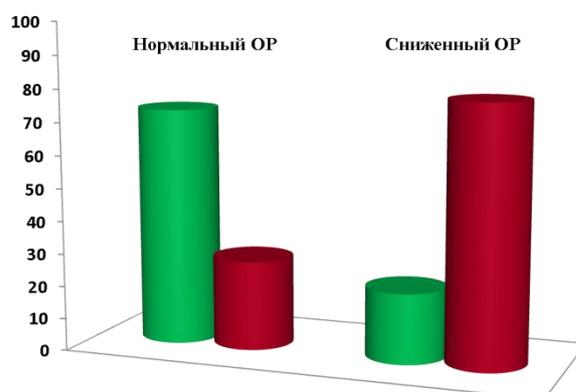


Рис. 6. Частота наступления беременности при нормальном и сниженном ОР, определенном по диаметру первичных однослойных фолликулов.

Частота наступления беременности при нормальном и сниженном ОР, определенном по диаметру первичных однослойных фолликулов значительно различалась ($p=0,005$).

Программа ЭКО у пациенток с наступившей беременностью проводилась по «короткому» протоколу фолликулостимулирующими препаратами с блокадой функции гипофиза антагонистами. Получено от 4 до 15 ооцитов. У 4 пациенток перенос одного эмбриона произведен на пятые сутки после трансвагинальной пункции, у 3 пациенток перенос произведен в криопротоколе в связи с профилактикой риска развития гиперстимуляции.

Полученные параметры нормального и сниженного ОР по данным гистологического исследования сочетаются с возможностью прогнозирования наступления беременности. Проведенный ROC-анализ позволил установить оптимальное пороговое значение диаметра первичных однослойных фолликулов - 62 мкм, при котором чувствительность предсказания наступления беременности составила 70%, специфичность 82%:

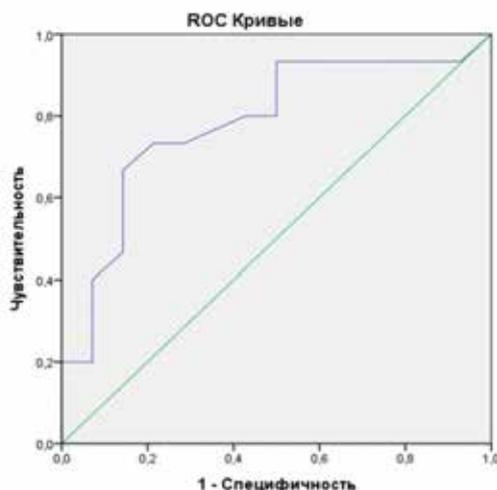


Рис.7. ROC-кривая прогноза наступления беременности по диаметру первичных однослойных фолликулов (точка отсечки 62 мкм).

По данным ROC-анализа область под кривой составляет $0,783 \pm 0,089$. Доверительный интервал (ДИ) площади $0,609-0,958$, что соответствует хорошему качеству логистической модели.

В процессе исследования установлено, что **помимо наличия примордиального пула, первичных однослойных фолликулов среднего диаметра более или менее 62 мкм**, необходимым критерием оценки состояния ОР является **качество ооцитов**.

В работе рассмотрены морфологические характеристики ооцитов при гистологическом исследовании биоптатов.

У пациенток с наступившей беременностью (n=22): у 7 с доброкачественным образованием яичников, у 15 – с трубно-перитонеальным фактором бесплодия на гистологических срезах обнаружен выраженный фолликулярный аппарат с фолликулами разных стадий развития, который на 98-99% представлен правильно сформированными фолликулами, содержащими ооцит, способный к оплодотворению и дальнейшему развитию (рис.1).

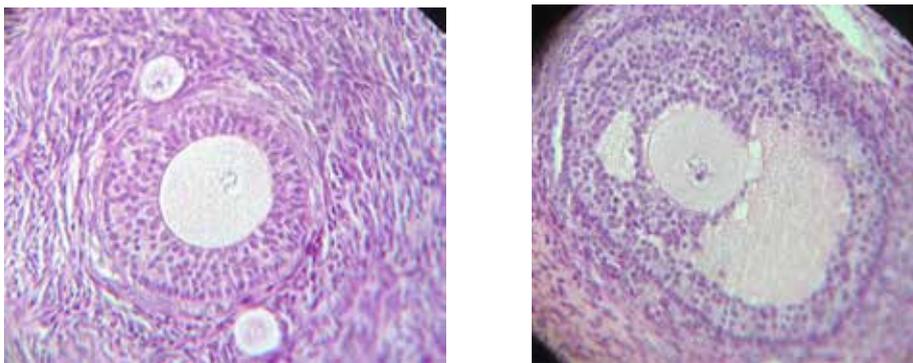


Рис. 1. Многослойный фолликул 150,0*157,5 мкм с ооцитом 87,5*92,5 мкм и два примордиальных фолликула 37,5 мкм с ооцитом 35,0 мкм. Малый антральный фолликул 350*300 мкм с ооцитом 100,0*92,5 мкм, ядро 32,5 мкм, ZP 7,5 мкм.

У пациенток с ненаступившей беременностью в течение года после лапароскопии (n=28): у 8 с доброкачественным образованием яичников, у 20 с трубно-перитонеальным фактором бесплодия ооциты были увеличены в размерах, неправильной формы; обнаружены крупные вакуоли в ооплазме; увеличена толщина прозрачной оболочки (ZP) более 18 мкм (рис.2).

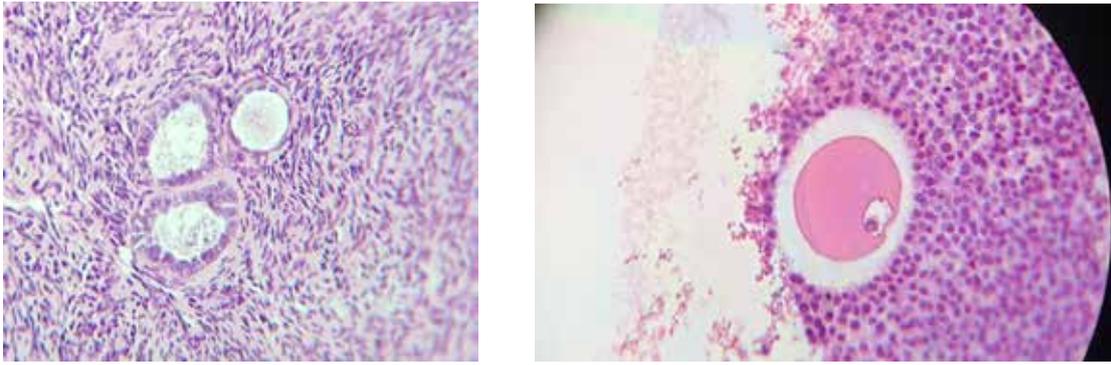


Рис.2 Первичные однослойные фолликулы неправильной формы 63,8 мкм, содержащие ооциты с вакуолями и примордиальный фолликул 37,5 мкм. Ооцит 87,5*75,0 мкм антрального фолликула 2,5*2,0 мм = 562,5*500,0 мкм, утолщенная ZP 20,5 мкм.

У 2 пациенток (2,25%) с трубно-перитонеальным фактором бесплодия были обнаружены примордиальные фолликулы с двумя ооцитами или двуядерные ооциты. Двуооцитарные фолликулы, вероятно, представляют собой неправильно сформированные фолликулы вследствие гормональных нарушений во время внутриутробного развития девочки (рис.3).

В процессе работы на каждом 6-7 гистологическом срезе биоптатов были обнаружены единичные ПФ или группы по 2-5 фолликулов больших размеров 57,5-67,5 мкм, а также первичные однослойные фолликулы большого диаметра (у пациенток со сниженным ОР). Средний диаметр ооцита в первичном фолликуле значительных размеров (до 70 мкм), что не соответствует количеству фолликулярных клеток вокруг него, т.е. наблюдается дисбаланс динамики роста ооцита и увеличения количества фолликулярных клеток (рис.3).

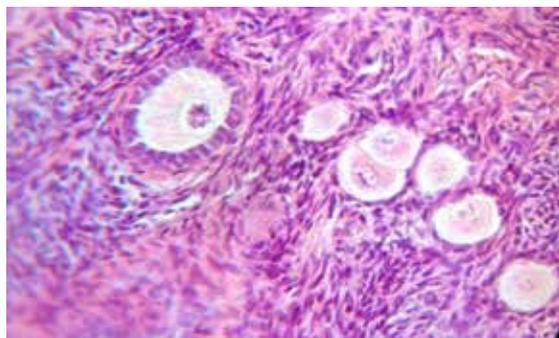


Рис.3 Первичный однослойный фолликул больших размеров 82,5*67,5 мкм, ооцит 62,5*45,0 мкм и примордиальный фолликул с двумя ооцитами.

Среднее количество примордиальных и растущих фолликулов в группах с наступившей/не наступившей беременностью значимо не различались ($p>0,05$) - 74,5/105 и 10,6/11,5 соответственно. Однако у пациенток со сниженным ОР с наступившей/ненаступившей беременностью в 2 раза меньше количество растущих фолликулов.

У женщин с не наступившей беременностью в 9,4 раз чаще были обнаружены патологические ооциты: у 12 из них (42,9%) дегенеративные ооциты, у 9 (32,1%) – ооциты с крупными вакуолями в ооплазме, у 3 (10,7%) – ооциты с утолщенной ZP. У 5 (17,9%) выявлены разные типы патологических ооцитов.

Крайне редко встречались патологические фолликулы у пациенток с наступившей беременностью (2,73%), что может свидетельствовать о постоянном процессе естественного отбора фолликулов и ооцитов (атрезии, дегенерации), не пригодных к дальнейшему развитию.

Результаты исследования позволяют прийти к заключению о том, что количество примордиальных фолликулов, наличие первичных однослойных фолликулов среднего диаметра более или менее 62 мкм, качество ооцитов определяют состояние ОР, **средний диаметр первичных однослойных фолликулов менее 62 мкм** является прогностическим критерием наступления беременности у пациенток с бесплодием. При диаметре первичного однослойного фолликула менее 62 мкм, наличии правильно сформированных фолликулов разных стадий развития, содержащими ооцит нормальных размеров, без вакуолей, с ZP менее 18 мкм, достоверно чаще наступала беременность.

Можно предположить, что увеличенные в размерах ПвФ представляют собой неправильно сформированные фолликулы из-за нарушений процессов роста и развития. Наличие их говорит о сниженном ОР у пациенток с бесплодием и низкой вероятности наступления беременности.

ВЫВОДЫ

1. Общепринятые методы исследования: УЗИ (объем яичника более 8 см³, КАФ более 5 в каждом яичнике), определение концентрации АМГ в сыворотке крови (более 1 нг/мл) являются значимыми в оценке состояния ОР и умеренно коррелируют с состоянием ооцит-фолликулярной системы яичников.
2. Сниженный ОР наблюдается у всех пациенток позднего репродуктивного возраста (старше 35 лет), у оперированных по поводу доброкачественных образований яичников в 85,7%, с наличием эндометриoidных кист/эндометриом больших размеров (5-6 см) в 71,4% наблюдений. После химиотерапии по поводу лимфогранулематоза ОР отсутствует.
3. Состояние примордиального пула, количество и качество растущих фолликулов (до 2 мм в диаметре) и их ооцитов в биоптате яичника позволяют определить состояние ОР у женщин с бесплодием в 100% наблюдений.
4. Прогнозировать наступление беременности возможно только на основании наличия в яичниковой ткани **первичных однослойных фолликулов среднего диаметра менее 62 мкм.**
5. Морфологически измененные ооциты почти в 10 раз чаще встречаются у пациенток с не наступившей беременностью.
6. Пациенткам с выраженным снижением ОР (при отсутствии примордиального пула, растущих фолликулов) для достижения беременности показана программа ЭКО с использованием донорских ооцитов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для комплексной оценки состояния ОР рекомендовано проводить УЗИ органов малого таза (подсчет КАФ, измерение объема яичников); определение концентрации АМГ в сыворотке крови; гистологическое исследование биоптата яичника (подсчет количества фолликулов всех стадий развития и оценка качества ооцитов в них), полученного во время планового оперативного вмешательства на органах малого таза у пациенток с бесплодием.
2. Возможность прогнозировать наступление беременности на основании наличия в яичниковой ткани первичных однослойных фолликулов среднего диаметра менее 62 мкм.
3. Для достижения беременности у пациенток с выраженным снижением ОР (отсутствии примордиального пула, растущих фолликулов) методом выбора должна являться программа ЭКО с использованием донорских ооцитов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ РАБОТ

1. Денисенко М.В. Овариальный резерв и методы его оценки / М.В. Денисенко, М.А. Курцер, Л.Ф. Курило // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2016.- Т. 15. - №3. – С. 41–47.
2. Денисенко М.В. Динамика формирования фолликулярного резерва яичников / М.В. Денисенко, М.А. Курцер, Л.Ф. Курило // Андрология и генитальная хирургия. – 2016. – Т.17. - №17. – С.55-63.
3. Денисенко М.В. Значение исследования биоптата яичника в оценке овариального резерва у пациенток с бесплодием / М.В. Денисенко, М.А. Курцер, Л.Ф. Курило, А.К. Рабаданова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2017. – Т.17. - №5. – С. 52-56.
4. Денисенко М.В. Профилактика потери беременности после ЭКО у пациенток со сниженным овариальным резервом / А.К. Рабаданова, Р.И. Шалина, Н.А. Гугушвили, Е.Н. Гаврилина, М.В. Денисенко // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2017. – Т. 16.- №6. – С. 36–43.
5. Денисенко М.В. Яйцеклетки навсегда? Зародышевая линия половых клеток. Версии и контр-версии / М.В. Денисенко, Е.В. Абакушина, Г.М. Савельева, М.А. Курцер, С.А. Румянцев, О.А. Азиев, А.И. Андреев, Э.В. Костюк // Исследования и практика в медицине. Научно-практический журнал. – Спецвыпуск. – 2015. – С.52