

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

Граділь Оксана Григорівна

УДК 618.177–089.888.11–085.357(043.3)

ОВАРІАЛЬНИЙ РЕЗЕРВ ТА ЙОГО ГОРМОНАЛЬНА КОРЕКЦІЯ ПРИ
ВИКОРИСТАННІ ПРОГРАМ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ
ТЕХНОЛОГІЙ

14.01.01 – акушерство та гінекологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Науковий керівник
Щербина Микола Олександрович
доктор медичних наук, професор

Харків – 2015

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	3
ВСТУП	5
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1. Сучасний стан проблеми безпліддя та розвитку допоміжних репродуктивних технологій	12
1.2. Патогенетичні чинники порушень оваріального резерву, маркери оваріального резерву та роль оксидативного стресу у реалізації оваріальної відповіді в програмах допоміжних репродуктивних технологій.	15
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	34
2.1. Загальна характеристика обстежених жінок	34
2.2. Методи дослідження.	52
Розділ 3. ОЦІНКА СТАНУ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ ПАЦІЄНТОК З НИЗЬКИМ ОВАРІАЛЬНИМ РЕЗЕРВОМ.	60
Розділ 4. ОЦІНКА МАРКЕРІВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ НА ФОНІ ЕПІФІЗАРНОЇ ДИСФУНКЦІЇ У ЖІНОК З БЕЗПЛІДДЯМ	69
4.1. Діагностичні властивості мелатоніну та 8-ізопростану в сироватці крові у жінок репродуктивного віку	69
4.2. Динаміка показників оксидативного стресу в сироватці крові та фолікулярній рідині під час контрольованої оваріальної стимуляції в програмах допоміжних репродуктивних технологій	77
Розділ 5. ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ МОДИФІКОВАНИХ СХЕМ КОНТРОЛЬОВАНОЇ ОВАРІАЛЬНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ У ЖІНОК З НИЗЬКИМ ОВАРІАЛЬНИМ РЕЗЕРВОМ	81
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	97
ВИСНОВКИ	111
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	113
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	114

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АМГТ	—	ад'ювантна мелатонін–гормонотерапія
а-ГнРГ	—	агоніст гонадотропін–рилізинг–гормону
АМГ	—	антимюлерів гормон
ант-ГнРГ	—	антагоніст гонадотропін–рилізинг–гормону
АОС	—	антиоксидантна система
АФК	—	активні форми кисню
ГТ	—	гонадотропні гормони (гонадотропіни)
ДРТ	—	допоміжні репродуктивні технології
ЕКЗ	—	екстракорпоральне запліднення
ЕКЗ-ПЕ	—	екстракорпоральне запліднення з переносом ембріону
ІКСІ	—	intracytoplasmic sperm injection, або внутрішньо цитоплазматичне введення сперматозоїду
ІФА	—	імуноферментний аналіз
КГ	—	контрольна група
КОС	—	контрольована оваріальна стимуляція
ЛГ	—	лютеїнізуючий гормон
лМГ	—	людський менопаузальний гонадотропін
МЛТ	—	мелатонін
МО	—	міжнародна одиниця активності (стосується дози гонадотропінів та інших гормонів)
НВЯ	—	низька відповідь яєчників
НОР	—	низький оваріальний резерв
ОГ	—	основна група
ОР	—	оваріальний резерв
ОРТ	—	тести оваріального резерву
ОС	—	оксидативний стрес
ПЛР	—	полімеразна ланцюгова реакція

ПЕ	—	перенесення ембріона
СПВЯ	—	синдром передчасного виснаження яєчників
СПКЯ	—	синдром полікістозних яєчників
СОД	—	супероксиддисмутаза
ФСГ	—	фолікулостимулюючий гормон
ХГ	—	хоріонічний гонадотропін
8-ІЗП	—	8 - ізопростагландин F2 α , 8 – ізопростан
ELISA	—	enzyme–linked immuno sorbent assay, твердофазний імуноферментний аналіз
in vitro	—	в пробірці

ВСТУП

Згідно з показниками Держстатистики, частота безпліддя в Україні складає 17–19,5% від загальної популяції сімейних пар. Серед країн світу Україна займає 211-е місце з 222 за показником фертильності [42]. Причиною безплідного шлюбу в 40–50% є патологія репродуктивної системи в одного з подружжя, в 25–30% – у обох, 15–20% випадків припадає на безпліддя нез'ясованого генезу. В 50–82% випадків у жінок має місце поєднане безпліддя. При поєднаному безплідді на першому місці серед жіночих факторів стоїть трубно-перитонеальний – 43%, на другому – ендокринне безпліддя – до 30%, на третьому – ендометріоз – 25% [47]. Ефективність консервативного лікування трубно-перитонеального безпліддя досягає 21–47%, у зв'язку з низькою ефективністю у більшості пацієнток показано застосування програм допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [88].

Середня ефективність використання ДРТ у жінок з нормальними показниками оваріального резерву становить 30%, при низькому оваріальному резерві та недостатній оваріальній відповіді частота успішних спроб ЕКЗ удвічі нижча і не перевищує 12% [64, 87, 130]. Частота невдалих спроб ДРТ, де причиною є низький оваріальний резерв та недостатня оваріальна відповідь, становить від 11 до 24%, а при повторних спробах втрати складають більше 45% [110, 115, 141]. У разі досягнення етапу ембріотрансфера частота вагітності коливається від 3 до 6%, лише іноді досягає 12% [130, 141].

Незважаючи на значне використання програм ДРТ у лікуванні безпліддя, підвищення їх якості та ефективності залишається основним питанням сучасності [25, 87, 89]. Серед найважливіших факторів, що не дозволяють програмам ДРТ максимально імітувати природне запліднення, насамперед виділяють рівні активних форм кисню, які підтримуються в межах фізіологічних концентрацій антиоксидантами за природних умов [106]. При порушенні природного балансу між антиоксидантами та

окисниками на користь останніх виникає оксидативний стрес, що здійснює руйнуючу дію на внутрішнє середовище та мембрани клітин. Розвиток оксидативного стресу під час дозрівання яйцеклітин є однією з головних причин дефекту гамет чи порушення розвитку ембріонів [108].

Розробка нових напрямків покращення оваріальної відповіді у хворих на безпліддя жінок з низьким оваріальним резервом є актуальною проблемою ДРТ, яка потребує вирішення. Оцінка гормонального стану, оваріального резерву та отримання достатньої кількості якісних яйцеклітин є запорукою успішного лікування безпліддя [64, 106, 130, 141]. Доведений вплив на стан гіпофізарно-гонадної системи має гормон шишкоподібної залози – мелатонін. Це нейрогормон, що регулює імунні, нейроендокринні та інші функції організму [2, 6, 32]. Доведеною є здатність мелатоніну регулювати функцію яєчників за рахунок контролю синтезу гонадотропіну в гіпоталамо-гіпофізарній залозі через свої специфічні рецептори [191, 192].

Активно вивчається властивість мелатоніну впливати на вільні радикали, що значно розширило розуміння механізмів його впливу на користь репродуктивної фізіології. Набагато вищі концентрації мелатоніну було знайдено в людській преовуляторній фолікулярній рідині, порівняно з сироваткою, з'являється все більше свідчень щодо його прямого впливу на функцію яєчників, особливості дозрівання яйцеклітини і розвиток ембріона [192, 194, 197].

Одним із напрямків покращення результатів оваріальної стимуляції у жінок з низьким оваріальним резервом є зміна добової дози гонадотропінів та застосування протоколів з антагоністами гонадотропних релізинг-гормонів, але не висвітлено вірогідних доказів щодо ефективності такої лікувальної тактики [130, 155].

Багато вчених зосередили свою увагу на безпосередньому впливі мелатоніну на дозрівання ооцитів і розвиток ембріонів як антиоксиданта, що зменшує оксидативний стрес, викликаний активними формами кисню, які утворюються під час процесу овуляції. Сприятливий вплив мелатоніну на

дозрівання яйцеклітини і розвиток ембріона був підтверджений у пробірці й в природних експериментах на тваринах [176, 194]. Одержані перші відомості про застосування мелатоніну для лікування безплідних жінок, які підтверджують, що мелатонін знижує внутрішньофолікулярне оксидативне пошкодження і підвищує відсоток запліднення [194].

Властивість мелатоніну брати участь у регуляції оксидативного стресу в фолікулі під час дозрівання яйцеклітини потребує подальшого вивчення. Незважаючи на численні дослідження у цьому напрямку, пошук нових шляхів підвищення ефективності ДРТ та якості оваріальної відповіді за рахунок розробки нових методів корекції стану оваріального резерву є одним з актуальних питань сучасної гінекології, що обумовило основні напрямки дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт кафедри акушерства та гінекології №1, ХНМУ «Сучасні аспекти репродуктивного здоров'я жінки у різні вікові періоди життя», державна реєстрація № 0111U0013.

Мета дослідження: підвищення ефективності лікування безпліддя програмами допоміжних репродуктивних технологій шляхом покращення оваріальної відповіді у жінок з низьким оваріальним резервом за рахунок гормональної корекції оксидативних порушень під час контрольованої стимуляції яєчників.

Задачі

1. Дослідити показники оваріального резерву у жінок з безпліддям та визначити патогенетичні фактори зниження оваріального резерву.
2. Вивчити вплив контрольованої оваріальної стимуляції гонадотропінами на рівень оксидативного стресу в організмі жінок з низьким оваріальним резервом.
3. Визначити роль оксидативного стресу в формуванні низької оваріальної відповіді в програмах ДРТ.

4. Оцінити інформативність маркерів оксидативної активності 8-ізопростану та мелатоніну в сироватці крові та фолікулярній рідині.
5. З'ясувати вплив мелатоніну на якість та кількість ооцитів, отриманих шляхом контрольованої стимуляції яєчників.
6. Розробити схему модифікованого протоколу контрольованої оваріальної стимуляції з урахуванням активності оксидативного стресу у жінок з низьким оваріальним резервом.

Об'єкт дослідження: безпліддя у жінок, що потребує застосування ДРТ.

Предмет дослідження: стан оваріального резерву у жінок з безпліддям, маркери оксидативного стресу, оваріальна відповідь, ефективність ДРТ.

Методи дослідження: у роботі використано клінічні, біохімічні, гормональні, ультразвукові, імунологічні та статистичні методи дослідження.

Наукова новизна. В дисертаційній роботі доповнені наукові дані про етіо-патогенетичні аспекти формування оваріальної відповіді у жінок з низьким оваріальним резервом на фоні епіфізарної дисфункції. Проведена комплексна оцінка показників стану оваріального резерву та епіфізарної регуляції з урахуванням маркерів оксидативного стресу. Визначена діагностична цінність мелатоніну та 8-ізопростану як маркерів оксидативного стресу під час контрольованої оваріальної стимуляції в сироватці крові та фолікулярній рідині у жінок з низьким оваріальним резервом в програмах ДРТ.

Визначена діагностична значимість маркерів оксидативного стресу в прогнозуванні ефективності методик ДРТ. Визначені нормативні рівні 8-ізопростану в сироватці крові та фолікулярній рідині у здорових жінок репродуктивного віку та пацієнток з безпліддям. Встановлено нормативні значення мелатоніну в сироватці крові та фолікулярній рідині у здорових жінок репродуктивного віку та у пацієнток з безпліддям згідно вікових діапазонів. Розширено наукові поняття щодо ролі пінеальної залози в патогенезі безпліддя.

Уточнено наукові дані про вплив контрольованої оваріальної стимуляції гонадотропінами на дозрівання яйцеклітин шляхом вивчення показників оксидативного стресу в фолікулярній рідині. Розроблена та впроваджена модифікована схема контрольованої оваріальної стимуляції з ад'ювантною мелатонін-гормонотерапією для покращення оваріальної відповіді у жінок з низьким оваріальним резервом та епіфізарною дисфункцією. Визначена ефективність застосування мелатоніну у якості антиоксидантного захисту під час застосування програм ДРТ.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі результатів дослідження рекомендовано визначення стану оваріального резерву у жінок з безпліддям в програмах ДРТ за допомогою комплексного вивчення маркерів оксидативного стресу та рівнів мелатоніну в сироватці крові та фолікулярній рідині.

Запропоновано критерії ефективності лікування жінок з низькою оваріальною відповіддю, розроблено та впроваджено в практику модифіковану схему контрольованої оваріальної стимуляції, яка направлена на зменшення шкідливої дії оксидативного стресу під час дозрівання ооцитів в фолікулярній рідині, що дозволило отримати більш якісні й життєздатні яйцеклітини та підвищити рівень клінічних вагітностей після застосування програм ДРТ.

За результатами досліджень отримано деклараційні патенти України на корисну модель (№93782 «Спосіб контрольованої стимуляції яєчників при екстракорпоральному заплідненні» від 10.10.2014 р.; № 23517 «Спосіб прогнозування синдрому слабкої відповіді» від 25.05.2012 р.)

Матеріали дисертаційних досліджень впроваджено до практичної роботи комунальних закладів охорони здоров'я: Харківського обласного клінічного перинатального центру, Харківського міського пологового будинку №3; пологово-гінекологічного відділення Комсомольської міської лікарні Харківської області, Клініки репродуктивної медицини ім. академіка В.І. Грищенко, теоретичні положення та практичні рекомендації

використовуються в педагогічному процесі кафедр акушерства та гінекології Харківського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проаналізовано джерела літератури з досліджуваної теми. Виконаний інформаційно-патентний пошук дозволив визначити тему роботи, обґрунтувати мету, завдання і методологію наукового дослідження.

Проведено клінічні спостереження і лабораторні обстеження у 96 тематичних жінок, які перебували на обстеженні та лікуванні в умовах Харківського обласного клінічного перинатального центру, Клініки репродуктивної медицини ім. академіка В.І. Грищенко, розроблено нову схему КОС з метою лікування безпліддя у жінок з низьким оваріальним резервом при застосуванні ДРТ та проведена оцінка ефективності лікувальних заходів. Особисто автором проаналізовано одержані результати і проведено їх статистичну обробку. Здобувачем обґрунтовано основні положення, сформульовано висновки і практичні рекомендації, підготовлено матеріали до публікації.

Робота виконана на кафедрі акушерства та гінекології № 1 (завідувач кафедри – д. мед. н., професор М.О. Щербина) Харківського національного медичного університету (ректор – член. кор. Академії наук України, д.мед.н., професор В.М. Лісовий). Вміст маркерів оксидативного стресу 8-ізопростану та мелатоніну визначався на кафедрі біохімії (завідувач кафедри – професор В.І. Жуков), у біохімічному відділі ЦНІЛ ХНМУ (завідувач відділу – к.біол.н. Т.В. Горбач). Вміст гормональних показників визначався в лабораторії «Фармація та медицина», свідоцтво про атестацію № 100-264/2014.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є частиною комплексної Державної програми «Сучасні аспекти репродуктивного здоров'я жінки у різні вікові періоди» (№ Державної реєстрації 0111U001391) і виконана згідно з планом наукових досліджень

кафедри акушерства і гінекології № 1 Харківського національного медичного університету.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертації доповідались і обговорювались на засіданнях Харківського обласного відділення товариства асоціації акушерів-гінекологів України (2012 – 2015 рр.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання акушерства та гінекології» (2013 р., м. Харків), міжвузівській конференції молодих вчених «Медицина третього тисячоліття» (2013 р., м. Харків), міжнародному медичному конгресі XIII international Medical Congress “Euromedica-Hannover” (2013 р., м. Ганновер), міжнародній конференції молодих вчених «Сучасні питання акушерства, гінекології та перинатології» (2013 р., м. Москва), міжвузівській конференції молодих вчених «Медицина третього тисячоліття» (2014 р., м. Харків), міжнародній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» (2014 р., м. Харків), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Внесок молодих спеціалістів в розвиток медичної науки і практики» (2014 р., Харків), міжнародній науково-практичній конференції «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика» (2015 р., Одеса), міжнародних міждисциплінарних наукових конференціях студентів та молодих вчених «ISIC» (2014 р., 2015р., м. Харків), міжнародному медичному конгресі молодих вчених «BIMCO» (2015 р., Чернівці). Апробація роботи проведена на засіданні експертної ради з акушерства і гінекології Харківського національного медичного університету.

Публікації за темою дисертації. Основні положення роботи висвітлено в 15 наукових публікаціях, із них 6 статей у виданнях, що включені до Переліку наукових фахових видань України; 8 тез у матеріалах наукових з'їздів та конференцій. Отримано 2 патенти України на корисну модель.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасний стан проблеми безпліддя та розвитку ДРТ в Україні.

Безпліддя в шлюбі – одна з найбільш актуальних проблем сучасного суспільства та сучасної медицини, незважаючи на успіхи, досягнуті широким застосуванням методів допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [8,9,25,49,53,65,87]. Частота безплідних шлюбів на території України коливається від 15 до 25% всіх подружніх пар, що перевищує критичний рівень 15%, вказаний групою експертів ВООЗ, коли безпліддя виступає як фактор, що значно впливає на демографічні показники в країні та становить державну проблему [75,79,88,89].

Динаміка показників демографії України характеризується зниженням темпів приросту й негативним приростом населення згідно з даними щорічного демографічного вісника Державної служби статистики "Населення України" [76,88]. Так, наприклад, у 2013 р. кількість живонароджених складала 503657 осіб, кількість померлих – 662368 осіб, а показник (– 3,5), розрахований на 1000 осіб наявного населення, ілюструє природне скорочення населення України. Також спостерігалась зміна чисельності населення України за 1989 – 2014 роки, з 51,7 млн у 1989 р. до 45,4 млн у 2014 р., в період з 2001 по 2013 рік кількість населення зменшилась на 6% [76,89].

Погіршення демографічної ситуації обумовлено різноманітними факторами, одним із яких є збільшення кількості безплідних пар серед населення [73,87,89]. Безплідним вважається шлюб, у якому подружжя веде статеве життя більше одного року без використання методів контрацепції та не має вагітностей [1,8,34,68].

За даними державних статистичних звітів в Україні за останні роки було зареєстровано 44707 випадків жіночого (78,9%) та 11941 випадків чоловічого безпліддя (21,1%). Відомо, що в країнах Євросоюзу частота жіночого безпліддя складає 30%, чоловічого – 30%, поєднання – 30% та

нез'ясованого походження – 10%. За 2001 – 2005 роки частота жіночого та чоловічого безпліддя реєструється майже на одному рівні, як у жінок, так і у чоловіків. З 2006 р. спостерігається зростання частоти реєстрації випадків чоловічого безпліддя майже у 2 рази. Але поширеність жіночого безпліддя продовжує залишатися вище чоловічого, захворюваність, тобто вперше виявлені в житті випадки безпліддя, у жінок в 3,4 рази вище, ніж у чоловіків [76,88].

Комплексне застосування сучасних діагностичних методів (ендоскопічних, ультразвукових, гормональних, імунологічних, генетичних) на етапі обстеження подружньої пари дозволяє встановити основні причини інфертильності [8,10,11,88]. На думку фахівців [8,37,38,42,47,89], провідним фактором жіночого безпліддя залишається трубно-перитонеальний, обумовлений непрохідністю чи відсутністю маткових труб, або вираженим спайковим процесом в малому тазу (60–70%). Друге місце посідає ендокринна форма безпліддя, яка пов'язана з ановуляцією (20–25%). У 5–20% випадків причину інфертильності визначити не вдається – це так зване «ідіопатичне безпліддя». Дана ситуація пов'язана з неможливістю виявити всі порушення репродуктивної системи сучасними методами діагностики [27,37,38].

Проблема діагностики та лікування безпліддя залишається актуальною, незважаючи на суттєві успіхи репродуктивної медицини [33,49,57,71], надання медичної допомоги здійснюється відповідно до Наказу Міністерства охорони здоров'я України №787 від 09.09.2013 р. про затвердження порядку застосування ДРТ в Україні [67,68]. Кількість розпочатих циклів ДРТ в Україні у 2012 році складала 12511 (порівняно з 1229 у 1999 році) [76,88]. Протягом останніх років спостерігається зростання кількості клінічних вагітностей в циклах допоміжних репродуктивних технологій, так у 1999 році їх спостерігалось 269, а у 2012 – 4652 [88]. У 2012 р. в Україні при розпочатих лікувальних циклах ДРТ закінчення клінічних вагітностей пологами одним живим плодом спостерігалось у 2666

випадках (21,31 %), пологи двома і більше живими плодами спостерігалась у 793 випадках (6,34%) [88]. Частота настання вагітності на 100 розпочатих циклів ДРТ в Україні в 2012 р. склала 37,2% (в 2011 – 37,8%), що відповідає європейським показникам [88]. По частоті настання вагітності технології ДРТ розподілились наступним чином: IVF-цикли – 40,58%, цикли з донацією ооцитів – 38,65%, ICSI – 36,05%, перенесення кріоконсервованих ембріонів – 34,90% [49,88]. Всього народилось живими після використання лікувальних циклів за методами допоміжних репродуктивних технологій в Україні з 1999 року – 29249 дітей. Основні питання розвитку ДРТ в Україні пов'язані, в першу чергу, із збільшенням кількості циклів запліднення та підвищенням ефективності програм ДРТ. Збільшення їх кількості в 2012 році до 12511 дозволило довести цей показник лише до 250 циклів на 1 млн населення, що дуже далеко від середньоєвропейських показників [49,89].

Таким чином, незважаючи на значне поширення ДРТ у клінічній практиці, безпліддя і відновлення репродуктивної функції залишаються актуальною проблемою сучасності. Демографічна ситуація в Україні вимагає удосконалення нових методів лікування безпліддя, проте тенденція до збільшення серед жінок з безпліддям старшої вікової групи, у яких розпочато фізіологічно обумовлене згастання фертильної функції та зменшення оваріального резерву, ускладнює реалізацію програм ДРТ.

1.2. Патогенетичні чинники порушень оваріального резерву, маркери оваріального резервута роль оксидативного стресу у реалізації оваріальної відповіді в програмах ДРТ

Багато авторів формулюють поняття «оваріальний резерв» як функціональний резерв яєчника, який визначає здатність останнього до розвитку здорового фолікула з повноцінною яйцеклітиною і адекватну відповідь на оваріальну стимуляцію [14,19,21,64,158,245]. Оваріальний резерв відображає кількість фолікулів, що знаходяться в яєчниках (примордіальний пул і зростаючі фолікули) і залежить від фізіологічних і патофізіологічних факторів. Поняття оваріального резерву варто відрізнити від фолікулярного запасу, який включає в себе число фолікулів і не відображає їх функціонального стану [15,64].

До фізіологічних чинників, що визначають оваріальний резерв, відноситься в першу чергу кількість примордіальних фолікулів (примордіальний пул), що знаходяться в яєчниках дівчинки до моменту становлення менструальної функції. У нормі вона становить 270000 – 470000 фолікулів [15,93]. Після початку свого росту, фолікули або зазнають атрезії, або доходять до овуляції (в нормі один фолікул в менструальний цикл). За життя у жінки до овуляції доходять 400 – 500 фолікулів. Процес фолікулогенезу відображається в трьох періодах [15,64,159]. В гормон-незалежний період фолікули ростуть від стадії примордіального до стадії вторинного. Ця стадія зростання проходить в аваскулярній зоні і в умовах відсутності гіпофізарних гонадотропінів. Цей період вкрай тривалий і може становити кілька місяців. До теперішнього часу не було знайдено маркерів, які б могли дати уявлення про показники гормон-незалежної стадії фолікулогенезу.

В період фолікулогенезу відбувається зростання фолікулів від стадії вторинного до стадії великого антрального (1–2 мм у діаметрі). Це стадія зростання фолікулів може відбуватися тільки у присутності базальних рівнів гіпофізарних гонадотропінів, в першу чергу ФСГ. Цей період триває близько

100–120 днів (3–4 менструальні цикли) і має назву гормон-чутливої фази. На сьогодні виявлено фактор, за яким можна складати уяву про гормон-чутливу фазу фолікулогенезу – це антимюллерів гормон (АМГ). Цей гормон виділяється клітинами гранульози фолікулів протягом усього гормон-чутливого періоду, рівень АМГ в крові визначає число фолікулів на даній стадії росту фолікула [16, 99, 102–105].

Третій або гормон-залежний період зростання фолікулогенезу починається в кінці лютеїнової фази циклу, коли формується група фолікулів, що знаходиться на стадії великих антральних (близько 1–2 мм у діаметрі). Після регресії жовтого тіла і падіння рівнів статевих стероїдів (естрадіолу і прогестерону), а також нестероїдного гормону інгібіну А, спостерігається, за принципом зворотного зв'язку, збільшення продукції ФСГ гіпофізом. Під впливом цього гормону антральні фолікули починають зростати, причому спостерігається тонка взаємодія між продукцією клітинами гранульози предомінантних фолікулів інгібіну В і виділенням гіпофізом ФСГ. Чим більше число антральних фолікулів продукує інгібін В, тим нижче рівень ФСГ і навпаки. Особливо великого клінічного значення набуває вимір так званих базальних рівнів ФСГ і інгібіну В, які визначаються на 2–3-й дні менструального циклу, що відображає зростання фолікулів, з яких буде обраний домінантний. Переважна більшість показників оваріального резерву характеризують гормон-залежну стадію зростання фолікулів. До них відносяться визначення базальних рівнів ФСГ, естрадіолу, ЛГ, а також ультразвукове визначення числа антральних фолікулів і обсягу яєчників [18, 98, 225, 140, 190].

Окрім фізіологічних факторів, на оваріальний резерв впливають різні патологічні стани, до яких відносяться перенесені та існуючі захворювання, інтоксикації і різні ятрогенні стани (оперативні втручання, хіміотерапія і радіаційне опромінення органів малого таза) [14, 21, 26, 60, 80], передчасне виснаження яєчників. До крайнього випадку впливу на тканину яєчника і виснаження оваріального резерву варто віднести синдром передчасного

виснаження яєчників (СПВЯ) [4, 56, 124]. Цей стан характеризується аменореєю, низьким рівнем у крові естрогенів і підвищеними рівнями гіпофізарних гонадотропінів, у першу чергу ФСГ. Діагноз цього захворювання встановлюється на підставі наявності аменореї більше 4 місяців у жінки молодшої 40 років і двох аналізів рівнів ФСГ більше 40 мМЕ/мл [204, 225, 248]. Для виявлення цих пацієнток, визначення показників оваріального резерву може відігравати провідну роль.

Окрім станів типу СПВЯ, при яких різко знижується репродуктивний потенціал яєчників, існує велика кількість гінекологічних захворювань, при яких цей потенціал також значно зменшується [10, 14, 37, 48]. Запальні захворювання органів малого таза, що супроводжуються вираженим склерозом тканин з порушенням трофіки яєчникового фолікулярного апарату, здатні значно знижувати оваріальний резерв [14, 53]. Іншими факторами, що знижують оваріальний резерв, є інтоксикації, викликані різними хімічними речовинами, які використовуються в промисловості і сільському господарстві в якості пестицидів, гербіцидів, розчинників, а також вплив різних відходів промисловості – важких металів і продуктів хімічного синтезу [14, 52]. Вони можуть значно впливати на роботу репродуктивної системи, діючи як аналоги естрогенів, зв'язуючись з їх рецепторами. Вплив інших речовин, таких як солі важких металів, пестициди і гербіциди, також асоційований з підвищеним числом викиднів, безпліддям і порушенням менструального циклу [44, 60]. Безсумнівну роль у зменшенні оваріального резерву відіграє паління жінок. Більше того, час настання менопаузи настає у курців у середньому на два роки раніше [14, 54]. Широко відомо про значний негативний вплив на репродуктивну функцію радіаційного та хіміотерапевтичного лікування різних пухлинних захворювань [44, 72].

У жінок, що проходять лікування з приводу безпліддя, в анамнезі часто мають місце перенесені оперативні втручання. Широко розповсюджені резекції з приводу різноманітних кіст яєчників і при лікуванні синдрому

полікістозних яєчників. Останні проводяться вкрай широко, без жодного врахування подальшого репродуктивного потенціалу жінки і часто призводять до вираженого зниження оваріального резерву [14, 48, 60, 64]. В останні роки приділяється багато уваги показанням щодо резекції яєчників і збереження оваріальної функції [47]. Ряд дослідників проаналізували оваріальну відповідь і кількість ооцитів в яєчниках жінок, що проходять лікування в програмі ЕКЗ-ЕТ після видалення кісти яєчника. Автори роблять висновок, що ця процедура значно зменшує оваріальну відповідь [14, 115, 125, 156, 141, 188]. Деякі вчені порівняли оваріальний резерв 162 жінок з одним яєчником і 1066 жінок з двома яєчниками, які проходили лікування в програмі ЕКЗ-ЕТ. Автори виявили, що у жінок з одним яєчником був значно збільшений базальний рівень ФСГ і, відповідно, більш низька відповідь на оваріальну стимуляцію і кількість отриманих ооцитів [218, 225, 245]. На окрему увагу заслуговує таке захворювання, як ендометріоз, що є однією з провідних причин жіночого безпліддя. Як показали дослідження, перша і друга стадії ендометріозу, за класифікацією Американського Товариства репродуктивної медицини, не впливають на показники оваріального резерву, тоді як третя і четверта стадії можуть бути асоційовані зі значним його зменшенням [90, 154]. Ефективність застосування ДРТ у пацієнток з ендометріозом значно знижується у пацієнток з вираженими стадіями цього захворювання, які перенесли резекцію яєчників з приводу їх ураження ендометріозом [46, 141].

Синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) може бути причиною оперативних втручань на яєчниках, що може призводити до зменшення оваріального резерву [47]. Однак, не менш суперечливим є співвідношення між СПКЯ і показниками оваріального резерву і без оперативних втручань. Вивчення нових маркерів оваріального резерву показало, що у пацієнток з СПКЯ рівень АМГ більш високий, ніж у здорових жінок [102, 233]. Однак також було показано, що якщо розрахувати рівень АМГ щодо наявності фолікулів діаметром від 3 до 10 мм, то рівень АМГ в розрахунку на один

фолікул буде менше, ніж у нормі, що свідчить про зміни в продукції гранульозою пацієток з СПКЯ гормонів, що регулюють ріст фолікулів [101].

Вважають, що найважливішим фізіологічним фактором, що визначає оваріальний резерв, є вік пацієтки [60, 64, 158, 182]. Проте існують значні індивідуальні особливості в часі настання менархе (10–16 років), часі настання менопаузи (45–55 років), які можуть визначати індивідуальний біологічний вік жінки. Також слід зазначити, що наявність менструальної і навіть овуляторної функції, не відображає репродуктивного потенціалу жінки. Цікаво відзначити, що дослідження ролі яєчників і матки у розвитку вікової гіпофертильності підтвердили, що провідну роль у розвитку останньої відіграє яєчниковий фактор, і в першу чергу зменшення оваріального резерву [14, 64, 255]. Наведені вище дані свідчать про недостатню інформативність хронологічного віку жінки як показника репродуктивного потенціалу яєчників. Це диктує необхідність розробки тестів, що визначають індивідуальний біологічний вік жінки (оваріальний резерв), застосування яких оптимізує проведення схем контрольованої оваріальної стимуляції в циклах ЕКЗ.

Відомо, що з віком зазвичай зменшується тривалість менструального циклу. У роботі деяких дослідників показано, що, порівняно з жінками 18–30 років, у жінок 45–56 років менструальний цикл скорочується з $28 + 3$ до $24 + 3$ дні відповідно [64, 200]. Найбільше страждає фолікулярна фаза циклу, тривалість якої зменшується з $17 + 3$ до $8 + 3$ дні відповідно. В обох групах жінок не було знайдено статистично достовірних відмінностей у тривалості лютеїнової фази циклу і в рівнях прогестерону.

Про підвищення рівня гіпофізарних гонадотропінів в пременопаузі і їх клінічне значення відомо з початку 60-х років. Застосування радіоімунологічних і імуноферментних методик визначення рівнів гормонів в сироватці крові, дозволило з'ясувати, що це підвищення відбувається в першу чергу за рахунок ФСГ [64, 84, 225]. Загальновизнано, що ФСГ є пізнім маркером репродуктивного старіння [64, 170]. Рівень ФСГ на початку циклу

у жінок до 40 років починає значно підвищуватися, за визнанням багатьох авторів, є велике перекриття між концентраціями ФСГ у літніх і більш молодих жінок [64, 204, 225]. Отже, помірне підвищення ФСГ у відносно молодому віці не обов'язково свідчить про раннє старіння яєчників [4, 64, 254]. У випадках швидкої втрати яєчникової тканини, наприклад, під час оперативних втручань, у відносно молодому віці відносно високі концентрації ФСГ більшою мірою відображають кількість, ніж якість ооцитів [14, 21, 47, 80]. Хоча, зрештою, внаслідок швидкого виснаження в першу чергу якісних ооцитів, в яєчниках залишаються ооцити поганої якості [14, 64]. Відомо, що рівень ЛГ також підвищується з віком, але пізніше, ніж рівень ФСГ [64, 59, 170], у той час як концентрації естрадіолу і прогестерону з віком не змінюються [64, 170].

Іншим фізіологічним параметром, який змінюється з віком, є число антральних фолікулів (ЧАФ) (2–5 мм у діаметрі), що визначаються при ультразвуковому дослідженні яєчників вагінальним датчиком на початку фолікулярної фази циклу [98, 109, 118, 140, 236]. Дослідниками показано, що ЧАФ у ранню фолікулярну фазу циклу у жінок у віці 22 - 25 років становить 35,5, тоді як у віці 39–42 роки – 19,0 [98, 118, 140]. Дещо відмінні дані отримали Scheffer та ін. [109], які виявили в ранню фолікулярну фазу циклу у жінок 20–30 років 17,0 фолікулів діаметром 2–5 мм, а у віці 38–46 років – 4,0 фолікула. Різницю в числі фолікулів у цих авторів можна пояснити відмінностями в чутливості ультразвукового обладнання, а також можливою неоднорідністю груп обстежуваних жінок. Однак ці дослідження показують, що число фолікулів, виміряних в ранню фолікулярну фазу, може служити якісним методом у визначенні індивідуального оваріального резерву [98, 109, 112].

Таким чином, хоча показано, що ЧАФ є перспективним скринінговим методом для прогнозування, в першу чергу, характеру відповіді яєчників на стимуляцію, є ряд питань, які потребують з'ясування. Це – варіабельність між циклами і дослідженнями. Ключовим питанням є те, чи відображає досить

надійно пул зростаючих фолікулів у жінок до 40 років пул залишкових фолікулів. Згідно з даними деяких авторів, відсоток фолікулів, що входять у фазу зростання, підвищується з віком, і таким чином, зменшення пулу примордіальних фолікулів частково компенсується [118, 140]. Інше питання, яка значущість ЧАФ і прогностична цінність у відношенні НВЯ.

Іншим методом у визначенні індивідуального віку яєчників може служити визначення обсягу яєчників при ультразвуковому дослідженні [140, 190]. Elter та ін. [140] досліджували яєчники жінок різного віку. Обсяг яєчника був ними визначений за спрощеною формулою еліпса, як похідне довжини, товщини і висоти яєчника помножене на значення числа π і поділене на 6. Автори виявили, що якщо у віці 10 років середній обсяг яєчника становить $0,7 \text{ см}^3$, в 17 років він складає вже $5,8 \text{ см}^3$. Автори також виявили, що об'єм яєчників залишається приблизно однаковим до 40 років і не залежить від відсутності або наявності пологів. Надалі об'єм яєчників починає поступово зменшуватися до менопаузи, після чого зменшується різко, аж до відсутності візуалізації при ультразвуковому обстеженні. Автори роблять висновок про те, що припинення менструацій, а не хронологічний вік відіграє провідну роль у зменшенні об'єму яєчників. Цей метод визначення індивідуального віку має ряд недоліків. Об'єм яєчників може змінюватися за циклом у зв'язку з зростанням домінантного фолікула і жовтого тіла, і точне вимірювання повинно проводитися тільки в ранню фолікулярну фазу за умови відсутності рецидуальної активності жовтого тіла, що залишилося з попереднього циклу.

Нещодавно було показано, що падіння рівня АМГ при переході до менопаузи відбувається раніше, ніж зменшення рівнів інгібіну В, числа антральних фолікулів і збільшення рівня базального ФСГ [98, 99, 118, 235]. Було показано, що рівень АМГ менше $0,86 \text{ нг / мл}$ чітко відповідає початку часу переходу організму до менопаузи, хоча сам передменопаузальний період може тривати до 4–5 років [16, 226, 236, 237].

Таким чином, вищезгадані методи визначення стану оваріального резерву, за даними різних авторів, мають різну діагностичну цінність та іноді отримують протилежні дані [118, 140, 170, 245, 246]. При застосуванні програм ДРТ важливо користуватись достовірними маркерами визначення репродуктивного потенціалу, які б дозволяли формувати повноцінне уявлення про функціонування фолікулярного апарату. На жаль, навіть комплексна оцінка та зіставлення даних існуючих методик не дозволяють прогнозувати характер оваріальної відповіді в циклах ЕКЗ з високою вірогідністю. Це може бути обумовлено недосконалістю даних методик з патогенетичної точки зору, або множинністю природних факторів, що призводять до слабкої відповіді яєчників при КОС. Це підкреслює необхідність доопрацювання існуючих методів визначення стану оваріального резерву і пошуку абсолютно нових методик, що відображатимуть сучасні уявлення про стан фолікулярного апарату та дозрівання яйцеклітин в циклах контрольованої оваріальної стимуляції.

Одним з найважливіших факторів успішного проведення екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) та інтрацитоплазматичного введення сперматозоїду (ІКСІ) є ефективна оваріальна стимуляція і отримання достатньої кількості зрілих ооцитів [15, 37, 64, 123, 174]. У зв'язку з цим реалізація програм ДРТ у пацієнтів зі слабкою відповіддю на стимуляцію є великою проблемою, оскільки зниження фолікулярної відповіді призводить до зменшення кількості одержуваних ооцитів, здатних до запліднення, вибору ембріонів для перенесення і подальшої імплантації [7, 12, 77, 179, 216 - 220].

Перший опис пацієнта з низькою оваріальною відповіддю на контрольовану стимуляцію відбувся 28 років тому [92, 163, 203]. Стан характеризувався зменшенням фолікулярної реакції, низькими рівнями естрадіолу та отриманням декількох яйцеклітин, які виористали для штучного запліднення. Відтоді, з'явилося понад сотні наукових публікацій, які досліджували низьку оваріальну відповідь, патогенез її розвитку,

клінічний перебіг, лікувальну тактику, такі пацієнти отримали назву «погані відповідачі», «poor responders» [7, 232, 244, 251, 253]. В літературі цей патологічний стан відомий також під назвою низька відповідь яєчників (НВЯ) або синдром слабкої відповіді яєчників [58 – 61, 77, 78]. Протягом багатьох років не існувало чіткого та міжнародно визнаного визначення НВЯ та єдиних критеріїв, що було обумовлено недостатньою кількістю досліджень та різноманітністю отриманих даних. Засіданням спеціальної проблемної групи Європейського співтовариства репродукції людини та ембріології ERSHE, що відбулося в м. Болонья у 2011 році, було створено вперше утверджене до практичного застосування єдине визначення «поганих відповідачів» (Болонські критерії) [141]:

1. Пізній репродуктивний вік матері (≥ 40 років) або будь-який інший фактор ризику НВЯ (оперативні втручання на яєчниках, СПВЯ, перенесені запальні захворювання).
2. НВЯ у попередньому циклі КОС (< 3 ооцити у стандартному протоколі стимуляції).
3. Низький тест оваріального резерву (тобто ЧАФ $< 5-7$ фолікулів або АМГ $< 0,5-1$ нг / мл).

Два та більше з перерахованих критеріїв дозволяють вживати термін «поганий відповідач» відносно пацієнта. Два епізоди НВЯ після максимальної стимуляції більшість дослідників вважають достатніми для визначення хворого як «поганого відповідача» за відсутності пізнього репродуктивного віку матері або зниженого ОРТ [166, 177, 179 – 182, 255].

Тести оваріального резерву (ОРТ) забезпечують непряме вимірювання когорти антральних фолікулів, присутніх у вікні ФСГ на початку кожного менструального циклу. ОРТ допомагають спрогнозувати індивідуальну реакцію на КОС. Деякі повідомлення проаналізували прогностичну цінність окремих і комбінованих методів оцінки оваріального резерву, проведених в базальних умовах. З усіх випробувань, ЧАФ і АМГ мали кращу чутливість та специфічність для прогнозування відповіді яєчників [98, 99, 109, 118]. Тим не

менш, навіть ці маркери оваріального резерву в окремих випадках дають 10-20% похибку в оцінці функціонального стану фолікулярного апарату. Деякі дослідники ставлять під сумнів практичну користь у клінічній практиці для прогнозування оваріальної відповіді в першому циклі ЕКЗ [93, 149, 184, 217].

Кращі порогові значення для АМГ, представлені в діапазоні від 0,5 до 1,1 нг/мл, тоді як для ЧАФ значення змінюються від менш ніж 5 до менш ніж 7 [99, 109, 118]. З практичної точки зору, ЧАФ є найбільш широко використовуваним маркером оваріального резерву, що обумовлено доступністю ультразвукової методики. Визначення рівнів ФСГ також може використовуватися для оцінки стану фолікулярного апарату, але значно поступається за специфічністю, з точки зору прогнозування НВЯ, таким маркерам оваріального резерву, як АМГ та ЧАФ. Використання базальних рівнів ФСГ, як маркеру НВЯ, має прогностичну цінність лише при високих порогових значеннях ФСГ [204]. Використання віку жінки, об'єму яєчників, рівнів ФСГ, інгібіну В значно поступається за точністю АМГ та ЧАФ в прогнозуванні НВЯ [64, 204, 218, 224, 236]. Прогностичні критерії, такі як пізній репродуктивний вік або знижені показники ОРТ, відміна в попередньому циклі ЕКЗ, отримання менше 4 ооцитів в попередньому циклі найчастіше використовуються сьогодні для оцінки ризику НВЯ.

Залишаються нез'ясованими багато аспектів лікувальної тактики у жінок з НВЯ [130, 150]. Практично єдиним методом корекції НВЯ вважається модифікація протоколів КОС. Для поліпшення яєчничкової відповіді у пацієнток з низьким оваріальним резервом пропонуються різні режими стимуляції: використання коротких протоколів стимуляції, зменшення дози агоністів гонадотропін-рилізінг гормону (а-ГнРГ), використання антагоністів гонадотропін-рилізінг гормону (ант-ГнРГ) та інше [120, 151, 166, 220, 250]. Але основним компонентом цих модифікованих протоколів є збільшення дози ГТ, тобто, більш агресивна стимуляція яєчників. Результативність цих стратегій викликає певні сумніви [100, 110, 113, 208]. Деякі дослідники зазначають менший відсоток виведення

з циклів, підвищення частоти настання вагітності після застосування модифікованих протоколів [117, 126, 183, 186, 128], інші автори не спостерігають ніякого поліпшення результативності таких програм [130, 153, 155 – 157, 163, 173]. Однак не існує єдиної думки щодо вибору протоколу КОС у пацієнтів зі зниженими показниками ОРТ і високим ризиком НВЯ, деякі вчені вважають більш ефективними протоколи стимуляції с ант-ГнРГ, ніж довгий протокол з а-ГнРГ [117, 187], що обумовлює необхідність удосконалення існуючих протоколів стимуляції та розробки схем ад'ювантної терапії.

Успішний результат ДРТ, у тому числі запліднення *in vitro*, досягнення вагітності народження живої дитини, залежить від багатьох чинників, серед яких активні кисневі форми (АФК) відіграють важливу роль [35, 94 – 97, 135, 178]. Розвиток оксидативного стресу (ОС) є однією з головних причин дефекту гамет чи порушення розвитку ембріонів [167, 209 – 212, 222, 243]. ОС – нездатність клітини подолати збільшення виділення активних форм кисню та запобігти пошкодженню клітинних структур у результаті цього збільшення [94, 168]. Це трапляється тому, що процес ЕКЗ відбувається в штучних умовах і не може відтворити точних умов, за яких можливе природне запліднення [238]. Серед найважливіших факторів, що не дозволяють процедурі ЕКЗ максимально імітувати природне запліднення, це жорсткий контроль рівнів АФК, який підтримується в межах фізіологічних концентрацій антиоксидантами в природних умовах [133, 138]. З метою оптимізації якості ембріонів і поліпшення результатів ЕКЗ доцільні профілактичні заходи, які зведуть до мінімуму негативні наслідки ОС під час ДРТ. Один зі способів досягнення цієї мети – підвищення антиоксидантного захисту ембріонів від шкідливого впливу окислення [106 – 108, 138, 139].

Вільні радикали являють собою молекули або атоми з непарним числом електронів. Хоча це явище необхідно для функціонування організму, вільні радикали шкідливі у великих кількостях і беруть участь у патофізіології різних захворювань [35, 40, 83, 95, 96]. Вільні радикали

надзвичайно хімічноактивні і беруть участь у ланцюгових реакціях, які викликають дестабілізацію інших молекул та генерують ще більше вільних радикалів [172]. АФК у високих концентраціях здатні викликати клітинну токсичність і можуть порушувати здатність сперматозоїдів запліднювати яйцеклітини [95, 135, 138]. Тим не менш, невелика кількість АФК необхідна для регулювання різних клітинних функцій [96].

Незважаючи на поліпшення методик ДРТ, статеві клітини і ембріони, що утворюються в процесі ЕКЗ, зазнають впливу потенційно АФК-індукованими факторами. У пробірці ризик розвитку оксидативного стресу більше, ніж у природних умовах, і його негативний вплив може бути посилений за рахунок відсутності фізіологічних механізмів захисту, відсутності природних антиоксидантів і наявності декількох потенційних джерел АФК [134]. Ці джерела АФК у ході процедури ЕКЗ походять ендогенно з гамет або за допомогою екзогенних факторів навколишнього середовища [135]. Відсутність заходів із приборкування АФК, їх ендогенних та екзогенних джерел, врешті-решт призводить до розвитку ОС, який негативно впливає на ефективність репродуктивних методик і результат вагітності [239]. Генерації АФК, особливо під час ембріонального розвитку, пов'язані з надмірною активацією геному, ембріонального ущільнення і штрихування, оскільки ці процеси вимагають великої кількості енергії [138, 222]. З іншого боку, ембріони зазнають впливу високих рівнів АФК, що знижує їх якість і призводить до ризику уповільнення і блоку раннього ембріонального розвитку [139, 213].

Рівні АФК відіграють важливу роль в аспектах жіночої репродукції, включаючи процеси дозрівання яйцеклітин, фолікулогенез, овуляцію і інволюцію жовтого тіла. Надмірні рівні АФК можуть впливати на цитоскелет ооцитів, знижувати їх якість, викликати хромосомні анеуплоїдії та призводити до порушення розвитку ембріона, що значно погіршує результат ЕКЗ [121, 167, 213].

Кумулюс-клітини утворюються з відносно недиференційованих клітин гранульози, що оточують яйцеклітину і складаються з купчастих клітин і позаклітинного матриксу. Кумулюс-клітини тісно взаємодіють між собою і надають підтримку у розвитку та дозріванні яйцеклітин, розділяють мікросередовище ооцитів і знижують надлишок АФК [96, 129]. Ці клітини здатні виробляти такі антиоксиданти, як супероксиддисмутаза (СОД), які захищають ооцит від АФК-індукованого ушкодження [242]. Більш високі рівні СОД в кумулюсних клітинах значно підвищують успішність ДРТ [243]. Підвищені рівні біомаркерів оксидативного стресу в кумулюсних клітинах, навпаки, значно погіршують запліднення ооцитів і якість ембріонів [160, 167, 212]. Фолікулярна рідина виробляється тека-клітинами і гранульозою клітин та заповнює антральний фолікул. Низькі рівні АФК у фолікулярній рідині можуть бути використані для прогнозування потенційного успіху ЕКЗ [132, 134, 152]. Вагітність, отримана унаслідок ІКСІ негативно пов'язана з високим рівнем АФК у фолікулярній рідині, але позитивно пов'язана з загальним вмістом в ній антиоксидантів [107, 142, 144]. Хоча рівні АФК, як повідомляється, вище при культивуванні ембріонів в лабораторних умовах, у порівнянні з природними [96, 97, 152, 178, 194], залишається неясним, наскільки процедура штучного запліднення (методи та умови, що використовуються) підвищує рівні ОС.

До біомаркерів дії ОС відносять 8-ізопростагландин F2 α (8-ізопростан), 8-гідроксигуанозин та 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозин. Високі концентрації біомаркерів визначаються в рідинах тіла або тканинах пацієнтів з віковими та дегенеративними захворюваннями [40, 111, 139, 152, 160, 201].

Чутливим методом визначення інтенсивності ОС є виявлення в біологічних зразках 8-ізопростана (8-изо-простагландин F2 α , 8-изо-PGF2 α). 8-ізопростан (8-ІЗП) - стабільна простагландин-F2-подібна субстанція, яка формується при окисненні арахідонової кислоти в клітинній мембрані неферментативним шляхом, яка була запропонована як новий індекс ОС [40, 160].

Ізопростани з'являються в тканинах і плазмі як наслідок оксидативної деградації фосфоліпідних мембран, відображаючи зміну цілісності та мінливості мембран під дією ОС. Вони присутні в плазмі та сечі в нормальних умовах і підвищуються при ОС. Рівень 8-ІЗП дозволяє оцінити ОС і антиоксидантний захист. Він також надійний індикатор цілісності ліпидовмісних зразків (сироватка, плазма, клітинні препарати). Його рівень зростає з віком у здорових осіб. Рівень 8-ІЗП підвищується при багатьох нейродегенеративних захворюваннях, ішемічній хворобі серця, артеріальній гіпертензії [40, 160].

8-ІЗП – стимулятор проліферації судинних гладком'язових та ендотеліальних клітин, сильний вазоконстриктор для судин нирок і легень, стимулятор гіперпродукції колагену в моделі печінкового фіброзу, медіатор гепаторенального синдрому і токсичності кисню в легенях, інгібітор агрегації тромбоцитів [96, 152, 160].

Концентрація 8-ІЗП у біологічних рідинах використовується для моніторингу активності ОС. Згідно з даними деяких досліджень, більш високі рівні концентрації 8-ІЗП спостерігалися, наприклад, у курців (24 ± 8 мкг/мл) і у пацієнтів з муковісцидозом (43 ± 7 пг/мл) порівняно зі здоровими людьми (11 ± 4 мкг/мл), а також при артритях, катаракті у старших вікових груп населення, гіпертензії, астмі, цукровому діабеті II типу [40, 160, 137].

На особливу увагу заслуговує питання визначення біомаркерів ОС, зокрема 8-ІЗП, при захворюваннях репродуктивної системи та безплідді, оскільки цей напрямок недостає освітлений даними літературних джерел.

Оксидативний стрес визначається як дисбаланс між окиснювачами (АФК) та антиоксидантним захистом в організмі на користь оксидантів [96, 238].

Мелатонін – гормон фотоперіодичності, виділяється переважно вночі, тому його виділення пригнічується імпульсами, що надходять з сітківки ока [45, 175]. Мелатонін синтезується пінеалоцитами епіфіза (пінеальною залозою) з серотоніну, він пригнічує секрецію гонадоліберину гіпоталамусом

і гонадотропінів передньої долі гіпофіза [2, 3, 29, 50, 63]. При порушенні функції епіфіза в дитячому віці спостерігається передчасне статеве дозрівання [41]. Інверсія впливу мелатоніну на деякі ендокринні функції залежно від режиму освітлення свідчить про те, що уявлення про мелатонін як про універсальний інгібітор гонадотропної функції тривалий час було достатньо спрощеним [30 – 32, 39, 43, 11].

Є численні дані, що свідчать про наявність взаємозв'язку між зниженням синтезу мелатоніну і настанням менопаузи. Підвищення синтезу ФСГ є предиктором початку менопаузи [69, 84, 85]. У період менопаузи концентрації ФСГ і ЛГ збільшуються, тоді як вироблення прогестерону і естрогену знижується. Дослідники спостерігали взаємозв'язок між зниженням продукції ендogenous естрогену і підвищенням синтезу мелатоніну у жінок в період менопаузи [63, 69, 91]. Vakkuri та ін. в п'ятилітньому спостереженні за жінками у віці 35–75 років виявили у максимальне зниження вироблення мелатоніну у жінок віком 39–44 років ($21,1 \pm 2,2$ до $12,5 \pm 1,7$ пмоль / л на 41%). Надалі у цих жінок до 50 річного віку рівень мелатоніну залишався достатньо точно стабільним, після 50 років було зареєстровано його різке зниження (до 7,5 пмоль / л – на 5%). Дослідниками зроблено висновок про наявність взаємозв'язку між зниженням вироблення мелатоніну і настанням менопаузи. Вікове зниження секреції мелатоніну в організмі сигналізує про розлад пінеального і гіпофізарного контролю над яєчникомовою циклічністю, і прогресивне згасання фертильної функції жінки [29, 136, 199, 221].

Звертають на себе увагу множинні ефекти мелатоніну у якості антиоксиданта [145, 194, 197, 198, 247], регулятора циркадного ритму [228] та добових змін рухової активності і температури тіла [193, 214]. Експозиція до постійного світла збільшує перекисне окислення ліпідів і зменшує загальну антиоксидантну і супероксиддисмутазну активності, протипухлинний імунітет [5, 17, 20, 22, 23], тоді як застосування мелатоніну

викликає зниження ліпідної пероксидази, особливо в мозку [3, 24, 161]. Ці дані узгоджуються з «вільно-радикальною теорією» старіння [6, 17, 36, 199].

Мелатонін виступає головним агентом синхронізації циркадних структур сну [196], він також діє в якості поглинача вільних радикалів шляхом модуляції експресії антиоксидантів і зниження про-апоптичних білків [111, 133, 161, 194, 227]. Враховуючи властивості мелатоніну запобігати пошкодженню вільними радикалами, активно досліджується його роль у лікуванні безпліддя в якості лікарського засобу [191, 194, 234, 249].

Мелатонін, потужний антиоксидант, що виділяється пінеальною залозою, присутній у фолікулярній рідині і спермі [162, 191, 192, 194]. Мелатонін активізує первинні ферментативні антиоксиданти (СОД, каталазу, GPx) [242, 243]. Нещодавно стало відомо, що концентрація мелатоніну в преовуляторному фолікулі вище, ніж у плазмі крові [194]. Інтрафолікулярні рівні мелатоніну мають зворотню кореляцію з 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозином, який є одним з маркерів оксидативної активності [139,144]. Отримані перші відомості щодо застосування мелатоніну у якості антиоксидантної терапії оксидативних порушень [194,195, 207, 215], проте, отримані неоднорідні результати свідчать про необхідність подальшого вивчення цього напрямку, у тому числі під час застосування програм ДРТ. Згідно з даними інших перспективних досліджень, мелатонін призначався у комплексі з міо-інозитолом і фолієвою кислотою у безплідних жінок, які планували ЕКЗ, що призвело до збільшення числа зрілих ооцитів та ембріонів високої якості [131, 234]. Була визначена тенденція високих клінічних показників вагітності та імплантації, частота запліднення підвищувалася, або залишалася без змін [129, 131].

Однією з найбільш частих проблем в циклах ЕКЗ є проблема якості ооцитів. АФК, такі як, O_2 і H_2O_2 , вважають вчені, є відповідальними чинниками порушення перифолікулярного мікросередовища і негативно впливають на якість ооцитів [135, 147, 185]. Баланс між виробництвом АФК і антиоксидантних речовин є дуже важливим для дозрівання ооцитів і

запліднення [121, 252]. Мелатонін, будучи одним з поглиначів вільних радикалів антиоксидантом, може позитивно впливати на якість ооцитів у пацієнтів ЕКЗ-ПЕ [194]. Nemadi ін. прийшли до висновку, що мелатонін має стимулюючу дію на якість кумулюс-ооцит комплексу [198]. Розподіл фолікулярних клітин, що покривають ооцит, має бути однорідним, середнє виживання цих фолікулів покращується з використанням мелатоніну. Rizzo та ін. вивчали ефект мелатоніну разом з міо-інозитолом та фолієвою кислотою, і вони підтвердили, що якість ооцитів покращується у пацієнтів, яким додатково призначали мелатонін, міоінозитолфосфат та фолієву кислоту [131, 234]. Tamura та ін. також документально підтвердили, що мелатонін збільшує запліднення і процент вагітністей у пацієнтів з ооцитами низької якості в попередніх програмах [191, 192, 194]. Інші дослідження також присвячені стимулюючій дії мелатоніну на якість ооцитів. Ооцити пацієнтів, які отримували мелатонін, мають вищий коефіцієнт поділу, ніж ті, які не отримували мелатонін, причиною може бути зниження вмісту вільних радикалів та підвищення активності антиоксидантів перифолікулярного мікросередовища [191, 194, 195, 207]. АФК також можуть порушувати якість ембріонів [96, 121, 213]. Більш високі рівні АФК в ендометрії та поживних середовищах були пов'язані із затримкою ембріонального розвитку і високою фрагментацією [121, 139]. Дослідження показують, що мелатонін покращує показники ембріонів після ембріотрансферу, що пояснюється антиоксидантною дією мелатоніну [142, 169, 194]. Прийом мелатоніну покращує якість ооцитів, що призводить до отримання ембріонів більш високої якості [194, 210, 215].

Суттєвими недоліками приведених досліджень, що потребують вирішення, були відсутність виміру вільних радикалів у фолікулярній рідині, що не дозволяло згрунтувати пояснення патофізіології антиоксидантного впливу мелатоніну. До недавнього часу дослідники лише припускали додаткову ефективність мелатонін-горонотерапії у пацієнтів із порушенням сну у вигляді покращення якості ооцитів та ембріонів [196].

Підсумовуючи вищесказане, слід зазначити, що визначення біомаркерів ОС є високоінформативним і перспективним дослідженням з точки зору патогенезу захворювання. Біомаркери ОС не тільки відображають патологічні зсуви в організми людини, але й дозволяють сформувати уявлення про ланку пошкодження та біохімічну структуру порушень на клітинному рівні. За допомогою біомаркерів ОС можливо оцінити ступінь перекисного пошкодження фосфоліпідних, білкових, ДНК і РНК структур. Особливий інтерес для репродуктивної медицини становлять такі біомаркери ОС, як 8-ізопростан та 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозин, оскільки процес дозрівання ооцитів в програмах контрольованої оваріальної стимуляції супроводжується високою швидкістю внутрішньоклітинних реакцій та геномними поділами, а отже, високим утворенням АФК. Визначення біомаркерів ОС у фолікулярній рідині та сироватці крові методом ІФА під час оваріальної стимуляції гонадотропінами дозволить оцінити їх вплив на зріючу яйцеклітину і загальні метаболічні зміни в організмі людини.

Профілактичне застосування пероральних антиоксидантів та використання їх як компонентів культуральних середовищ може принести значну користь у поліпшенні якості статевих клітин та розвитку ембріона. Тим не менш, залишаються відкритими питання щодо вибору відповідних антиоксидантів, схеми їх застосування та комбінування з іншими препаратами.

Резюме

Таким чином, аналіз публікацій вітчизняних та іноземних авторів демонструє наступне. Низька відповідь яєчників в програмах ДРТ є важливою проблемою сучасної репродуктивної медицини через високу частоту і тенденцію зростання по мірі збільшення частки осіб з низьким оваріальним резервом серед жінок пізнього репродуктивного віку з безпліддям, що спричиняє зниження ефективності програм ДРТ. Недостатньо вивченими залишаються питання функціонування репродуктивної системи в умовах оксидативного стресу під час стимуляції ГТ, та епіфізарної регуляції, яку здійснює пінеальна залоза за рахунок опосередкованого рецепторного впливу мелатоніну на процес дозрівання фолікулів. При застосуванні ДРТ у жінок з безпліддям остаточно не визначена роль маркерів ОС, таких як 8-ізопростан, та маркерів роботи АОС, зокрема мелатоніну, а також до кінця не розкрита їх диференційно-діагностична значимість.

Одним із найбільш складних питань при виборі протоколу КОС є своєчасна діагностика порушень оваріального резерву та прогнозування оваріальної відповіді. Використання існуючих тестів визначення стану оваріального резерву не завжди відображає індивідуальний репродуктивний потенціал і потребує подальшого вивчення. Це ускладнює процес отримання якісних, дозрілих ооцитів, а в подальшому – життєздатних ембріонів. Традиційні протоколи КОС у більшості жінок з низьким оваріальним резервом не дозволяють отримати задовільний результат, що обумовлює необхідність доопрацювання існуючих методик та створення модифікованих схем КОС у жінок з НОР, направлених на покращення оваріальної відповіді та підвищення результативності програм ДРТ.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна клінічна характеристика обстежених жінок

Дослідження виконано на кафедрі акушерства та гінекології №1 Харківського національного медичного університету. Під час дослідження дотримувалися положень Гельсінської Декларації Всесвітньої Медичної Асоціації [26], етичного кодексу лікаря України, добровільної участі, інформування хворого про характер дослідження. Обстеження та лікування здійснювалось відповідно до Наказу Міністерства охорони здоров'я України №787 від 09.09.2013 р. про затвердження порядку застосування ДРТ в Україні [27].

Методологія роботи включала декілька етапів:

Перший етап роботи полягав у вивченні функціонального стану репродуктивної системи у жінок з безпліддям, що звернулись для застосування методик ДРТ з використанням як загальноприйнятого алгоритму обстеження, так і нових маркерів, зокрема визначення концентрації мелатоніну та 8-ізопростану в сироватці крові та фолікулярній рідині.

Другий етап роботи включав розробку та впровадження модифікованих схем КОС для покращення оваріальної відповіді у жінок з НОР.

Третій етап роботи полягав у обробці та аналізі даних оваріальної відповіді на КОС та ефективності застосованих програм ДРТ.

Загалом під спостереженням перебувало 96 жінок репродуктивного віку. З них 66 хворих на трубно-перитонеальне безпліддя жінок з НОР, яким показано застосування програм ДРТ – склали основну групу. До контрольної групи увійшли 30 здорових жінок, донорів яйцеклітин.

Після включення в програму ДРТ і проведення стандартного обстеження пацієнток основної групи, які дали згоду на участь у дослідженні (n=66), методом випадкового розподілу – простої рандомізації (з

використанням таблиці випадкових чисел) було поділено залежно від лікувальної схеми (Рис. 2.1):

- I група – 33 жінки з НОР, яким проводилась КОС за допомогою стандартного протоколу (протокол с ант-ГнРГ або с а-ГнРГ);
- II група – 33 жінки з НОР, яким проводилась модифікована схема КОС (протокол с ант-ГнРГ або с а-ГнРГ) з ад'ювантною мелатонін-гормонотерапією (АМГТ);

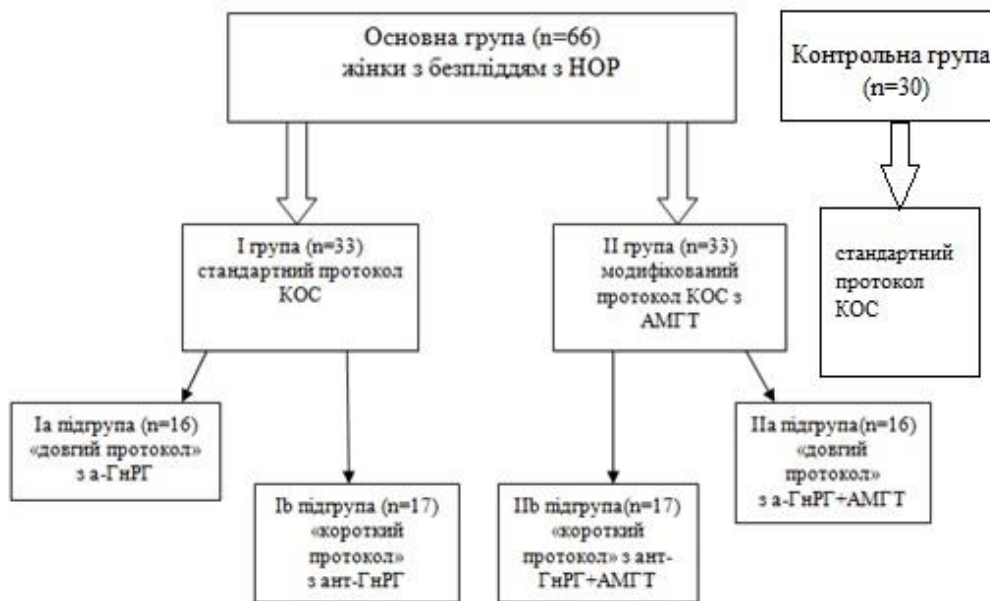


Рис. 2.1. Схема розподілу пацієток основної групи залежно від лікувальної схеми.

Включення пацієток до основної групи проводилося за наступними критеріями:

- 1) наявність клінічних проявів довготривалого безпліддя у жінок (більше 5 років) виключно трубно-перитонеального генезу;
- 2) інструментальне підтвердження трубно-перитонеального генезу захворювання методом метросальпінгографії (МСГ), наявності рентгенівських знімків;
- 3) НОР та наявність 2 і більше критеріїв «поганих відповідей»;
- 4) репродуктивний вік;

5) наявність показань до застосування ДРТ;

6) здоровий соматичний та психічний стан, відсутність інфекційних захворювань і тяжких супутніх захворювань, що є протипоказаннями до застосування методик ДРТ, та хронічних захворювань у стадії загострення;

7) добровільна згода пацієнтки на участь у дослідженні.

При відборі хворих на безпліддя жінок до основної групи ми користувалися Болонськими критеріями «поганих відповідей» (Європейське товариство репродукції людини і ембріології ERSHE, 2011 р, м. Болонья) [21, 41].

1. Пізній репродуктивний вік матері (≥ 40 років) або будь-який інший фактор ризику НВЯ.
2. НВЯ у попередньому циклі КОС (< 3 ооцити при звичайному протоколі стимуляції).
3. Низькі показники оваріального резерву (тобто ЧАФ $< 5-7$ фолікулів або АМГ $< 0,5-1,1$ нг / мл).

Алгоритм ведення пацієнток з безпліддям виконувався відповідно до наказів МОЗ України № 787 від 09.09.2013 р. «Про затвердження порядку застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні», № 1030/102 від 29.11.2013 р. «Про удосконалення системи планування сім'ї та охорони репродуктивного здоров'я в Україні» :

- виконувався збір даних щодо попереднього обстеження та лікування з приводу безпліддя подружньої пари: дані метросальпінгографії (рентгенівські знімки прохідності маткових труб). Для чоловіка: дані спермограми з морфологією. За відсутності таких даних проводилось обстеження партнера, обов'язковими умовами були: кількість днів утримання від статевого життя не менше 2, але не більше 7 днів, утримання від відвідування сауни, прийому гарячих ванн і вживання спиртного. За показаннями проводилась консультація андролога;

- пари підлягали обов'язковому стандартному протоколу обстеження (ОСПО), що передувало включенню до програми ДРТ: клінічний аналіз крові, клінічний аналіз сечі, коагулограма, біохімія крові; інфекційне обстеження, що включало виявлення антитіл до ВІЛ, антитіл до антигенів збудника сифілісу, HbsAg, HCV, визначення антитіл до вірусу простого герпесу, цитомегаловірусу, вірусу краснухи в крові методом ІФА, генетичного матеріалу хламідій, вірусу простого герпесу – методом ПЛР, уреоплазм, мікоплазм – культуральним методом; мікроскопічне дослідження виділень статевих органів, мазки на флору з уретри і цервікального каналу та визначення ступеня чистоти піхви (перед кожною програмою індукції суперовуляції); цитологічне дослідження мазків із шийки матки; ультразвукове обстеження органів малого таза (перед кожною програмою індукції суперовуляції); гормональне дослідження – кров на ТТГ, пролактин, Т3 св., Т4 св., ФСГ, ЛГ, Е2, тестостерон, АМГ (на 2-5 день циклу); флюорографію; ЕКГ; УЗД молочних залоз жінкам до 35 років, мамографію жінкам після 35 років; висновок терапевта про стан здоров'я та можливості виношування вагітності;
- за показаннями пацієнтам проводилась консультація суміжних фахівців, лікаря-генетика і каріотипування, обстеження на наявність антиспермальних та антифосфоліпідних антитіл, та інвазивні ліувально – діагностичні заходи: гістероскопія, лапароскопія, дослідження стану матки та маткових труб (гістеросальпінгографія або гістеросальпінгографія і лапароскопія).

Для відбору групи донорів (n=30), які склали III контрольну групу (КГ), застосовувались наступні критерії:

- 1) репродуктивний вік жінки (до 35 років);
- 2) здоровий соматичний та психічний стан;

- 3) відсутність інфекційних захворювань;
- 4) наявність власних здорових дітей;
- 5) добровільна згода пацієнта на участь у дослідженні;
- 6) поінформовану згоду про передачу яйцеклітин.

Алгоритм ведення пацієнток контрольної групи донорів відповідно до наказу МОЗ України № 787 від 09.09.2013 р. «Про затвердження порядку застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні»:

- Усі донори підлягали стандартному обстеженню, що включало: гінекологічне обстеження, мазки на флору з уретри і цервікального каналу і ступінь чистоти піхви (перед кожною програмою індукції суперовуляції); цитологічне дослідження мазків з шийки матки; ультразвукове обстеження органів малого таза (перед кожною програмою індукції суперовуляції); обстеження на інфекції: гонорею, хламідіоз, генітальний герпес, уреаплазмоз, мікоплазмоз, цитомегаловірус; аналіз крові на сифіліс, ВІЛ, гепатити В і С; гормональне дослідження (АМГ, ЛГ, естрадіол, прогестерон); визначення групи крові і резус-фактора; огляд терапевта і висновок про стан здоров'я; огляд і висновок психолога; медико-генетичне обстеження та клініко-генеалогічне дослідження, каріотипування.
- Донори давали поінформовану згоду, в якій зазначалось, що їх яйцеклітини і отримані з них ембріони будуть власністю пацієнтів.
- Процедурі ЕКЗ з використанням ооцитів донора передувала синхронізація менструальних циклів донора і пацієнтки. Після цього донору виконували стимуляцію яєчників, а реципієнтам проводили підготовку ендометрія до імплантації ембріонів.
- Отримання дозрілих яйцеклітин у донора виконувалось шляхом трансвагінальної пункції під внутрішньовенною анестезією.
- Яйцеклітини запліднювались за допомогою сперми чоловіка або донора, за відсутності сперматозоїдів чоловіка.

- Ембріони культивувались в умовах ембріологічної лабораторії, після чого їх переносили в порожнину матки реципієнта, так само, як і при звичайному ЕКЗ.
- Протягом 2 тиж. після переносення ембріону пацієнтки отримували підтримуючу терапію, до отримання підтвердження вагітності шляхом проведення двох експрес тестів на β -ХГЧ різних виробників.
- Після отримання позитивного результату підтримуюча терапія продовжувалась до 14 тиж. вагітності.

Віковий склад пацієнток основної та контрольної групи представлений у вигляді вікових діапазонів у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Вікова структура пацієнток обстежених груп

Вікові діапазони	Основна група (n=66)		Контрольна група (n=30)	
	Кількість	%	Кількість	%
23-25 років	1	2	3	10
26-29 років	8	12	16	54
30-33 років	10	15	10	33
34-37 років	17	26	1	3
38-41 років	24	37	-	-
42-45 років	5	8	-	-

Віковий склад основної групи коливався від 24 до 45 років, середній вік складав $36,00 \pm 4,86$ років, медіана знаходилась на рівні 36 років, в контрольній групі коливався від 23 до 35, середній вік складав $28,67 \pm 2,61$ років, медіана знаходилась на рівні 28 років.

Звертає увагу велика кількість жінок основної групи, хворих на безпліддя, старше 33 років, порівняно з контрольною групою здорових жінок-донорів, що обумовлено одним з критеріїв відбору «поганих відповідачів» до основної групи та клінічним перебігом безпліддя.

Найбільша кількість жінок ОГ знаходилась у вікових діапазонах 34-37 років та 38-41 років, 26% та 37% відповідно. Основна кількість жінок КГ знаходився у вікових діапазонах 26-29 років та 30-33 років, 53% и 24% відповідно. Така відмінність не мала принципового значення, оскільки контрольна група була відібрана для відпрацювання нормативних показників мелатоніну та 8-ізопростану в сироватці крові та фолікулярній рідині пацієнток, та порівнювалась згідно вікових діапазонів.

Згідно з положенням ERSHE групи наявність двох та більше Болонських критеріїв дають право вважати пацієнтів «поганими відповідачами». Оскільки об'єктом дослідження стали жінки з НОР, то у відборі пацієнтів в групу дослідження ми керувалися саме цими критеріями (табл.2.2).

Таблиця 2.2

Структура пацієнток основної групи відповідно до критеріїв включення в дослідження (Болонських критеріїв).

Критерій відбору	Основна група (n=66)	
	Кількість	%
Вік старше 40 років	18	27
Операції на яєчниках в анамнезі	16	24
Слабка відповідь на КОС (3 и менше ооцитів) при попередніх спробах ЕКЗ	13	20
АМГ менше 1.1 нг/мл	60	91
ЧАФ 5-7	19	29

Одним із основних показників зниження оваріального резерву вважають рівень АМГ. Більшість пацієнток ОГ – 90,9% мали рівні АМГ нижче 1,1 нг/мл, що стало першим критерієм відбору. Другим критерієм у цих пацієнток в 29% були низькі показники ЧАФ, в 27% - пізній репродуктивний вік, в 24% - перенесені операції на яєчниках, в 20% - НВЯ в попередньому циклі ЕКЗ. 9% (n=6) пацієнток ОГ мали нормативні значення

АМГ у поєднанні з трьома іншими факторами ризику: НВЯ у попередньому циклі ЕКЗ, операції на яєчниках в анамнезі, знижене ЧАФ.

Серед жінок основної групи провідною скаргою було безпліддя (неможливість завагітніти при веденні статевого життя без застосування будь-яких методів контрацепції більше року). Середня тривалість безпліддя у пацієнток основної групи склала $9,14 \pm 3,18$ років ($M \pm \sigma$), що було обумовлено тривалим попереднім лікуванням з приводу даного захворювання, у тому числі попередніх спробах ЕКЗ, які не були ефективні.

Вивчаючи анамнестичні дані пацієнток, зокрема генеалогічний анамнез, дитячі захворювання, соціально-побутові умови життя не виявлено відхилень від загальної популяції, що звертали на себе увагу. Серед пацієнток ОГ та КГ не було виявлено профшкідливостей, та умов праці пов'язаних з важкими фізичними навантаженнями. При опитуванні серед пацієнток ОГ в 23% випадках були виявлені шкідливі звички у вигляді тютюнопаління в анамнезі, та в 5% випадках були виявлені активні курці. В КГ не було виявлено активних курців, і лише в 23% випадках виявлено тютюнопаління в анамнезі.

Більше 90% опитаних жінок на момент дослідження були у шлюбі. В ОГ 38% ($n=25$) жінок мали повторні шлюби, що в 5 разів частіше порівняно з КГ 17% ($n=5$).

Досліджено ендокринний фон у пацієнток основної та контрольної груп, жінки детально обстежені на предмет наявності явних фенотипічних (акне, гірсутизм, ожиріння) та прихованих симптомів ендокринної патології, оскільки наявність супутніх ендокринних захворювань, наприклад СПКЯ, була критерієм виключення пацієнток із дослідження.

Проведено аналіз конституційного типу за допомогою індексу маси тіла (ІМТ) у обстежених пацієнток, який інтерпретували згідно з табл. 2.3

Таблиця 2.3

Інтерпретація ІМТ

Індекс маси тіла	Інтерпретація (ВООЗ 2010)
16 та нижче	Виражений дефіцит маси тіла
16—18,5	Недостатня маса тіла (астенічний тип)
18,5—24,99	Норма (нормостенічний тип)
25—30	Надлишкова маса тіла, предожиріння (гіперстенічний тип)
30—35	Ожиріння першого ступеня
35—40	Ожиріння другого ступеня
40 та вище	Ожиріння третього ступеня, морбідне

Характеристика середніх значень ($M \pm \sigma$) ІМТ та антропометричних даних обстежених пацієнток представлена у табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Характеристика конституційних показників та ІМТ
обстежених пацієнток

Основна група (n=66)			Контрольна група (n=30)		
Зріст (см)	Маса (кг)	ІМТ	Зріст (см)	Маса (кг)	ІМТ
165,44 \pm 6,37	65,73 \pm 12,41	24,04 \pm 4,51	163,40 \pm 5,82	59,2 \pm 10,88	22,07 \pm 3,03

Середній показник зросту основної групи складав 165,44 \pm 6,37 см, і вірогідно не відрізнявся від контрольної групи 163,40 \pm 5,82 см. Середня маса тіла пацієнток основної групи складала 65,73 \pm 12,41 кг, порівняно 59,2 \pm 10,88 кг у контрольній групі. Гіперстенічний конституційний тип, ІМТ = 25-30 (предожиріння), зустрічався у 32% (n=21) пацієнток основної групи, що на 12% частіше порівняно з контрольною групою - 20% (n=6), можебути обумовлене більш старшою віковою структурою пацієнток з безпліддям. Астенічний тип, ІМТ = 16-18,5, зустрічався в 9% пацієнток основної групи, і

значно не відрізнявся від контрольної групи - 10%. Це свідчить на користь субклінічних порушень з боку ендокринної системи та потребує більш детального дослідження гормональної ланки.

Аналіз характеру менструальної функції показав, що у всіх жінок основної і контрольної групи до 33 років мав місце регулярний менструальний цикл (МЦ). Менархе у віці 9-11 років у жінок з безпліддям було зафіксовано у 4 (6%) випадках і у 2 (7%) випадках в контрольній групі. Менархе у віці 12-14 років у пацієнток основної групи визначалося в 60 (91%) випадках, у 27 (90%) здорових жінок. Пізнь менархе у віці 15-17 років визначалося у 2 (3%) жінок з безпліддям і у 1 (3%) пацієнтки основної групи. Таким чином, у 90 % пацієнток з безпліддям середній вік менархе складав $13,4 \pm 2,8$ років, і вірогідно не відрізнявся від контрольної групи. Пізнь менархе було виявлено у 6 (10 %) пацієнток основної групи.

Тривалість менструального циклу та характер менструацій мали значні відмінності в основній і контрольній групах, менструальний цикл становив від 24 до 32 днів. Середня тривалість МЦ складала $27 \pm 3,5$ днів. Укорочений менструальний цикл 24-26 днів спостерігався у 16 (24%) жінок з безпліддям і у 2 (7%) здорових жінок контрольної групи ($p < 0,05$). Усі випадки вкорочення МЦ були виявлені у жінок віком від 35 років. Тривалість менструального циклу 27-30 днів спостерігалась у 45 (68%) жінок з безпліддям і у 27 (90%) здорових жінок ($p < 0,05$). Подовжений менструальний цикл тривалістю 31-32 дні спостерігався в 5 (8%) жінок з безпліддям і у 1 (3%) жінки контрольної групи ($p < 0,05$). Менструації, які тривали 2-4 дні, визначалися у 24 (36%) жінок з безпліддям, у 5 (17%) жінок контрольної групи ($p < 0,05$). Менструації, які тривали 5-7 днів, визначалися у 46 (69%) жінок з безпліддям, і у 25 (83%) жінок контрольної групи ($p < 0,05$). Менструації, які тривали понад 8 днів, спостерігались у 5 (8%) жінок з безпліддям, і не визначались у здорових жінок з контрольної групи ($p < 0,05$). За характером та об'ємом розрізняли менструації болісні та безболісні, помірні та рясні виділення. Помірні безболісні менструації спостерігались в

21 (32%), рясні та болісні у 45 (68%) жінок з безпліддям. В контрольній групі менструації в 27 (90%) жінок характеризувалися відсутністю больових відчуттів та помірним об'ємом менструальних виділень.

Структура супутньої екстрагенітальної захворюваності представлена у табл. 2.6.

Таблиця 2.6.

Структура екстрагенітальних захворювань у обстежених пацієнток

Назва	Основна група (n=66)		Контрольна група (n=30)	
	Кількість	%	Кількість	%
Захворювання серцево-судинної системи	25	38	6	20
Захворювання дихальної системи	30	45	12	40
Захворювання травної системи	27	41	10	33
Захворювання видільної системи	9	14	3	10
Варикозна хвороба вен нижніх кінцівок	18	27	5	17

Аналіз екстрагенітальної захворюваності виявив що найбільш поширеними хронічними захворюваннями були хвороби дихальної системи у 45% (n=30) жінок основної групи та у 40% (n=12) контрольної групи. Друге місце серед хронічної соматичної патології займали хвороби травної системи у 41% (n=27) основної групи та у 33,3% (n=10) пацієнток контрольної групи. Третє місце в структурі захворюваності посідають захворювання серцево-судинної системи в 38% (n=25) пацієнток основної групи та в 20% (n=6) пацієнток контрольної групи. Хвороби видільної системи зустрічались у пацієнток основної групи в 14% та в 10% пацієнток контрольної групи. Різноманітні прояви варикозної хвороби зустрічалась майже у третини 18 (27%) жінок основної групи, у кожної шостої (17%) жінки контрольної групи.

Таким чином кожна друга пацієнтка основної групи мала екстрагенітальне захворювання, або їх поєднання. Соматична патологія у пацієнток основної групи зустрічалась вірогідно частіше, порівняно з контрольною групою, що могло вплинути на реалізацію репродуктивної функції.

Всі захворювання на момент проведення дослідження були в стадії компенсації, або стійкої ремісії (більше 1 року), не мали клінічних, лабораторно-інструментальних проявів, та не були протипоказаннями до застосування ДРТ та виношування вагітності.

Дані перенесених уrogenітальних захворювань, що могли нанести шкідливий вплив на процес запліднення та розвиток плода (TORCH-комплекс), зокрема інфекції, що передаються статевим шляхом, представлені у табл. 2.7.

Таблиця 2.7

Перенесені уrogenітальні захворювання у обстежених пацієнток

Назва захворювання	Основна група (n=66)		Контрольна група (n=30)	
	Кількість	%	Кількість	%
Хламідіоз	7	11	1	3
Трихомоніаз	4	6	2	6
Мікоплазмоз	4	6	2	6
Уреаплазмоз	8	12	2	6
Кандидоз	6	9	4	13

У 33,3% (n=22) жінок основної групи та 36,7% (n=11) жінок контрольної групи були виявлені IgG з високою авідністю до інфекцій TORCH-комплексу методом ІФА. Токсоплазмоз мав місце в 8-10% випадків, цитомегаловірусна інфекція в 3-5% випадків, віруси герпесу в 3-7% випадків.

Інфекції, що передаються статевим шляхом були виявлені в 48,4% (n=32) жінок, з них 7 випадків хламідіозу, 4 випадки трихомоніазу, 4

випадки мікоплазмозу, 8 випадків уреоплазмозу, 6 випадків кандидозу, 3 випадки гарднерельозу та 5 випадків мікс-інфекції, наявність збудників була лабораторно підтверджена методом ПЦР (ДНК збудника), було проведено етіотропне лікування з подальшим контролем виліковності.

Дані репродуктивного анамнезу (наявність вагітностей та пологів в анамнезі) у жінок основної групи, які мають вторинне безпліддя, та у жінок контрольної групи представлені у табл. 2.8.

Таблиця 2.8

Особливості репродуктивного анамнезу обстежених груп

Показник	Жінки з вторинним безпліддям (n=29)		Контрольна група (n=30)	
	Кількість	%	Кількість	%
Вагітності в анамнезі	100	29	100	30
Пологи в анамнезі	11	37	100	30
Самовільні викидні	8	28	3	10
Штучні аборти	12	41	14	40

У 44% (n=29) жінок основної групи мале місце вторинне безпліддя. Серед жінок з вторинним безпліддям в 28% випадків в анамнезі були виявлені самовільні викидні у терміні до 12 тижнів вагітності, в 41% – штучні аборти, кількість яких коливалась від 1 до 4. У 20% (6) випадків вагітність закінчилась строковими пологами, в 17% (5) випадків – передчасними пологами. Заслуговує увагу висока частота самовільних викиднів у жінок з безпліддям 28%, порівняно з контрольною групою – 10%.

Репродуктивні втрати на різних етапах внутрішньоутробного розвитку плоду не тільки характеризують існуючі порушення репродуктивної системи, вони можуть призводити до патологічних гормональних змін та виконувати психосоматичне програмування.

Структура основної гінекологічної патології у обстежених пацієнток представлена у табл. 2.9

Таблиця 2.9.

Структура гінекологічної захворюваності у обстежених пацієнток

Гінекологічна захворюваність	Основна група (n=66)		Контрольна група (n=30)	
	Кількість	%	Кількість	%
Безпліддя трубно-перитонеального генезу. Злукова хвороба	16	24	-	-
Позаматкова вагітність	28	42	-	-
Гідросальпінкс	17	26	-	-
Апоплексія яєчника	10	15	2	7
Вузлова лейоміома матки	26	39	5	17
Кесарів розтин	2	3	6	20
Хр. сальпінгоофорит	26	39	5	17
Гіперплазія, поліп ендометрія	12	18	-	-

Провідне місце в структурі гінекологічної захворюваності серед жінок основної групи посідає хронічний сальпінгоофорит у стадії ремісії в 39% (n=26), це в 2,3 рази більше порівняно з контрольною групою – 17% (n=5). Що свідчить на користь патогенезу трубноперитонеального безпліддя.

На лейоміому матки хворіють 24% основної групи, і лише 7% контрольної групи, що може пояснюватись більш старшою віковою структурою пацієнток основної групи та гормональними порушеннями з боку репродуктивної системи у жінок з безпліддям.

Ерозія шийки матки спостерігалась в анамнезі у 18% жінок з безпліддям, та у 27% здорових жінок, що може пояснюватись більш регулярними гінекологічними оглядами пацієнток основної групи. На момент обстеження у цих пацієнток не було виявлено кольпоскопічних змін епітелію шийки матки, проведене додаткове цитологічне обстеження.

Вивчення гінекологічного анамнезу та даних щодо перенесених оперативних втручань у пацієток основної групи з приводу гінекологічної захворюваності заслуговувало на особливу увагу, оскільки вид, доступ та об'єм оперативного втручання мав велике значення для розуміння патогенезу зменшення оваріального резерву у пацієток з безпліддям.

Враховуючи той факт, що одним із критеріїв відбору в основну групу був трубно-перитонеальний фактор безпліддя, були проаналізовані можливі патогенетичні фактори та причини безпліддя.

Операції з видалення маткових труб були виконані 68,2% (45) жінок основної групи, показаннями до оперативного лікування у 62,2% (28) випадків були порушена або прогресуюча позаматкова вагітність, в 37,8% (17) – гідросальпінкс, що може свідчити на користь хронічних запальних захворювань органів малого таза.

Операції на яєчниках та фолікулярному апараті були виконані 24,2% (16) основної групи. В 6 випадках мали місце радикальні операції по типу однобічних аднексектомій з приводу кістозних утворень, у 10 випадках – резекції тканини яєчника у різному обсязі. Зафіксовано 45 випадків малих гінекологічних операцій, з них 8 поліпектомій, 12 вишкрібань порожнини матки та 8 вакуумаспірацій вмісту порожнини матки з приводу штучних та самовільних абортів, 5 випадків застосування діатермокоагуляції з приводу ерозії шийки матки. Всього 37 випадків малих гінекологічних операцій.

Лікувально-діагностичні лапароскопії та реконструктивні операції з приводу відновлення прохідності маткових труб та роз'єднання злук були виконані 24,2% пацієток основної групи.

Аналізуючі обсяг хірургічного втручання та хірургічний доступ було виявлено 57 (60%) випадків хірургічних втручань ендоскопічним доступом, та 38 (40%) лапаротомним доступом.

Всього виявлено 95 випадків перенесених оперативних втручань з черевно-порожнинним доступом операцій у 66 пацієток з безпліддям, 60,6% жінок мали більше однієї перенесеної операції в анамнезі.

Перенесені гінекологічні захворювання та оперативні втручання можуть відігравати важливу роль у патогенезі трубно-перитонеального безпліддя. Враховуючи, що одним із провідних критеріїв включення пацієнток у групу дослідження був трубно-перитонеальний фактор безпліддя, підтверджений даними МСГ, аналіз об'єму та доступу оперативного втручання доповнює розуміння етіології безпліддя у цих пацієнток.

Таким чином переважна більшість пацієнток з безпліддям мали обтяжений гінекологічний анамнез, в основному за рахунок перенесених запальних, інфекційних, дисгормональних захворювань репродуктивної системи та оперативних втручань з приводу гінекологічної патології в анамнезі.

Операції на придатках матки, зокрема резекції яєчників, відіграють важливу патогенетичну роль у передчасному виснаженні оваріального резерва, втратах фолікулярного апарата та зниженні репродуктивного потенціалу.

3.2. Характеристика методів дослідження

Клінічне обстеження включало оцінку скарг, час та умови виникнення, тривалість. Вивчали анамнез життя, звертаючи увагу на спадкові хвороби, особливості репродуктивної функції у найближчих родичів. Акцентували увагу на наявності інфекційних, соматичних, ендокринних, гінекологічних захворювань у анамнезі, оперативних втручаннях та їх характері.

Вивчали характер менструальної функції: початок менархе, тривалість менструацій, регулярність та тривалість менструального циклу. Вивчали репродуктивний анамнез: кількість та особливості перебігу попередніх вагітностей (викидні та позаматкові вагітності), за їх наявності, кількість та особливості пологів, наявність ускладнень під час вагітності, у пологах та післяпологовому періоді, особливості статевого життя та методи контрацепції.

Аналізували тривалість безпліддя, провокуючі фактори, якщо пацієнтка отримувала обстеження та лікування з приводу безпліддя, то старанно збиралася інформація щодо застосування методик ДРТ у минулому, проведеного обстеження, метода лікування, призначених медикаментозних препаратів та їх ефективності, кількість спроб. За наявності стимуляції яєчників збиралася інформація щодо призначених гормонів та їх дози, кількість отриманих яйцеклітин, інформація щодо ембріотрансферу та настання вагітностей при попередніх спробах ЕКЗ. При проведенні оперативного лікування в анамнезі визначався оперативний доступ, обсяг та результат операції, наявність ускладнень у післяопераційному періоді.

Збиралася інформація про стан здоров'я чоловіка, його вік, та наявність супутніх захворювань, профшкідливостей, шкідливих звичок. За необхідністю чоловіків консультував лікар-андролог.

При об'єктивному дослідженні звертали увагу на конституційний тип, товщину та зосередження підшкірно-жирової клітковини, стан шкірних покривів та слизових оболонок, наявність акне, гірсутизму та зміни пігментації шкіри, ступінь виразності вторинних статевих ознак. Проводили

огляд та пальпацію молочних залоз. Вимірювали зріст та масу тіла, визначали ІМТ, індекс Кетле за формулою який розраховували за формулою:

$$I = \frac{m}{h^2}, \text{ де:}$$

- m — маса тіла в кг; h — зріст в м.

Гінекологічне дослідження проводилось усім пацієнткам шляхом застосування огляду в дзеркалах та бімануального вагінального дослідження. Оцінювали ступінь розвитку зовнішніх статевих органів, ємність вагіни і колір слизової оболонки, стан епітелію шийки матки. За наявності ознак запального процесу, ерозій, цервіцитів та лейкоплакій пацієнткам проводилась кольпоскопія, за необхідності призначалось лікування. Бімануально визначали положення та розміри тіла матки, рухливість та болючість при пальпації, розміри придатків матки, наявність новоутворень, чутливість склепінь піхви.

З метою визначення стану оваріального резерву вивчали наступні показники:

Визначення концентрації гонадотропінів у сироватці крові (ФСГ, ЛГ), естрадіолу (Е2) проводилось на 2–3й день менструального циклу. Забір крові проводився з ліктьової вени вранці натщесерце. Для дослідження ФСГ, ЛГ і естрадіолу використовувалась сироватка крові. Визначення рівнів естрадіолу, ЛГ, ФСГ проводилось імунофлюоресцентним методом за допомогою стандартних наборів “DELFLIA” на флюороімуному аналізаторі 1420 VIKTOR фірми “WALLAC OY” (Фінляндія).

Враховуючи те, що методи визначення антимюллерова гормону (АМГ), мелатоніну (МЛТ) та 8-ізопростану (8-ІЗП) ще недостатньо стандартизовані, наводимо детальний опис методик. Визначення концентрації АМГ у плазмі крові на 2–3й день менструального циклу проводилось імунофлюоресцентним методом за допомогою комерційних наборів фірми «IBL» на флюороімуному аналізаторі 1420 VIKTOR фірми “WALLAC OY”

(Фінляндія). Забір крові для дослідження АМГ проводився з ліктьової вени вранці натщесерце.

Визначення АМГ проводилось за принципом ферментно-підсиленого “двохсходинкового” сендвичімуноаналізу (ELISA). Стандарти, контролі та зразки плазми пацієнтів інкубувались у мікропланшетних лунках, вкритих антитілами до АМГ. Після інкубації та промивки лунок вони оброблялись біотинілірованими антитілами до АМГ, після другої інкубації та промивки додавався стрептавідин, кон’югований з пероксидазою, після третьої інкубації з наступною промивкою – інкубувались із субстратом ТМБ, потім додавався стоп-розчин, визначалась кількість перетвореного ферментом субстрату шляхом вимірювання оптичної щільності при двох довжинах хвиль 450 та 620 нм. Вимірювання ступеня поглинання було прямо пропорційним концентрації присутнього АМГ. Набір стандартів АМГ використовувався для побудування стандартної кривої поглинання, за допомогою якої розраховувались концентрації АМГ у досліджуваних зразках.

Визначення концентрації мелатоніну (МЛТ) у сироватці крові проводилось на 2-3й день менструального циклу та МЛТ у фолікулярній рідині, отриманій під час забору яйцеклітин шляхом трансвагінальної пункції. Вимірювання виконували методом ІФА за допомогою комерційних наборів Melatonin ELISA Kit, «IBL» (Німеччина) на флюороімуноному аналізаторі 1420 VIKTOR фірми “WALLAC OY” (Фінляндія).

Визначення концентрації 8-ІЗП у сироватці крові проводилось на 2-3й день менструального циклу та 8-ІЗП у фолікулярній рідині, отриманої під час забору яйцеклітин шляхом трансвагінальної пункції. Вимірювання виконували методом ІФА за допомогою комерційних наборів 8-Isoprostane ELISA Kit, IBL (Німеччина) на флюороімуноному аналізаторі 1420 VIKTOR фірми “WALLACOY” (Фінляндія).

Визначення МЛТ та 8-ІЗП проводилось за принципом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA), що є одним з найбільш часто

використовуваних методів, що застосовують для кількісного аналізу антигенів. Цей метод існує в діапазоні модифікацій, які базуються на дуже специфічній взаємодії антигену і антитіла. Відбувається ковалентне зв'язування з ферментом (зазвичай пероксидазою, ацетилхолінестеразою, або лужною фосфатазою) роль якої каталітична конверсія доданої підкладки забарвленого продукту. Інтенсивність забарвлення визначається спектрофотометричними або флюорометричними методами, які прямо або опосередковано відображають кількість антигену, присутнього у зразку. Після визначення антигену, виконується іммобілізація (за допомогою адсорбції або ковалентного зв'язування) антитіл на твердій підкладці. Іммобілізація антитіл (на планшеті для мікротитрування) дозволяє виділяти антигени (біомаркери) з біологічних матриць (плазми крові, фолікулярної рідини). Кількість невідомих визначається порівнянням ензимної активності невідомого з відповідною стандартною кривою, побудованою для відомих стандартів.

Звертає на себе увагу той факт, що загальноприйнятих нормативних значень МЛТ та 8-ізопростану в сироватці крові та фолікулярній рідині в Україні на момент початку дослідження не існувало. Нормативні значення МЛТ та 8-ізопростану в сироватці крові та фолікулярній рідині були розроблені в процесі виконання роботи. Встановлені нами значення співпадали з нормативними значеннями, які презентували інші зарубіжні автори, що досліджували ці маркери Tamura та ін.[194].

Ультразвукове дослідження органів малого таза проводилось всім пацієнткам на апаратах HDI 1500 фірми ATL, США з діапазоном частот 2–9,5 МГц та Medison ACCUVIXXQ з трансвагінальним багаточастотним датчиком.

Визначали положення та розміри тіла матки, оцінювалась структура міометрія, наявність лейоматозних вузлів, їх розміри та локалізація. Визначали величину передньо-заднього розміру М-ехо, його структуру та однорідність.

При дослідженні яєчників вимірювали їх розміри, структуру та стан фолікулярного апарату. За допомогою трансвагінального датчика на 3-4й день менструального циклу усім пацієнткам проводили визначення стану оваріального резерву. Всі вимірювання виконувалась зранку при вільному сечовому міхурі.

Для кожного яєчника при скануванні визначали об'єм яєчника, котрий визначали за формулою $0,5236 \times D1 \times D2 \times D3$, де D1 - повздовжній, D2 - передньозадній, D3 – поперечний розмір яєчника; кількість антральних фолікулів діаметром від 2 до 10 мм у кожному яєчнику; середній діаметр лідируючого фолікула $0,5 \times (a+b)$, де а і в його перпендикулярні розміри (рис 2.2.1).

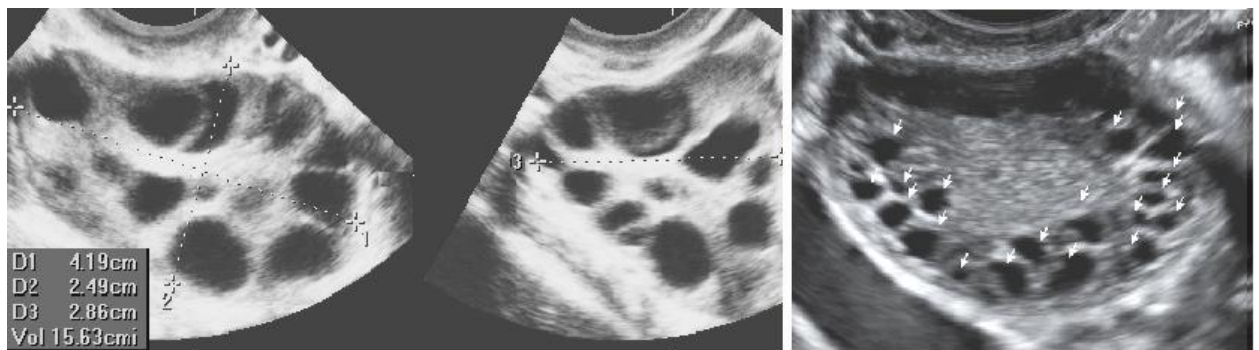


Рис. 2.2.1 Вимірювання об'єму яєчника та ЧАФ за допомогою УЗД

УЗД проводилось на етапі первинного обстеження пацієнтів, до застосування лікувальних методик щодо покращення стану оваріального резерву та контрольним обстеженням перед початком програми ЕКЗ та ПЕ.

УЗД-моніторинг проводили для оцінки динаміки росту та дозрівання фолікулів, оцінки товщини ендометрію. Спочатку на 2-3й день МЦ, надалі – протягом усього періоду стимуляції суперовуляції з інтервалом 1-3 дні.

Дозрілим фолікул вважали при розмірах 18 мм, концентрації естрадіолу в сироватці крові понад 300-400 пг/мл, із підрахунку на кожний фолікул.

Пункція фолікулів та аспірація фолікулярної рідини (забір ооцитів) виконувались в умовах малої операційної під контролем трансвагінальної ехографії через 34-35 годин після введення тригерної дози хоріонічного

гонадотропіну. Використовувались голки для аспірації ооцитів COOK (Австралія). Кількість та якість яйцеклітин, морфологічна оцінка ембріонів виконувалась в умовах ембріологічної лабораторії за допомогою мікроскопів NIKON ECLIPSE TE 2000-U (Японія), ZEISS STEMI SV (Німеччина) за шкалою, яка запропонована Erenus (1991).

За допомогою УЗД оцінювали динаміку наростання ендометрія. Усім пацієнткам, у котрих темпи росту ендометрія були знижені і не відповідали 2-4 мм в перший день КОС (2-3й день МЦ), 10-12 мм в останні дні КОС, призначали відповідну терапію.

Ембріотрансфер виконували на 2-5 добу залежно від кількості, морфологічних характеристик і темпів розвитку ембріонів. УЗД вагітності виконували на 21 день після ембріотрансферу з метою візуалізації плідного яйця в порожнині матки та жовтого тіла у яєчнику, визначення серцебиття плоду визначали у терміні вагітності 4-5 тижнів.

За необхідності УЗД інших органів та систем виконували відповідні спеціалісти з подальшим наданням лікувально-консультативної допомоги.

Обстеження на наявність інфекцій сечостатевої системи включало в себе мікроскопію мазка виділень з піхви, пофарбованого за Грамом, за необхідністю посів на середовища для виявлення збудника, ПЦР або ІФА дослідження (*Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma urealiticum*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonada vaginalis*, ЦМВ, ВПГ, ВПЛ). Оцінка стану біоценозу піхви виконувалась за допомогою спеціального дослідження Фемофлор 4,6,12.

Під час дослідження вагінального мазка, пофарбованого за Грамом, оцінювали стан піхвового епітелію (співвідношення поверхових клітин, проміжного та парабазального шару, наявність «ключових клітин»), наявність лейкоцитів, та ступінь вираженості лейкоцитарної реакції, проявів фагоцитозу, склад мікрофлори (кількісна та якісна оцінка).

Для формування поняття про стан біоценозу піхви та визначення етіологічних чинників при бактеріальному вагінозі піхви проводилось

дослідження методом ПЦР у режимі реального часу. Виконувалась комплексна кількісна оцінка мікрофлори піхви з проведенням порівнювального аналізу конкретних представників нормофлори та широкого спектра умовно-патогенних мікроорганізмів, з метою визначення дисбалансу, ступеню його вираженості та визначення етіологічної ролі в його розвитку конкретних мікроорганізмів. Визначалась загальна бактеріальна маса, кількісний склад мікрофлори піхви: нормофлора: *Lactobacillus* spp.; факультативно-анаеробні мікроорганізми: *Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp.; облігатно-анаеробні мікроорганізми: *Gardnerella vaginalis/Prevotella/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp., *Leptotrichia* spp., *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp., *Veillonella* spp., *Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp., *Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*; мікоплазми: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma* spp.; Дріжджеподібні грибки: *Candida* spp.

Для кількісної інтерпретації результатів проведеного дослідження підраховувався абсолютний показник (ДНК вихідного мікроорганізму у зразку, що виражається в геном-еквівалентах, що пропорційне кількості мікроорганізму), який залежав від техніки набору біоматеріалу та способу виділення ДНК; та відносний показник (відношення вихідного мікроорганізму до кількості загальної бактеріальної маси), показник вважався найбільш точним та об'єктивним, малочутливим до похибок у техніці щодо набору біоматеріалу і вимірювався у відсотках. Інтерпретація результатів проведеного дослідження виконувалась у декілька етапів.

Перший етап. Оцінка набору матеріалу і загальної бактеріальної маси. При недостатній кількості матеріалу рекомендувався повторний набір матеріалу. При низьких значеннях загальної бактеріальної маси у жінок репродуктивного віку, що свідчило про прийом антибактеріальних

препаратів, рекомендувалось повторне проведення дослідження не раніше 1-2 тиж. після завершення терапії.

На другому етапі проводилась оцінка нормофлори піхви, що визначалась при відносній кількості *Lactobacillus* spp. більше 80% як нормоценоз, 20-80% помірний дисбіоз, менше 20% виражений дисбіоз.

На третьому етапі проводилась оцінка кількісного співвідношення умовно-патогенних факультативно-анаеробних і облігатно-анаеробних мікроорганізмів, за умов наявності помірного та вираженого дисбіозу.

На четвертому етапі проводилась оцінка наявності мікоплазм і грибків роду *Candida* згідно до абсолютних показників. Пороговими діагностичними рівнями вважали 10^5 геном-еквівалентів для *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp. та 10^4 геном-еквівалентів для грибків роду *Candida*. *Mycoplasma genitalium* визначалась якісним методом та вважалась абсолютним патогеном.

Якісне визначення антигену *Chlamydia* в ендоцервікальних пробах у жінок виконували методом ІФА за допомогою тест-систем фірми «Sanoli Diagnostics Pasteur». Ідентифікацію та якісну оцінку уrogenітальних мікоплазм проводили культуральною методикою за допомогою тест-систем фірми «Sanoli Diagnostics Pasteur». Забір матеріалу проводили із цервікального каналу спеціальним шпателем на глибині 1 см, попередньо звільнив цервікс від слизу. Після забору шпатель розташовували в стерильній пробірці з середовищем для транспортування.

Визначення вірусоспецифічних антитіл класу IgG и IgM до цитомегаловірусу (ЦМВ) у сироватці крові визначали за допомогою методу непрямого імуноферментного аналізу згідно з прикладеними інструкціями. Використовували тест систему фірми «HoffmannLaRoche» (Швейцарія) «Анти-ЦМВ IgG ИФА ДИА-плюс»

Визначення вірусоспецифічних антитіл серотипів I та II до Herpes Simplex virus (анти-HSV) у сироватці крові здійснювали за допомогою методу непрямого імуноферментного аналізу згідно з прикладеними інструкціями. Використовували тест-систему фірми «HoffmannLaRoche» (Швейцарія).

У крові пацієнток визначали наявність підгострих та гострих форм інфекцій, що входять в TORCH-комплекс, та можуть впливають на процес запліднення, виношування вагітності та розвиток плоду: токсоплазми (*Toxoplasma gondii*), краснухи (*Rubella virus*), цитомегалавірусу (*Cytomegalovirus*) и вірусу простого герпесу (*Herpes simplex virus*).

Відсутність інфекцій, що входять до складу TORCH-комплексу, а також сифілісу, гонореї, гепатиту, було обов'язковою умовою до включення пацієнток до програми ЕКЗ або ІКСІ. Інфікування гарднерелою та кандідою визначали по результатам обстеження Фемофлор -16.

За наявності інфікування пацієнткам або подружній парі призначали попереднє лікування з обов'язковими контрольними аналізами перед проведенням програм ДРТ.

Статистична обробка даних

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили методами варіаційної статистики. Для кожного варіаційного ряду розраховували середню арифметичну (M), середнє квадратичне відхилення (σ), середню помилку середньої арифметичної (m). Для наступного аналізу результатів дослідження використовувалися методи параметричної й непараметричної статистики. Кількісний і якісний аналіз внутрішньосистемних і міжсистемних кореляційних зв'язків проводився з використанням методу кореляційних структур [28, 51, 70].

Розрахунки кореляцій виконано за Пірсоном. Позитивне значення коефіцієнта кореляції вказувало на прямий зв'язок між ознаками, тобто зростання числових величин однієї ознаки супроводжувалося підвищенням числових величин іншої. Негативне значення коефіцієнта вказувало на зворотну залежність, коли числові величини другої ознаки зменшувалися зі зростанням значень першої. Оцінку сили кореляції виконували відповідно до наступної схеми: від 0 до 0,1 – кореляційний зв'язок відсутній; від 0,2 до 0,3 – слабкий; від 0,4 до 0,6 – помірний; від 0,7 до 1,0 – виражений. Оцінка вірогідності різниць середніх величин в групах (p) проводилася за допомогою критерію Стюдента (t). Різниця вважалася вірогідною при значенні $p < 0,05$.

Статистичну обробку матеріалів дослідження проводили з використанням програми «Statistica 6.0» [51].

РОЗДІЛ 3

ОЦІНКА СТАНУ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ У ЖІНОК З НИЗЬКИМ ОВАРІАЛЬНИМ РЕЗЕРВОМ

Одним з головних і визначальних факторів високої результативності програм ДРТ є ефективна оваріальна стимуляція і отримання достатньої кількості зрілих ооцитів, яка значно погіршується за наявності порушень з боку оваріального резерву. Вікове виснаження фолікулярного апарату, перенесені оперативні втручання на яєчниках призводять до формування когорти хворих на безпліддя жінок з низьким оваріальним резервом, стан якого потребує точної і функціональної оцінки. Тести визначення оваріального резерву дозволяють точно виміряти ступінь розвитку початкового фолікулярного пула (безпосередньо оваріальний резерв) і оцінити репродуктивний потенціал та своєчасно застосувати корегуючу терапію, направлену на покращення оваріальної відповіді. Доповнення тестів ОР новими методиками дозволить сформувати уявлення не тільки про стан ОР, але й прогнозування оваріальної відповіді на КОС з більшою вірогідністю. Оцінка стану ОР у нашому дослідженні проводилась за допомогою вимірювання наступних параметрів: ЧАФ, АМГ, об'єму яєчників та рівнів ФСГ.

Сумарна кількість антральних фолікулів в обох яєчниках жінок з безпліддям коливалась від 3 до 15, середній показник складав $6,53 \pm 2,64$. У здорових жінок контрольної групи ЧАФ коливалось від 10 до 35, середній показник вірогідно відрізнявся від основної групи і складав $19,97 \pm 7,26$ ($p < 0,01$). Мінімальне ЧАФ серед пацієток основної групи зустрічалось в 5 (9%) випадках, і не зустрічалось у здорових жінок. Знижене ЧАФ 5 – 7 серед пацієток з безпліддям зустрічалось в 36 (51%) випадках, і також не зустрічалось у здорових жінок. Помірне ЧАФ 8 – 10 було визначене в 19 (26%) випадках основної групи і вірогідно відрізнялося від контрольної групи - 3 (10%) випадки ($p < 0,05$). Нормальне ЧАФ – більше 11,

спостерігалось лише в 14% жінок з безпліддям, порівняно з 90% жінок у контрольній групі ($p < 0,01$). Таким чином більше половини (51%) жінок з безпліддям мали знижене ЧАФ, яке коливалось від 5 до 7, що відповідає Болонським критеріям «поганих відповідачів». Більшість здорових жінок (90%) мали ЧАФ понад 11. На окрему увагу заслуговують пацієнтки з перенесеною однобічною аднексектомією ($n=4$), ЧАФ у єдиному яєчнику коливалось від 7 до 10, що спонукало пацієнток до спроб отримання власного ооцита в програмі ДРТ. Пацієнткам з ЧАФ 0 – 3 попередньо була рекомендована програма донорства ооциту, вони не брали участь у дослідженні, враховуючи вкрай високий ризик невдалих спроб в програмах ДРТ. Згідно з запропонованою методикою, підраховували об'єм правого та лівого яєчника у жінок з безпліддям та у здорових жінок у ранню фолікулярну фазу. В табл. 3.1 наведені середні значення ($M \pm \sigma$) об'єму яєчників та ЧАФ досліджуваних груп. Наглядно проілюстровано відсутність достовірних відмінностей серед показників об'єму яєчника у пацієнток основної та контрольної групи ($p \geq 0,05$), та вірогідну різницю в ЧАФ між пацієнтками основної групи та контрольної групи ($p < 0,01$). Звертає на себе увагу відсутність вірогідної різниці між I та II групою, що свідчить про однорідність основної групи за даним показником.

Таблиця 3.1.

Середні показники об'єму яєчника та ЧАФ у обстежених пацієнток

Показник	Основна група		Контрольна група ($n=30$)
	I підгрупа ($n=33$)	II підгрупа ($n=33$)	
Об'єм ПЯ (см^3)	$4,47 \pm 1,95$	$4,18 \pm 1,49$	$5,74 \pm 1,22$
Об'єм ЛЯ (см^3)	$5,22 \pm 2,94$	$5,13 \pm 2,61$	$6,39 \pm 1,56$
Середній об'єм (см^3)	$5,01 \pm 2,10$	$4,76 \pm 1,72$	$6,06 \pm 1,13$
ЧАФ	$6,88 \pm 2,06^*$	$7,36 \pm 2,64^*$	$19,97 \pm 7,26$

Примітка.* – $p < 0,05$ значима достовірність відмінностей показників з контролем.

Середні показники об'єму яєчника значно не відрізнялися в І та ІІ групі і складали $5,01 \pm 2,10 \text{ см}^3$ та $4,76 \pm 1,72 \text{ см}^3$ відповідно. Звертають на себе увагу дещо нижчий об'єм яєчників у пацієнток основної групи, порівняно з контрольною групою, що може пояснюватися перенесеними оперативними втручаннями за типом резекції яєчників та видалення кістозних утворень в анамнезі пацієнток з безпліддям.

Оцінка функціонування репродуктивної системи (табл. 3.3) проводилась за рахунок визначення таких гормональних показників як пролактин (ПРЛ), тестостерон (Т), кортизон (К) естрадіол (Е2), лютеїнізуючий гормон (ЛГ), фолікулостимулюючий гормон (ФСГ), та антимюллерів гормон (АМГ) у ранню фолікулярну фазу, окрім прогестерону (П), який визначався в лютеїновій фазі.

Рівні АМГ в основній групі коливались від 0,1 до 1,2 нг/мл, в контрольній групі від 1,2 до 2,5 нг/мл. Середній рівень АМГ у безплідних жінок з НОР $0,53 \pm 0,04 \text{ нг/мл}$ був в 3 рази нижче, порівняно зі здоровими жінками-донорами $1,85 \pm 0,07 \text{ нг/мл}$ ($p < 0,01$). Середній рівень АМГ в І групі складав $0,48 \pm 0,05 \text{ нг/мл}$, вірогідно не відрізнялися від середнього показника АМГ в ІІ групі, який складав $0,59 \pm 0,06 \text{ нг/мл}$, що свідчить на користь однорідності поділу основної групи за даним показником.

Рівень ФСГ в основній групі мав широкі коливання від 3,5 до 21 мМО/мл, середній показник складав $10,66 \pm 3,73 \text{ мМО/мл}$, що мало вірогідну різницю з контрольною групою, в якій рівень ФСГ мав меншу амплітуду коливання від 2,4 до 9,6 мМО/мл і в середньому складав $5,95 \pm 1,58 \text{ мМО/мл}$, що було в 2 рази нижче, ніж у жінок з безпліддям ($p < 0,05$). Середній показник ФСГ не мав статистично значущої різниці між пацієнтами з безпліддям І та ІІ групи.

Таблиця 3.2

Оцінка гормональних показників функціонування репродуктивної системи у обстежених груп

Показник	Основна група		Контрольна група (n= 30)
	I підгрупа (n= 33)	II підгрупа (n= 33)	
Пролактин, мМО/мл	339,23±15,94*	283,82±19,27*	246,07±11,80
Прогестерон, нмоль/л	18,36±6,65*	24,15±8,41*	34,89±9,65
Тестостерон, нмоль/л	1,74±0,59*	1,69±0,62*	1,39±0,45
Естрадіол, пг/мл	39,98±16,59*	38,49±17,85*	23,50±7,15
Кортизол, нмоль/л	366,88±97,59*	289,39±22,48	278,50±66,73
ЛГ, мМО/мл	6,48±2,20	6,02±2,92	6,53±1,34
ФСГ, мМО/мл	11,29±3,55*	10,04±3,84*	5,95±1,58
АМГ, нг/мл	0,48±0,05*	0,59±0,06*	1,85±0,07

Примітка.* – $p < 0,05$ значима достовірність відмінностей показників з контролем.

Рівні ЛГ у жінок з безпліддям коливались у межах нормативних значень від 2,3 до 11,9 мМО/мл, середній показник у I групі складав $6,48 \pm 2,20$ мМО/мл, у II групі $6,02 \pm 2,92$ мМО/мл. В контрольній групі рівень ЛГ коливався від 2,8 до 7,8 мМО/мл, середнє значення складало $6,53 \pm 1,34$ мМО/мл. Не знайдено статистично значущих відмінностей між середніми показниками ЛГ в основній та контрольній групах.

Стандарне відношення ЛГ / ФСГ = 1-1,5 у ранню фолікулярну фазу, спостерігалось лише у 24,2% (n=16) жінок основної групи та у 83,3% (n=25) жінок контрольної групи. Порушення відношення ЛГ / ФСГ у пацієток основної групи відбувалося за рахунок високих концентрацій ФСГ у жінок

пізнього репродуктивного віку, та характеризувало порушення з боку оваріального резерву (табл. 3.5).

Базальні рівні естрадіолу в основній групі коливались від 16,29 до 87,30 пг/мл, у середньому складали $39,98 \pm 16,59$ пг/мл в I групі та $38,49 \pm 17,85$ пг/мл в II групі, і вірогідно відрізнялись від середніх показників E2 у контрольній групі $23,50 \pm 7,15$ пг/мл ($p < 0,01$). Високі рівні E2 мали позитивні кореляційні зв'язки з віком, які представлені у табл.3.5.

Рівень ПРЛ у хворих на безпліддя жінок коливався від 145 до 507 мМО/мл. Високі рівні ПРЛ були зафіксовані в I групі $339,23 \pm 15,94$ мМО/мл, порівняно зі здоровими жінками в контрольній групі $246,07 \pm 11,80$ мМО/мл, де рівні ПРЛ коливались від 132 до 360 мМО/мл ($p < 0,05$).

Рівні тестостерону у жінок з безпліддям основної групи коливались від 0,3 до 3,9 нмоль/л та в 15 (22,7%) випадках перевищували нормативні значення (0,2-1,8 нмоль/л), проте середній показник складав $1,71 \pm 0,6$ нмоль/л і вірогідно не відрізнявся від середнього показника контрольної групи $1,39 \pm 0,45$ нмоль/л. Рівні тестостерону у здорових жінок контрольної групи коливались від 0,4 до 2,3 нмоль/л і також спостерігалась тенденція до помірного підвищення рівню тестостерону в 5 (16,6%) випадках.

Середні рівні кортизолу були вищими у пацієнток з безпліддям в I групі $366,88 \pm 97,59$ нмоль/л, порівняно з контрольною групою $278,50 \pm 66,73$ нмоль/л ($p < 0,05$), проте не перевищували нормативні значення в популяції.

Таблиця 3.3.

Кореляційні залежності між рівнями гормонів репродуктивної системи у жінок з безпліддям

Показники	ПРЛ	П	Т	Е2	К	ЛГ	ФСГ	АМГ
ПРЛ	—	±±	±	—	—	±±	±±	±
П	±±	—	±	±	—	±±	±±	—
Т	—	—	—	—	±	±	±	—
Е2	±	±	—	—	—	±	±±	—
К	±	—	±	—	—	±	—	—
ЛГ	±	±	—	±	—	—	±	±
ФСГ	±±	±	—	±±	—	±±	—	±±
АМГ	±	±	±	±	±	±	±±	—

Примітки. ±± – значуща кореляція на рівні $p < 0,01$; ± – значуща кореляція на рівні $p < 0,05$; «—» – кореляція не значима або відсутня.

Аналіз гормональних показників функціонування репродуктивної системи, який подано в табл. 3.2, виявив статистично значущі відмінності між середніми показниками ФСГ, АМГ, ЛГ, ПРЛ, прогестерону та естрадіолу у жінок основної та контрольної групи, що пояснюється, в першу чергу, наявністю порушень з боку репродуктивної системи у пацієнток основної групи, що є характерним для клінічного перебігу безпліддя. Варто зауважити, що простежувались певні кореляційні зв'язки не тільки між гормональними показниками (табл.3.3), але й між гормональними показниками та віком жінки (Рис. 3.1). Сильну кореляційну залежність було виявлено з показниками ФСГ, АМГ, ЛГ, Е2 у жінок старше 33 років.

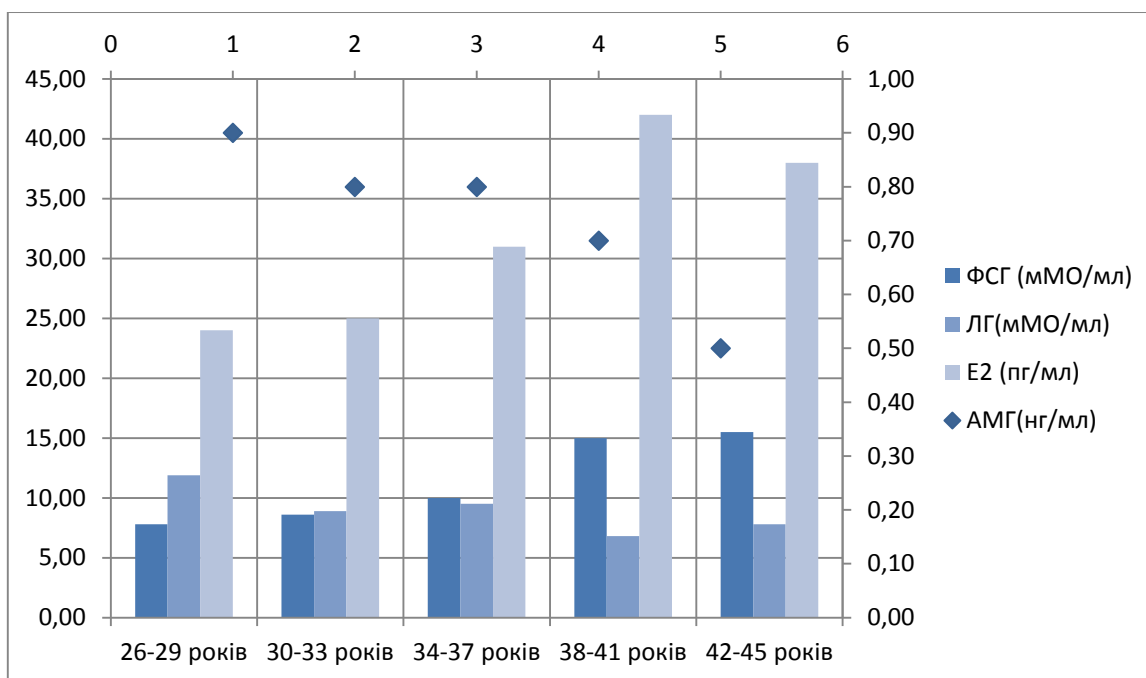


Рис. 3.1. Рівень гормональних показників функціонування репродуктивної системи залежно від вікових діапазонів у пацієток з безпліддям.

Помітне підвищення рівня ФСГ починається у пацієток після 33 років, зокрема, у жінок з безпліддям у вікових діапазонах 34-37 років, 38-41 рік та 42-45 років. Вияняток з правила становили 6% жінок з безпліддям, у яких незважаючи на пізній репродуктивний вік ≥ 33 років спостерігались низькі рівні ФСГ < 8 мМО/мл, високі базальні рівні E2 ≥ 35 пг/мл, низькі рівні АМГ $< 1,0$ нг/мл, які свідчили на користь зниженого оваріального резерву. Можливе пояснення базується на тому, що підвищена концентрація естрадіолу при нормальному рівні ФСГ є показником раннього дозрівання фолікула, яке може відбуватися в результаті передчасного підвищення рівня ФСГ в лютеїнову фазу. Естрогени, що виділилися у великій кількості, за принципом негативного зворотного зв'язку пригнічують секрецію ФСГ, таким чином маскуючи ФСГ-статус пацієнтки. Чітко простежується тенденція до зростання естрадіолу у пацієток віком 38-41 років.

Рівні ЛГ мають слабкий кореляційний зв'язок відносно до вікових змін. Наглядно спостерігається втрата фізіологічного відношення ЛГ/ФСГ на рубежі 33 та 37 років, коли коефіцієнт співвідношення прагне до нульового значення.

Рівні АМГ мають чітку тенденцію до зниження у старших вікових групах. Мінімальні значення АМГ спостерігались у жінок після 40 років, проте існувало 7,5 % (n=5) виключень, коли у жінок з безпліддям старшої вікової групи 38-41 років (n=3) та 42-45 років (n=2), спостерігались відносно високі рівні АМГ від 0,9 до 1,1 нг/мл, що свідчило на користь збереженого оваріального резерву та позитивно корелювало з високим ЧАФ у цих пацієнток.

Для доповнення уявлення про гормональну ланку функціонування репродуктивної системи та виключення супутньої ендокринної патології детально досліджувалась функція щитоподібної залози за допомогою наступних показників: тиреотропного гормону (ТТГ), загального та вільного тироксину (Т4), загального та вільного трийодтироніну (Т3), та антитіл до тиреопероксидази (ТПО). Гормональні показники, що характеризували стан щитоподібної залози представлені у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4.

Показники функції щитоподібної залози у обстежених жінок

Показник	Основна група		Контрольна група (n= 30)
	I підгрупа (n= 33)	II підгрупа (n= 33)	
ТТГ, мкМО/мл	2,11±0,56* (n= 22)	1,93±0,78 (n= 23)	1,63±0,98 (n= 23)
Т4 загальний, нмоль/л	98,13±13,98* (n= 20)	108,31±20,82* (n= 20)	120,88±19,65 (n= 20)
Т4 вільний, пмоль/л	15,15±2,75 (n= 23)	14,02±2,68 (n= 23)	15,89±3,11 (n= 21)
Т3 загальний, нмоль/л	1,53±0,23* (n= 23)	1,56±0,37* (n= 23)	2,11±0,88 (n= 23)
Т3 вільний, пг/мл	1,25±0,77* (n= 23)	1,76±0,49* (n= 21)	2,08±0,67 (n= 23)
Антитіла до ТПО мО/мл	10,71±2,67 (n= 23)	11,98±3,88* (n= 21)	9,89±3,11 (n= 23)

Примітка. * – p<0,05 достовірність відмінностей показників з контролем

Оцінка функції щитоподібної залози за допомогою вищезгаданих маркерів не виявила вірогідних відмінностей між групами дослідження та

контролю. Середній вміст тиреоїдних гормонів не відрізнявся від нормативного інтервалу значень у загальній популяції.

Резюме

Таким чином, оцінка стану ОР за допомогою ОРТ полягає у визначенні вікових, анамнестичних, клінічних, інструментальних та гормональних особливостей. Показниками, що свідчать на користь зниження ОР є пізній репродуктивний вік жінки, вкорочення менструального циклу, операції на яєчниках. Однак загально-клінічні методи оцінки характеризуються низькою специфічністю, тому на підставі їх аналізу практично неможливо створити патогенетично обумовлений прогностичний алгоритм оваріальної відповіді в програмах ДРТ. Більш інформативними є лабораторні методи діагностики.

На цей час запропоновано багато лабораторних методів оцінки стану ОР, однак рівень їх інформативності та доступності у жінок з НОР не завжди достатній. Рівень доказовості традиційних методів дослідження, зокрема гормональних показників, які найбільш широко розповсюджені, недостатній. Найбільшою інформативністю характеризується метод визначення ЧАФ.

Вищевикладене свідчить про перспективність розробки нового методу патогенетичної оцінки стану ОР та прогнозування НВЯ.

Розділ 4

ОЦІНКА МАРКЕРІВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ У ЖІНОК З БЕЗПЛІДДЯМ В ПРОГРАМАХ ДРТ

Відомо, що в патогенезі НВЯ мають місце загальні окисні реакції організму різного ступеня вираженості у відповідь на безпосередню дію ОС під час стимуляції ГТ. Патофізіологічні процеси, що при цьому виникають, у тому числі в фолікулярній рідині, можуть виступати в якості основної патогенетичної ланки зниження оваріальної відповіді на КОС в програмах ДРТ. Вивчення цієї проблеми дозволить не тільки розкрити невідомі раніше сторони патогенезу НВЯ окисної етіології, але й визначити нові однотипні підходи до ведення цієї категорії хворих та розширити можливості лікувального впливу на патологічний процес у цих пацієнтів.

Поряд із дослідженням гормональних показників функціонування репродуктивної системи в сироватці крові були визначені діагностичні властивості показників, що маркують рівень ОС під час дозрівання ооциту – вміст мелатоніну та 8-ізопростану, що є одним із ключових ферментів ефекторного ланцюга окисних процесів в фолікулярній рідині.

4.1. Діагностичні властивості маркерів ОС мелатоніну та 8-ізопростану в сироватці крові в програмах ДРТ

Досліджувану основну групу склали 66 хворих на безпліддя жінок з НОР, очікуваних «поганих відповідачів» відповідно до Болонських критеріїв. Трубно-перитонеальний генез безпліддя був підтверджений за допомогою МСГ. Контрольну групу склали 30 здорових жінок репродуктивного віку, донорів яйцеклітин.

Перед початком протоколу КОС поряд зі стандартним обстеженням на рівні гормонів, були визначені показники МЛТ та 8-ізопростану в сироватці крові за вищеописаними методиками (табл. 4.1.1).

Таблиця 4.1.1

Середні показники вмісту мелатоніну та 8-ізопростану
у сироватці крові у обстежених жінок на старті КОС

Показник	Основна група (n=66)	Контрольна група (n=30)
Мелатонін, пг/мл	21,60±4,77*	37,55±6,65
8-ізопростан, пг/мл	66,87±10,51*	44,61±13,96

Примітка.* – $p < 0,001$ значима достовірність відмінностей показників з контролем.

Рівні мелатоніну в сироватці крові пацієнток з безпліддям коливались від 14,80 до 35,04 пг/мл, середнє значення складало 21,60±4,77 пг/мл, медіана і мода складала 19,44 і 19,08, відповідно, що свідчить про відносно симетричний розподіл даних. У контрольній групі рівні мелатоніну коливались від 18,10 до 47,36 пг/мл, середній показник складав 37,55±6,65, що в 1,73 рази перевищувало показники основної групи ($p < 0,001$).

Індивідуальний інтервал вмісту 8-ізопростану в сироватці крові обстежених жінок в основній групі коливався від 32,27 до 81,34 пг/мл, середній показник і медіана складала 66,87±10,51 пг/мл та 67,47 пг/мл відповідно і в 1,5 рази перевищували показники контрольної групи ($p < 0,001$).

На рис. 4.1.1 подані результати розподілу значень МЛТ у жінок з безпліддям та в контрольній групі. Як видно, обидва розподіли є нормальними. В контрольній групі мода відповідає інтервалу значень показника 30-40 пг/мл, а у хворих на безпліддя жінок – 15-25 пг/мл. При цьому у хворих на безпліддя жінок мода розподілу зміщена ліворуч, тобто в ділянку нижчих значень показників.

Крім цього, розподіли значень в обох групах є нормальними, а ділянка перехрещення розподілів стосується інтервалу значень МЛТ від 20 до 35 пг/мл. У цьому зв'язку для визначення діагностичної чутливості та специфічності вмісту МЛТ у сироватці крові були проаналізовані його інтервальні значення у хворих на безпліддя жінок та в контрольній групі.

Діапазон показників МЛТ у сироватці крові від 30 до 40 пг/мл був специфічним для контролю, тому що значення 30-40 пг/мл були виявлені у 50% осіб контрольної групи. При цьому, цей спектр показників не визначався серед хворих на безпліддя жінок ($p < 0,001$) (табл. 4.1.2).

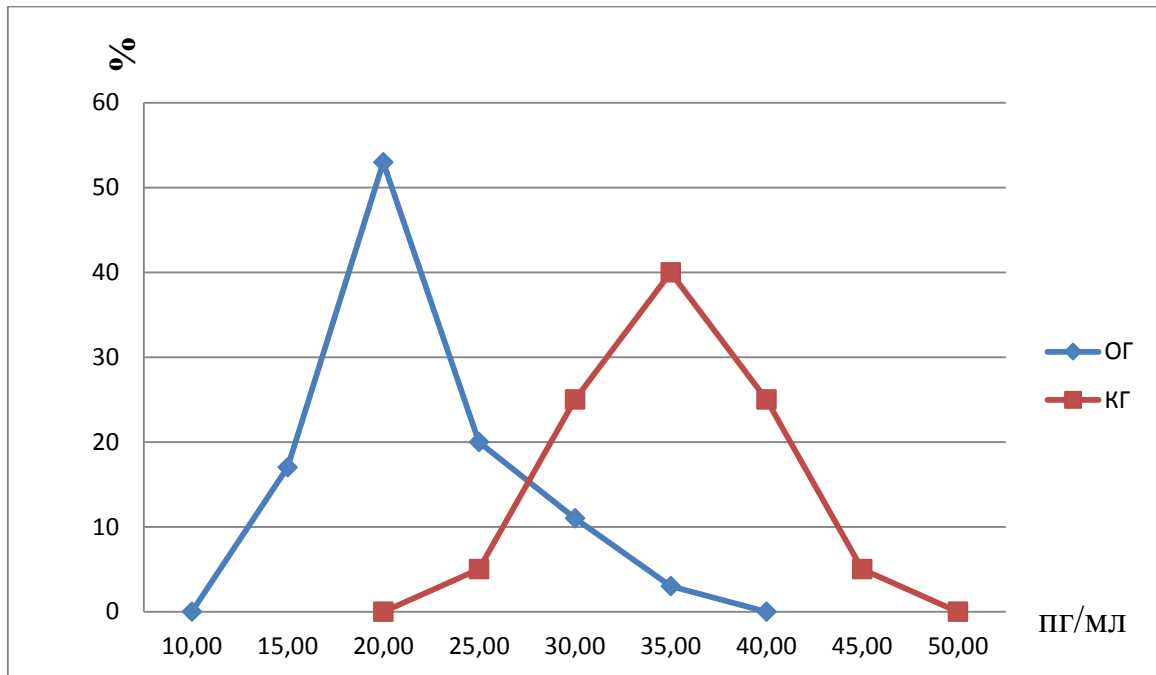


Рис. 4.1.1 Характеристика розподілів значень МЛТ у сироватці крові у обстежених груп.

Інтервал значень МЛТ від 30 пг/мл до 40 пг/мл виявився відносно специфічним для контролю, тому що в 5 разів частіше визначався серед осіб контрольної групи (відповідно в 70% і 13%; $p < 0,001$). Значення МЛТ в сироватці крові < 25 пг/мл були специфічними для хворих на безпліддя жінок з НОР. Вони визначалися у 87% хворих і майже не виявлялися в контрольній групі (7%; $p < 0,001$).

Таблиця 4.1.2

Характеристика рівнів МЛТ у сироватці крові у обстежених пацієнток

Значення показника, нг/мл	Основна група (n=66)		Контрольна група (n=30)		Р
	абс.	%	абс.	%	
14-19	11	17	0	0	<0,001
20-24	33	50	2	7	<0,001
25-29	13	20	5	16	<0,001
30-34	8	11	11	40	<0,001
35-39	1	2	10	30	<0,001
40-47	0	0	2	7	<0,001

Примітка. $p < 0,001$ – значима достовірність відмінностей показників з контролем.

На підставі даних табл. 4.1.1 була визначена діагностична чутливість і специфічність МЛТ в сироватці крові жінок, хворих на безпліддя з НОР. Діагностична чутливість мала значення 87%, а специфічність 73%.

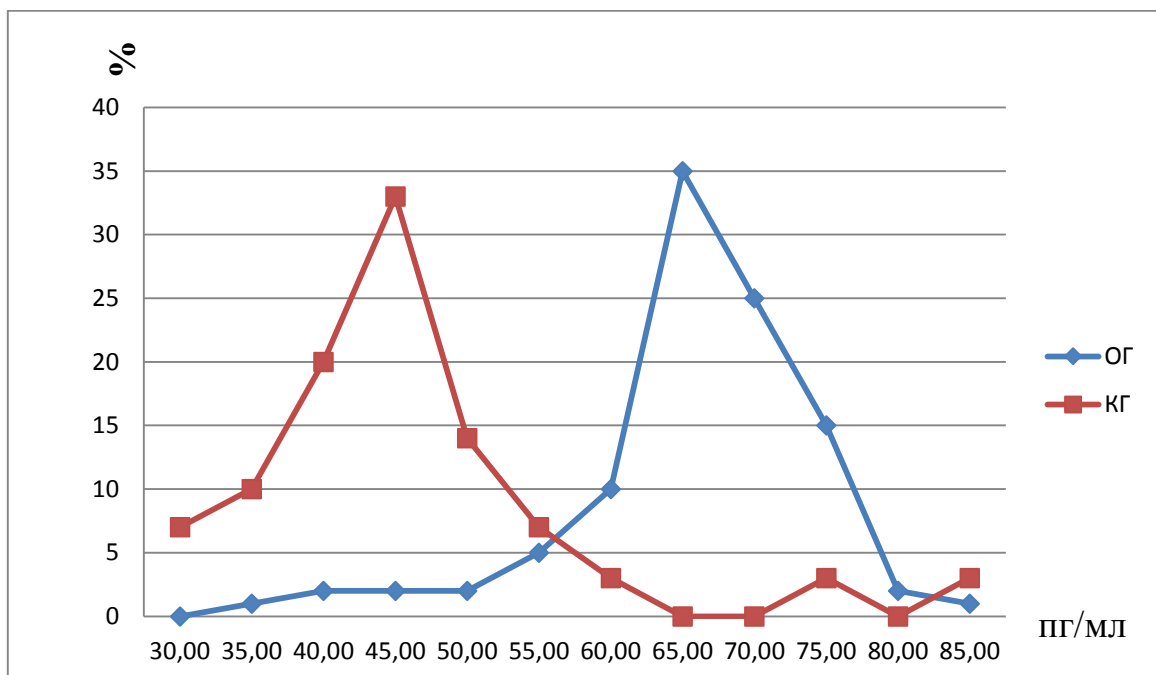


Рис. 4.1.2. Характеристика розподілів значень 8-ІЗП в сироватці крові у обстежених груп

На Рис. 4.1.2 відображені результати розподілу значень 8-ІЗП у жінок основної та контрольної груп. Як видно, обидва розподіли є нормальними. В контрольній групі мода відповідає інтервалу значень показника 40-50 пг/мл, а у хворих на безпліддя жінок – 60-70 пг/мл. При цьому у хворих на безпліддя жінок мода розподілу зміщена праворуч, тобто в область більш високих значень. Крім цього, розподіли значень в обох групах є нормальними, а область перехрещення розподілів стосується інтервалу значень 8-ІЗП від 50 до 65 пг/мл. У цьому зв'язку для визначення діагностичної чутливості та специфічності вмісту 8-ІЗП в сироватці крові були проаналізовані його інтервальні значення у хворих на безпліддя жінок та в контрольній групі.

Діапазон показників 8-ІЗП в сироватці крові від 30 до 49 пг/мл був специфічним для контролю, тому що значення 40-49 пг/мл були виявлені у 50% осіб контрольної групи. При цьому, цей спектр показників майже не визначався серед хворих на безпліддя жінок (9%; $p < 0,001$) (табл. 4.1.2).

На підставі даних табл. 4.1.1 була визначена діагностична чутливість і специфічність 8-ІЗП в сироватці крові жінок з НОР. Діагностична чутливість складала 90%, а специфічність 81%.

Таблиця 4.1.2

Характеристика рівнів 8-ІЗП у сироватці крові у обстежених груп

Значення показника, нг/мл	Основна група (n=66)		Контрольна група (n=30)		P
	абс.	%	абс.	%	
30-39	2	3	5	17	<0,001
40-49	4	6	15	50	<0,001
50-59	9	14	7	21	<0,001
60-69	26	39	1	3	<0,001
70-79	21	32	1	3	<0,001
80-85	4	6	1	3	<0,001

Примітка. $p < 0,001$ – значима достовірність відмінностей показників з контролем.

Аналізуючі показники МЛТ та 8-ІЗП в сироватці крові у жінок з безпліддям і здорових жінок-донорів, визначено, що більш високі показники МЛТ ($37,55 \pm 6,65$), які відповідають за антиоксидантний захист, частіше зустрічаються в контрольній групі, порівняно з основною групою ($21,60 \pm 4,77$), $p < 0,001$, а більш високі значення 8-ІЗП ($66,87 \pm 10,51$), які свідчать про рівень ОС, спостерігаються у жінок з безпліддям, порівняно зі здоровими жінками контрольної групи ($44,61 \pm 13,96$), $p < 0,001$. Це може бути пов'язано не тільки з особливістю перебігу основного захворювання у жінок з безпліддям, але і з різницею в віковій структурі між цими групами.

Віковий склад основної групи коливався від 24 до 45 років, середній вік складав $36,00 \pm 4,86$ років, медіана знаходилась на рівні 36 років, в контрольній групі коливався від 23 до 35, середній вік складав $28,67 \pm 2,61$ років, медіана знаходилась на рівні 28 років (табл.4.1.3). Вікова структура пацієнток основної групи відрізнялась від вікової структури пацієнток контрольної групи, за рахунок домінантного вікового інтервалу на рівні 30-40 років, в якому знаходилось більше 80% пацієнток з безпліддям.

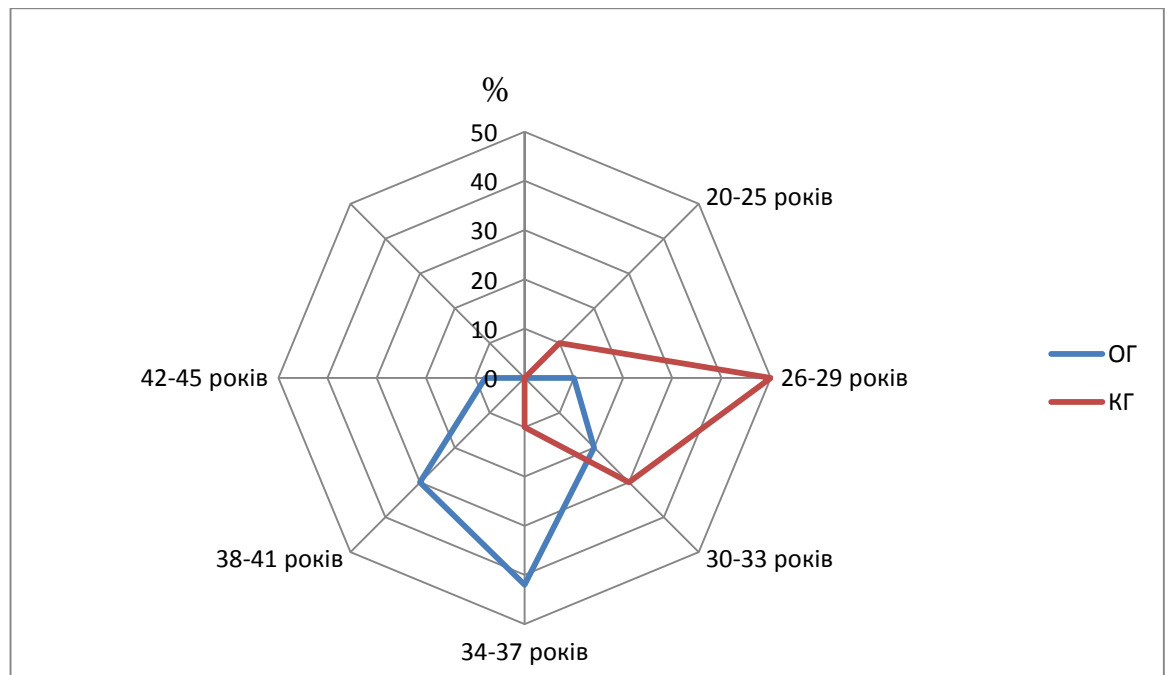


Рис. 4.1.3. Характеристика розподілів вікових значень у обстежених груп

Крім цього, розподіли значень в обох групах є нормальними, а область перехрещення розподілів стосується інтервалу вікових зачень від 26 до 37 років, у якому знаходяться 50% пацієнток основної групи і 38% пацієнток контрольної групи (рис. 4.3). Цей інтервал дозволяє порівнювати кількісні показники між досліджуваними групами.

Звертає на себе увагу тенденція розподілу маркерів ОС всередині досліджуваних груп згідно до вікових діапазонів (рис.4.1.4). Аналізуючи вміст МЛТ в сироватці крові у пацієнток з безпліддям була визначена тенденція до зниження цього показника з віком. Так у пацієнток вікового діапазону 20-25 років середні рівні МЛТ складала $27,51 \pm 3,8$ пг/мл, тоді як у пацієнток 42-45 років середній показник складав $22,87 \pm 2,28$ пг/мл ($p < 0,05$).

Середні рівні 8-ІЗП мали тенденції до підвищення показників у більш старших вікових групах. Так у пацієнток 20-25 років середні рівні 8-ІЗП були вірогідно вищими і складала $43,47 \pm 6,4$ пг/мл порівняно жінками 42-45 років $61,43 \pm 8,4$ пг/мл, де рівні 8-ІЗП були максимальними ($p < 0,05$). Аналіз залежностей у системі МЛТ – 8-ІЗП визначив зворотній кореляційний зв'язок між показниками.

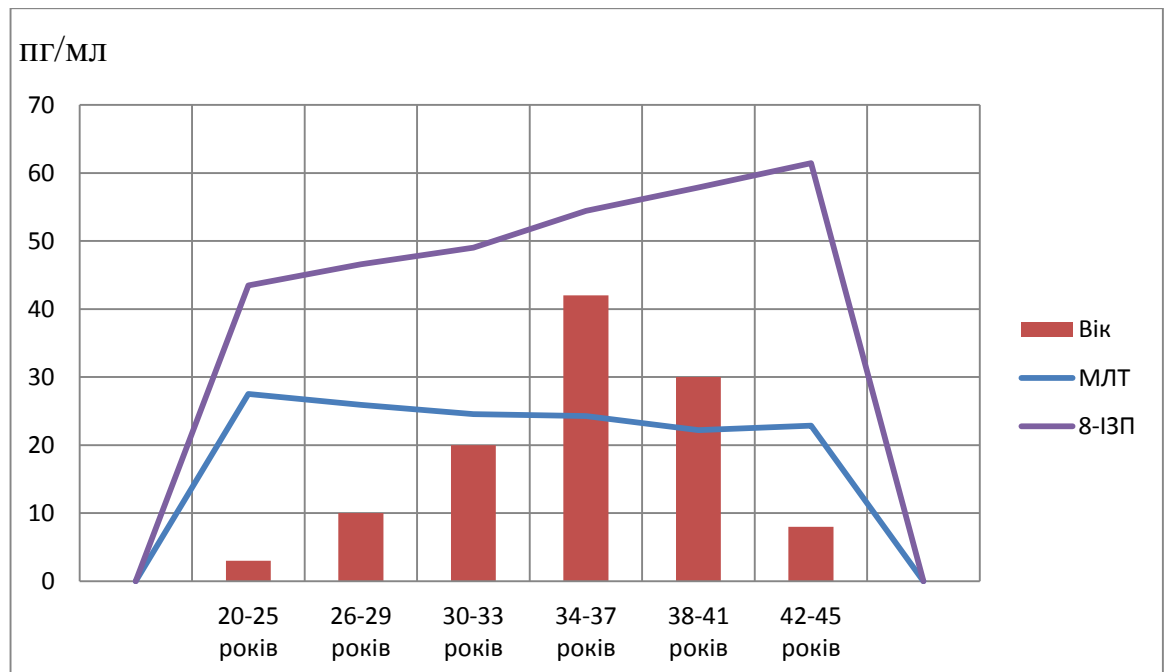


Рис. 4.1.4. Розподіл маркерів ОС відповідно до вікових діапазонів у пацієнток з безпліддям основної групи

Враховуючи різницю вікової структури пацієток основної та контрольної групи, було проаналізовано залежність маркерів ОС відносно вікових діапазонів у здорових жінок.

Зниження вмісту МЛТ спостерігається після 30-33 років, порівняно з більш молодшими групами (рис. 4.1.4). Проте середні рівні МЛТ залишаються вірогідно вищими $33,77 \pm 4,5$ пг/мл, порівняно з пацієтками з безпліддям – $19,86 \pm 3,8$ нг/мл ($p < 0,01$) (рис. 4.5). Дослідження не виявило вірогідного зниження 8-ІЗП з віком, це пояснюється більш молодшою структурою пацієток контрольної групи, що не дозволяє відстежити дану тенденцію у жінок-донорів.

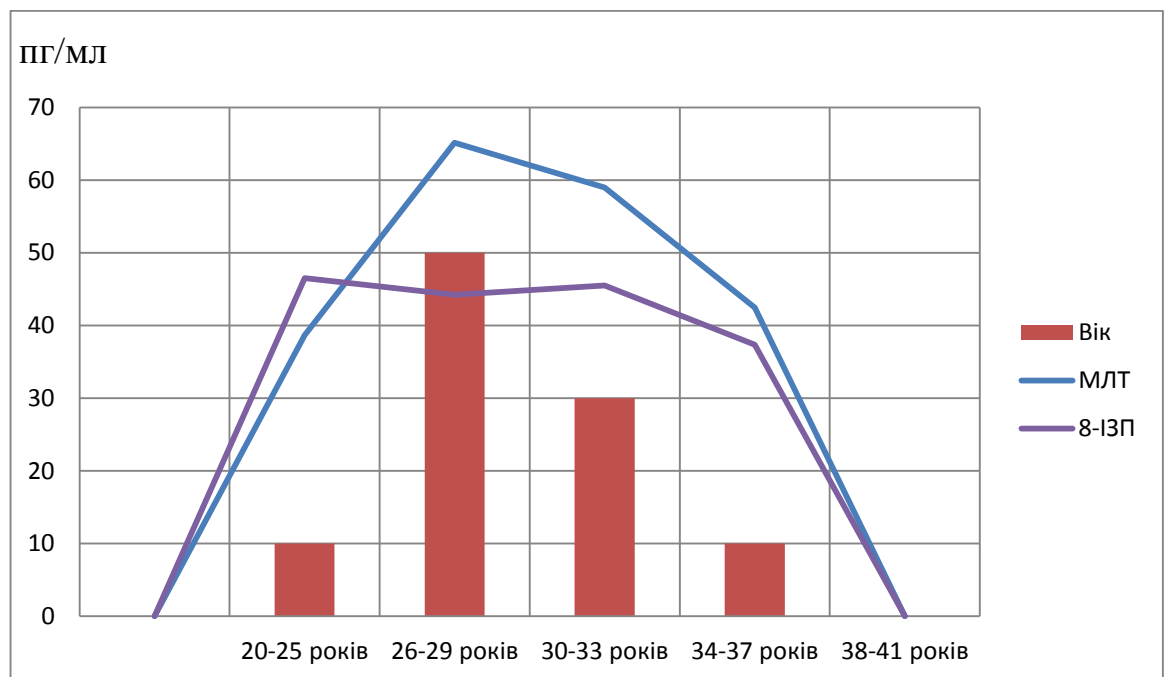


Рис. 4.1.5. Розподіл маркерів ОС згідно до вікових діапазонів у пацієток контрольної групи.

На основі отриманих даних були розроблені нормативні показники 8-ІЗП та МЛТ в сироватці крові для жінок репродуктивного віку, які приведені у таблиці 4.3.

Таблиця 4.1.3

Нормативні значення МЛТ та 8-ІЗП у сироватці крові здорових жінок репродуктивного віку

МЛТ	30,9 – 44,1	пг/мл
8-ІЗП	30,65 – 58,57	пг/мл

Рекомендовані нормативні значення МЛТ (30,9 – 44,1 пг/мл) у сироватці крові можуть використовуватися для оцінки роботи АОС, зокрема мелатонін-антиоксидантного захисту в організмі жінки репродуктивного віку у дослідженому віковому діапазоні 25-35 років, за умови дотримання практичних рекомендацій щодо застосування методу. Потребують подальшого вивчення вікові зміни рівнів МЛТ у сироватці крові у розширених вікових діапазонах, у тому числі в періоді встановлення репродуктивної функції та перименопаузального періоді. Використання маркера МЛТ може бути корисним для контролю ефективності патогенетичної терапії, направленої на боротьбу з ОС в організмі.

Запропоновані нормативні значення 8-ІЗП (30,65 – 58,57 пг/мл) у жінок репродуктивного віку можуть використовуватися для оцінки рівня ОС в організмі, проте 8-ІЗП є високочутливим маркером оксидативних реакцій при багатьох дегенеративних та запальних захворюваннях. Його роль в діагностиці патогенетичних порушень при захворюваннях репродуктивної системи, зокрема безплідді, потребує подальшого вивчення безпосередньо у патогенному локусі. Для формування повноцінного уявлення щодо активності оксидативного стресу доцільно поєднання визначення маркера ОС 8-ІЗП з маркером роботи АОС, наприклад МЛТ.

4.2. Динаміка показників оксидативного стресу в сироватці крові та фолікулярній рідині під впливом КОС

Наступним етапом в оцінці діагностичної значимості маркерів ОС було визначення показників МЛТ та 8-ІЗП в фолікулярній рідині (табл.4.2.1). Під час дозрівання ооциту в фолікулі накопичуються АФК, які призводять до ОС. В умовах оваріальної стимуляції ГТ множинне зростання фолікулів

призводить до активізації процесів перекисного окислення ліпідів мембранних структур всередині фолікула, що безперечно впливає на якість ооцитів.

Таблиця.4.2.1

Показники рівнів оксидативного стресу в фолікулярній рідині
у обстежених жінок

Назва	Основна група		Контрольна група (n = 30)
	I група (n = 30/33)	II група (n = 33)	
МЛТ, пг/мл	33,86±5,76**	58,41±4,96	62,08±11,99
8-ІЗП, пг/мл	346,05±65,13**	256,53±53,76*	209,73±33,83

Примітка. 1. ** – $p < 0,001$ достовірність відмінностей показників з контролем.
2.* – $p < 0,01$ достовірність відмінностей показників з контролем.

Підвищений вміст 8-ІЗП та знижений рівень МЛТ у фолікулярній рідині у пацієток I групи свідчить про високий рівень ОС та зниження антиоксидантної активності під час КОС. Це може бути обумовлене більш високими дозами ГТ у зв'язку з низькою оваріальною відповіддю під час стандартних протоколів КОС у пацієток I групи. Середні показники МЛТ в фолікулярній рідині у пацієток I групи склали 33,86±5,76 пг/мл, які були у 1,5 рази нижче за середні показники в II групі 58,41±4,96 пг/мл ($p < 0,05$), і в 1,8 рази нижче середніх показників контрольної групи 62,08±11,99 пг/мл ($p < 0,001$). Тоді як рівні 8-ІЗП в цій групі були найвищими, і склали 346,05±65,13 пг/мл, що свідчить на користь високої активності ОС в фолікулярній рідині.

Заслужують увагу рівні МЛТ та 8-ІЗП в фолікулярній рідині II групи, яка отримувала протокол КОС з мелатоніном. На користь антиоксидантного впливу цього препарату свідчать нижчі рівні 8-ІЗП 256,53±53,76 пг/мл, порівняно з I групою 346,05±65,13 пг/мл ($p < 0,001$), яка знаходилась в таких же умовах, проте не отримувала АМГТ. Для оцінки оксидативного впливу ГТ під час КОС проведено динамічну оцінку показників ОС (табл. 4.2.2).

Таблиця 4.2.2

Динаміка показників оксидативного стресу
у сироватці крові обстежених груп

Назва	Основна група				Контрольна група (n = 30)	
	І група (n = 33)		ІІ група (n = 33)		На старті	Після КОС
	На старті	Після КОС	На старті	Після КОС		
МЛТ, пг/мл	23,32 ± 5,11**	8,25 ± 1,24	25,04 ± 4,93*	7,97 ± 1,38	37,55±6,55	8,87±1,89
8-ІЗП, пг/мл	56,87 ± 10,51*	1061,70 ± 173,26**	54,89 ± 11,60*	313,89 ± 41,22*	44,41±13,96	352,82 ± 68,60

Примітка. 1. **– $p < 0,001$ достовірність відмінностей показників з контролем.

2.* – $p < 0,01$ достовірність відмінностей показників з контролем.

Оцінювались рівні МЛТ та 8-ІЗП у сироватці крові до початку стимуляції (на старті протоколу) у пацієнок з безпліддям, яким застосовано стандартний протокол КОС (І група), у пацієнок з безпліддям, яким застосовано модифікований протокол КОС з АМГТ (ІІ група), пацієнткам контрольної групи, яким застосовано стандартний протокол КОС, та після завершення стимуляції мультифолікулярного зростання ГТ перед призначенням тригерної дози ХГ. Динаміка показників ОС в сироватці крові до і після протоколів КОС, свідчить про виражений оксидативний вплив ГТ на організм. Під впливом ГТ рівні 8-ІЗП збільшуються в десятки разів, що відображають показники І групи: на старті протоколу середні рівні 8-ІЗП склали $56,87 \pm 10,51$ пг/мл, що в 20 разів менше порівняно з $1061,70 \pm 173,26$ пг/мл ($p < 0,001$) після стандартного протоколу КОС. Рівні МЛТ також мають тенденцію до зниження в ході КОС. У пацієнок І групи на старті протоколу КОС середні значення МЛТ склали $23,32 \pm 5,11$ пг/мл, порівняно з $8,25 \pm 1,24$ після протоколу стимуляції ($p < 0,001$). Така ж тенденція відмічається і у пацієнтів ІІ групи, які додатково отримували препарати мелатоніну, початкові рівні МЛТ в сироватці крові склали $25,04 \pm 4,93$

пг/мл і вірогідно не відрізнялися від I групи. Після КОС спостерігалось вірогідне зниження в 3,5 разів рівнів МЛТ, порівняно зі стартом протоколу $7,97 \pm 1,38$ пг/мл ($p < 0,001$). Хоча АМГТ не підвищує рівні МЛТ в сироватці крові хворих на безпліддя пацієнток в програмах ДРТ, проте вона вірогідно зменшує рівень ОС, про що свідчить в 3 рази нижчий вміст 8-ІЗП – $313,89 \pm 41,22$ пг/мл, порівняно з I групою – $1061,70 \pm 173,26$ пг/мл ($p < 0,001$), і в 1,2 рази порівняно з КГ – $352,82 \pm 68,60$ пг/мл ($p < 0,01$) у фолікулярній рідині II групи, яка отримувала модифікований протокол КОС.

Резюме

Підсумовуючі результати досліджень маркерів оксидативного стресу, перш за все, слід відмітити, що рівні МЛТ та 8-ІЗП пов'язані між собою зворотнім кореляційним зв'язком. Більш високим рівням 8-ІЗП відповідають низькі рівні МЛТ і, навпаки, при збільшенні вмісту МЛТ в біологічних зразках рівень 8-ІЗП зменшується. Розроблені нормативні значення МЛТ та 8-ІЗП в сироватці крові у жінок репродуктивного віку доповнюють уявлення про активність ОС та ступінь природного антиоксидантного захисту в організмі. Використання маркерів ОС дозволяє сформувати патогенетичний підхід у використанні антиоксидантної терапії та оцінити її ефективність.

КОС з використанням ГТ викликає підвищення активності ОС в організмі, про що свідчать вірогідні збільшення рівнів 8-ІЗП в сироватці крові. Збільшена концентрація МЛТ в фолікулярній рідині, порівняно з сироваткою крові, у здорових жінок свідчить про запуск природних механізмів захисту зрілої яйцеклітини від руйнівної дії ОС за рахунок потужних антиоксидантів, зокрема мелатоніну. Модифіковані схеми КОС з АМГТ вірогідно зменшують рівні 8-ІЗП в сироватці крові та фолікулярній рідині пацієнток з безпліддям, порівняно зі стандартними протоколами КОС, однак, повної нормалізації показників не спостерігалось. Вивчення чутливості та специфічності окремих маркерів ОС дозволило розробити алгоритм диференційної діагностики окисних порушень під час КОС з високим ступенем інформативності та надійності.

РОЗДІЛ 5

ПРОВЕДЕННЯ КОНТРОЛЬОВАНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ ЯЄЧНИКІВУ ЖІНОК З НИЗЬКИМ ОВАРІАЛЬНИМ РЕЗЕРВОМ

Результати дослідження, наведені у попередніх розділах, дозволили визначити напрямки підвищення ефективності лікування безпліддя методиками ДРТ. Головним з них є швидка патогенетична оцінка стану оваріального резерву та покращення оваріальної відповіді у жінок з НОР, за рахунок своєчасного лікування порушень оваріального резерву.

Основним напрямком поліпшення результатів лікування безпліддя методиками ДРТ є раціональний вибір схем контрольованої оваріальної стимуляції у жінок з НОР та ад'ювантної терапії, направленої на корекцію патогенетичних порушень під час стимуляції ГТ. Необхідність додаткових методів впливу обумовлена підвищенням активності ОС, руйнуючою дією АФК на клітинні структури під час КОС в програмах ДРТ. Важливими напрямками є корекція активності ОС в фолікулярній рідині під час дозрівання яйцеклітин, підвищення рівнів антиоксидантного захисту організму за рахунок модифікації протоколів КОС призначенням ад'ювантної мелатонін-гормонотерапії (АМГТ).

Проблема НВЯ займає від 20-44% у структурі ДРТ і набуває поширення за рахунок щорічної тенденції до збільшення кількості жінок пізнього репродуктивного віку в програмах ДРТ. Загальновідомим є той факт, що репродуктивний потенціал, зокрема ОР, зазнає генетично-детермінованих вікових змін, направлених на інволюцію фолікулярного апарата яєчників, що призводить до розвитку НВЯ. Високі рівні ОС від час стимуляції ГТ завдають додаткового руйнівного впливу на зріючі фолікули і зменшують як кількість, так і якість отриманих яйцеклітин.

На теперішній час є достатньо великий арсенал лікарських засобів для проведення КОС в програмах ДРТ. Існуючі протоколи стимуляції направлені, насамперед, на індукцію суперовуляції. Основними етапами більшості стандартних протоколів ДРТ у жінок з трубно-перитонеальним безпліддям є

комплексне обстеження подружньої пари, з оцінкою можливих інфекційних захворювань та їх етіотропним лікуванням; оцінка гормональних показників функціонування репродуктивної системи (ФСГ, П, Е2, ПРЛ, ЛГ, Т) та стану ОР (АМГ), за умови відсутності глибоких порушень – визначення типу КОС та дати старту протоколу; проведення безпосередньо КОС з гормонально-інструментальної оцінки її ефективності (рівні естрадіолу, УЗД-моніторинг зростаючих фолікулів), після досягнення лідуючого фолікула розміром 18 мм в діаметрі призначення тригеру остаточного дозрівання фолікулів – ХГЧ і визначення часу пункції; підготовка ендометрію матки; проведення аспірації вмісту фолікулів за допомогою трансвагінальної пункції, відокремлення та оцінка отриманих яйцеклітин, запліднення *in vitro*, або ІКСІ за необхідністю; подальше культивування отриманих ембріонів в умовах ембріологічної лабораторії та перенесення 1-2 морфологічно найкращих ембріонів в порожнину матки; експрес тест на β -ХГЧ на 14 добу та УЗД підтвердження клінічної вагітності; підтримка лютеїнової фази на ранніх термінах вагітності.

До стандартного протоколу ЕКЗ не входить оцінка ступеня ризику НВЯ, або «відміни цикла» за допомогою УЗД підрахунку ЧАФ та визначення показників активності ОС (8-ІЗП) та роботи АОС (МЛТ), які значно доповнюють уявлення про ступінь гормонально-метаболических порушень у пацієнток з НОР і жінок після 33 років, і дозволяють своєчасно їх коригувати.

До теперішнього часу «золотим стандартом» у лікуванні безпліддя у пацієнтів з НОР була зміна протоколу КОС або збільшення дози ГТ, але у зв'язку з низкою недоліків та відсутністю доведеної ефективності цих заходів триває пошук альтернативних методик.

Ефективність застосування антиоксидантної терапії в програмах ДРТ на сьогоднішній момент є достатньо доведеною методами доказової медицини [123,126,128,178], особливо у пацієнтів з НОР. Однак оцінка фармакологічної дії існуючих засобів свідчить про відсутність

патогенетичного обґрунтування їх застосування. Доцільність використання АМГТ, на відміну від інших засобів гормональної корекції оваріального резерву та роботи АОС, є патогенетично обґрунтованою нашими дослідженнями. Високі рівні показників ОС у сироватці крові та фолікулярній рідині, низькі рівні ендogenous антиоксидантів при стимуляції ГТ у пацієнток з НОР, спонукали до створення нового напрямку гормональної корекції оксидативних порушень з метою покращення оваріальної відповіді і якості отриманих яйцеклітин.

В зв'язку з цим призначення МЛТ для покращення оваріальної відповіді під час КОС відповідає сучасним уявленням терапії окисних порушень, яка ґрунтується на клініко-лабораторній діагностиці.

Проблему вибору ефективного протоколу стимуляції у жінок з НОР у даний час вирішують за допомогою використання двох протоколів КОС: «довгого протоколу» з а-ГнРГ та «короткого протоколу» с ант-ГнРГ.

Насамперед, була вивчена ефективність своєчасного призначення АМГТ у хворих на безпліддя жінок з НОР в програмах ДРТ. Загалом у цей фрагмент дослідження увійшли 60 жінок з безпліддям, тривалістю більше 5 років та встановленою трубно-перитонеальною етіологією захворювання, які були розподілені на дві групи.

Для проведення порівняльної оцінки ефективності використовуваних схем І група (n=33, стандартний протокол КОС без АМГТ) та ІІ група (n=33, стандартний протокол КОС з АМГТ) методом простої рандомізації були розділені на чотири підгрупи залежно від лікувальної схеми:

- Іа підгрупа «довгий протокол» з а-ГнРГ+лМГ, n=16
- Іб підгрупа «короткий протокол» з ант-ГнРГ+лМГ, n=17
- ІІа підгрупа «довгий протокол» з а-ГнРГ+лМГ+АМГТ, n=16
- ІІб підгрупа «короткий протокол» з ант-ГнРГ+лМГ+АМГТ, n=17.

Застосування патогенетичної терапії, направленої на зменшення рівнів оксидативного стресу в залежності від стану оваріального резерву представлена на Рис 5.1

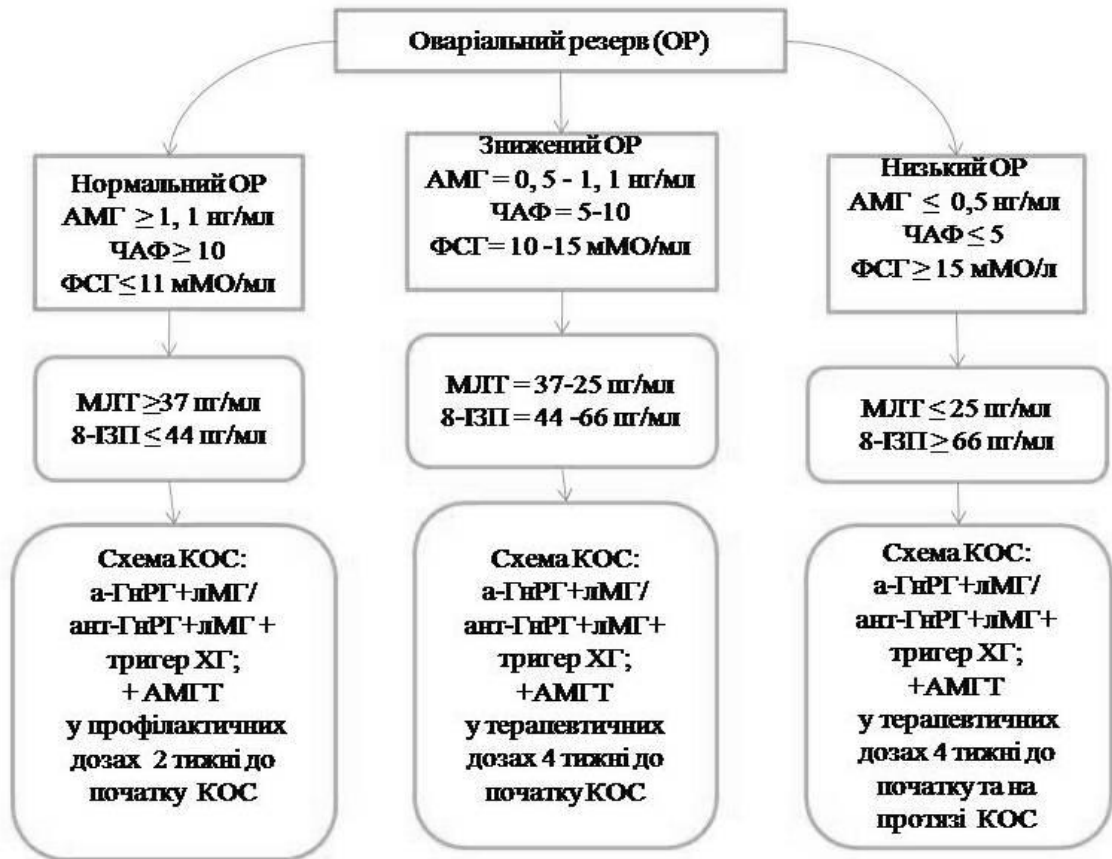


Рис. 5. 1. Схема застосування КОС з АМГТ залежно від стану ОР і рівнів оксидативного стресу у пацієнток з безпліддям.

У пацієнток Іа підгрупи застосовували «довгий протокол» за стандартною методикою з використанням а-ГнРГ для щоденного підшкірного введення по 0,05-0,1 мг з середини лютеїнової фази попереднього менструального циклу до дня введення «овуляторної» дози ХГ.

При зниженні рівня сироваткового Е2 на 20-30% (3-5й день циклу) на 21 день починали стимуляцію суперовуляції препаратом людським менопаузальним гормоном по 3-5 ампул індивідуально. Стимуляція проводилася до дня досягнення лідируючими фолікулами діаметра 18-20 мм, що визначалось під час трансвагінальної ехографії та відповідній активності стероїдогенезу, після чого призначали ін'єкцію «овуляторної» дози ХГ.

У пацієнток Іа підгрупи застосовували «довгий протокол» за вищеписаною методикою з завчасним додаванням 3 мг мелатоніну 1 раз на добу перед сном незалежно від прийому їжі, протягом 2 тиж. до початку

стимуляції та на протязі всього часу КОС, відміна мелатоніну виконувалась в день ін'єкції «овуляторної» дози ХГ.

У пацієток Ів групи був використаний «короткий протокол» з ант-ГнРГ - стимуляція суперовуляції починалася з 2-3го дня менструального циклу так само за допомогою препарату лМГ, щоденна доза якого становила 3-5 ампули індивідуально залежно від даних ультразвукового та гормонального моніторингу. Для запобігання овуляторному піку ЛГ підшкірно вводився антагоніст ГнРГ у дозі 0,25 мг з 5-6го дня стимуляції суперовуляції, включаючи день введення овуляторної дози ХГ. Тривалість стимуляції суперовуляції, кратність і доза препаратів визначалися на підставі даних гормонального УЗ - моніторингу до дня введення овуляторної дози одного з препаратів ХГ.

Пацієнтки ІІв групи отримували вищеописаний «короткий протокол» з ант-ГнРГ з завчасним додаванням 3 мг мелатоніну перед сном на протязі 2х тижнів до початку стимуляції протягом КОС, відміна мелатоніну виконувалась в день ін'єкції «овуляторної» дози ХГ.

Початкова доза стимуляції гонадотропінами визначалась з урахуванням базового числа антральних фолікулів (ЧАФ):

ЧАФ ≥ 15 : 150 МО на день;

ЧАФ 6-14: 300 МО протягом перших двох днів, а потім 150 МО на день;

ЧАФ < 5 : 450 МО протягом перших двох днів з подальшим 225 МО щодня.

Цикл був скасований, якщо не спостерігалось зростання фолікулів після 14 днів від максимальної стимуляції.

Призначення «овуляторної» дози ХГ проводилось за наступних умов: максимальний діаметр лідируючого фолікула за даними УЗД - не менше 18 мм; товщина ендометрія за даними УЗД не менше 9 мм; концентрація Е2 в сироватці крові пацієнтки не менше 1000 пмоль/л (300-400 пг/мл) з розрахунку на кожен лідируючий фолікул; концентрація прогестерону в сироватці крові не більше 2,0 нмоль/л, у випадку високого вмісту

прогестерону ПЕ не відбувався. Ембріони зазнавали кріоконсервації та подальшого переносення в природному циклі (табл. 5.1)

Таблиця 5.1

Оцінка гормональних показників на етапі аспірації фолікулів
у обстежених жінок

Показник	Основна група		Контрольна група (n= 30)
	I група (n= 33)	II група (n= 33)	
Прогестерон, нмоль/л	1,68±0,12*	2,04±0,27*	2,3±0,17
Естрадіол, пг/мл	620±90,23*	1195,22±120,27*	1560,43±98,91

Примітка.* – $p < 0,05$ значима достовірність відмінностей показників з контролем.

Рівні прогестерону в основній групі коливались від 0,8 до 3,5 нмоль/л, середні показники в I групі склали 1,68±0,12 нмоль/л, в II групі - 2,04±0,27 нмоль/л, і вірогідно не відрізнялись від контрольної групи 2,3±0,17 нмоль/л.

Рівні E2 в основній групі коливались від 350,87 до 1950,99 пг/мл, середній показник в I групі, яка отримувала стандартну схему КОС, складав 620±90,23 пг/мл і вірогідно відрізнявся від контрольної групи 1560,43±98,91 пг/мл ($p < 0,05$). Середній показник в II групі, яка отримувала модифікований протокол КОС з АМГТ, складав 1195,22±120,27 пг/мл і вірогідно не відрізнявся від контрольної групи ($p > 0,05$). Низькі рівні E2 корелювали з найнижчими показниками ЧАФ в досліджуваних групах.

«Овуляторна» доза препаратів ХГ становила 5-10 тисяч міжнародних одиниць (МО), визначалася індивідуально і залежала від кількості зростаючих фолікулів і ступеня ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників у даної пацієнтки.

Трансвагінальну пункцію яєчників виконували через 35-36 годин після введення овуляторної дози хоріонічного гонадотропіну в умовах малої

операційної під короткочасним внутрішньовенним наркозом і ультразвуковим контролем. Використовували трансвагінальний датчик, на який щільно фіксували адаптер для прикріплення спеціальної голки. Застосовували голку довжиною 25 см, з зовнішнім діаметром 1,6 мм, на кінчику якої була ехо-контрастна насічка, видима при проведенні трансвагінального ультразвукового дослідження. На екрані монітора ультразвукового апарату напрямок голки визначався пунктирною лінією. Зіставляючи напрямок цієї лінії з центром фолікула, виконували пункцію фолікула. За допомогою вакуум - аспірації (під тиском 150-160 мм рт.ст.) Фолікулярна рідина надходила в стерильні пробірки, в яких знаходилося 0,5 мл гепарину. Отриману фолікулярну рідину передавали ембріологу для ідентифікації ооцитів і подальшого їх запліднення.

Аспірована фолікулярна рідина негайно проглядалася ембріологом. Вміст пробірок переливався в чашки Петрі і досліджувався під стереомікроскопом або інвертованим мікроскопом при невеликому збільшенні. Знайдені ооцити переносили в спеціальне середовище для відмивання, яке містило HEPES-буфер, що дозволяло маніпулювати з ооцитами на повітрі без ризику зміни РН у лужну сторону, потім відмивали в культуральному середовищі, після чого оцінювали кількість, якість і ступінь зрілості ооцитів.

Ступінь зрілості ооцита оцінювали за станом комплексів ооцит-сумулус. Яйценосний бугорок (*Cumulus oophorus*) являє собою частину фолікулярного епітелію, яка безпосередньо контактує з ооцитом у процесі фолікулогенезу. За морфологічними ознаками ооцити поділяли на зрілі, незрілі і дегенеративні. Наявність пухкого *Cumulus oophorus* і дисперсної *corona radiata* свідчило про зрілість ооцита, ооцит знаходився на стадії метафази другого поділу мейозу (M2), полярне тільце було вже сформовано.

У незрілому ооциті клітини *corona radiata* щільно прилягають до ооциту, «кумуляус» незначно збільшений. Такий ооцит знаходився, як

правило, в метафазі першого поділу мейозу (M1), проте формування полярного тільця ще не відбулося.

Для дегенеративних ооцитів були характерні деформація контурів ооцита, груба зернистість і / або потемніння цитоплазми.

У процесі культивування остаточно уточнювалися морфологічні характеристики ооцитів за шкалою, яка запропонована Erenus (1991).

Отримані преовуляторні ооцити культивувалися ембріологами в спеціальних термостатах при температурі 37 градусів Цельсія при 5% CO₂ в повітрі, в стерильному живильному середовищі Менеза В2.

Сперму, отриману шляхом мастурбації, після розрідження, що триває в нормі від 15 до 50 хв, двічі центрифугували в живильному середовищі по 7 хвилин при швидкості 1800 обертів на 1 хв. Надосадову рідину зливали, і на осад нашаровували культуральне середовище (0,5-1,0 мл). Потім пробірки розміщували на 30 хв у термостат при температурі 37 градусів Цельсія для проведення флотації - спливання активно рухливих сперматозоїдів.

Для запліднення отриманих ооцитів, в лунки з останніми по краплях додавали надосадову рідину зі спливаючими сперматозоїдами до досягнення концентрації не менше 100 тисяч активно рухливих сперматозоїдів на один ооцит.

На наступну добу після запліднення ооцити, звільнені від cumulus oophorus переносили в лунки зі свіжим середовищем, запліднення оцінювали за наявністю 2-х пронуклеусів. Пронуклеуси з'являлися, як правило, через 10-19 годин після додавання сперматозоїдів в середовище з ооцитами і зникали через 6-8 годин після появи. Якщо були присутні обидва пронуклеуси, запліднення вважалось нормальним. Якщо було видно один або більше 2-х пронуклеусів, запліднення вважали аномальним.

Оцінка якості ембріонів здійснювалася на підставі сукупності наступних параметрів: швидкості дроблення ембріонів, симетричності бластомерів, ступеня цитоплазматичної фрагментації (<10%, 10-30%, > 30%),

мультиплектарності бластомерів. Використовували наступну класифікацію якості ембріонів:

- Ембріони класу А - з найбільшою швидкістю дроблення, бластомери яких мають регулярну форму, а без'ядерні фрагменти відсутні. Вважається, що максимальну здатність до імплантації мають саме такі ембріони.
- Ембріони класу В - з нерівними бластомерами та / або фрагментами цитоплазми, які займають не більше 10% обсягу.
- Ембріони класу С - з фрагментацією від 10 до 50%.
- Ембріони класу D - з фрагментацією більше 50%.

Ембріонами «хорошої якості» вважали ембріони, на 2-у добу розвитку, які досягли стадії 4-х і більше бластомерів (48 годин після ТВП), на 3-ю - більше 6 бластомерів, на 5-у добу на стадії бластоцисти. Бластоциста, що має приблизно 150-200 клітин, компакту внутрішню клітинну масу і добре структурований трофектодерм, розцінювалася як «хороша». Ембріони гарної якості, які підлягали дробленню, повинні мати не більше 10% фрагментації.

Ембріони, які досягли стадії бластоцисти поділялись за наступними критеріями:

Стадії розвитку і величина бластоцисти: 0 - ембріон не досяг стадії бластоцисти; рання бластоциста, порожнина <50%; рання бластоциста, порожнина 50-80%; повна бластоциста, велика порожнина; розширена (expanded) бластоциста; hatching бластоциста; hatched бластоциста.

Внутрішня клітинна маса (ICM): А - багато клітин, розташовані компактно; В - кілька клітин, розосереджені; С - дуже мало клітин або не визначаються.

Трофектодерма (Trophectoderm): А - велика кількість клітин. В - мала кількість клітин.

Перенесення ембріонів в порожнину матки здійснювали на 2-3 та / або 5 добу (48-72-120 годин) після початку культивування *in vitro* за допомогою спеціального одноразового катетера. Ембріони під мікроскопом розміщували

в спеціальний одноразовий катетер і через цервікальний канал вводили в порожнину матки пацієнтки. Перенесення виконували в амбулаторних умовах на гінекологічному кріслі. Число ембріонів для перенесення обирали індивідуально, стосовно кожної конкретної ситуації, проте воно не перевищувало 2. Після перенесення пацієнтка протягом 2-3-х годин перебувала під наглядом лікарів в умовах денного стаціонару. При показаннях проводилася госпіталізація до стаціонару.

Підтримку періоду раннього ембріогенезу проводили з використанням препаратів синтетичного прогестерону через 24 години після проведення транвагінальної пункції фолікулів в зростаючій дозі 200-600 мг / добу інвагінально.

Підтримка періоду раннього ембріогенезу проводилася до моменту проведення експрес-тесту на рівень Р-субодиниці ХГ (14-15-й день після перенесення ембріонів). При двох позитивних тестах на вагітність визначався стан як «біохімічна вагітність». Ультразвукова діагностика клінічної вагітності проводилася через 21 день після перенесення ембріонів, після чого визначали подальшу тактику ведення пацієнток.

За необхідністю виконували процедуру інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда (ІКСІ). Безпосередньо перед проведенням ембріологічної процедури ІКСІ ооцити очищали від клітин кумулюса за допомогою ферменту гіалуронідази. Після ферментної обробки ооцити відмивали в буферному середовищі, що попереджувало зміну рН при роботі на повітрі.

Приготування сперми для ІКСІ не відрізняється від такого при стандартній процедурі ЕКЗ. Процедура ІКСІ проводилась в чашці Петрі діаметром 30-60 мм з низькими бортиками. Дно чашки зрошували краплями з середовищем, призначеним для роботи з ооцитами і ембріонами в умовах поза інкубатором. Сама процедура ІКСІ включала кілька етапів:

Імобілізація сперматозоїда за допомогою мікроголки: засмоктування сперматозоїда в голку за допомогою створення негативного тиску; орієнтація і закріплення ооцита на присоску таким чином, щоб полярне тіло перебувало

в положенні 6 або 12 годин; прокол ооцита і відсмоктування невеликої кількості ооплазми, що виконувалася для констатації проникнення голки в ооцит і цілісності мембрани.

Після закінчення ІКСІ ооцити негайно переносили в культуральне середовище і культивували надалі так само, як після стандартної методики запліднення *in vitro*.

За наявності показань проводився лазерний допоміжний хетчінг: вік жінки старше 38 років; 2 попередні невдалі спроби ЕКЗ в анамнезі; ембріони з незадовільними морфологічними показниками;

Залежно від параметрів сперми та якості ооциту проводили ЕКЗ або ІКСІ (Рис. 5.2). У 47% (n=31) випадків застосовувався метод інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда в ооцит (ІКСІ).

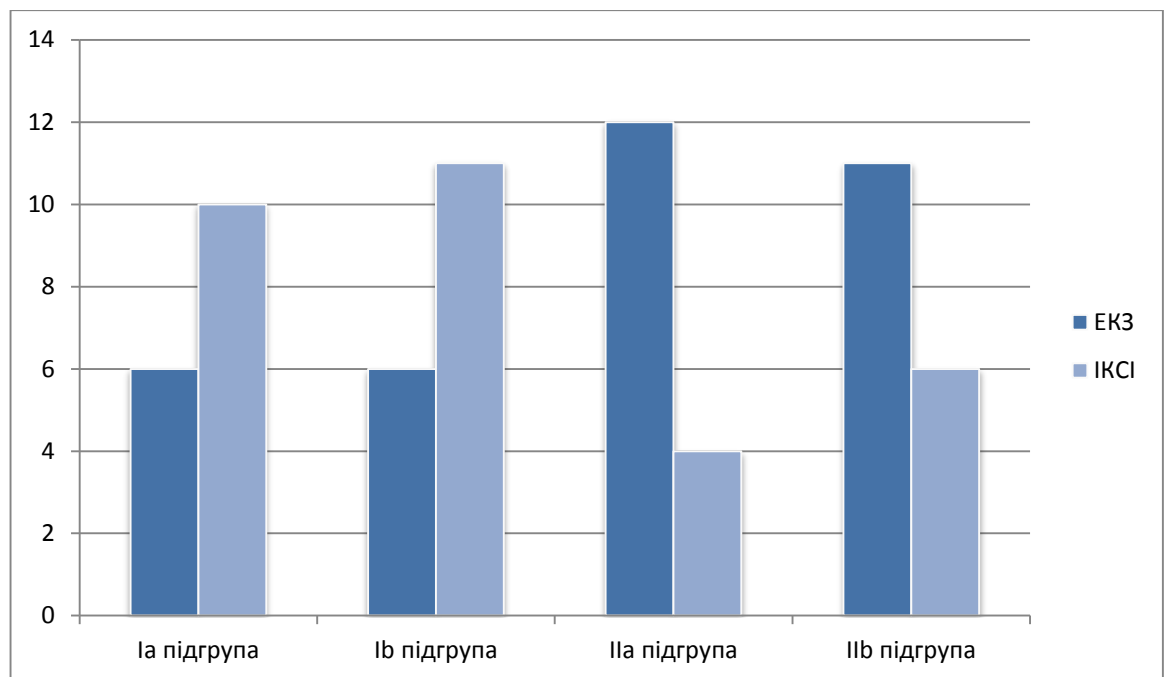


Рис. 5.2. Схема розподілу пацієток залежно від застосованого методу запліднення

Найбільша кількість ІКСІ спостерігалась в I групі жінок з НОР, які отримували стандартні протоколи КОС - більше 60% (n=21), порівняно з 30% (n=10) в II групі жінок, які отримували АМГТ. Високий відсоток ІКСІ у пацієток I групи обумовлений чоловічими факторами лише в половині

випадків ($n=11$), іншими факторами, які спонукали до проведення ІКСІ були вкрай низькі показники оваріальної відповіді у пацієток І групи.

Для оцінки ефективності проведеної АМГТ використовували клінічні дані щодо оваріальної відповіді на КОС, якості та кількості отриманих яйцеклітин і рівня клінічних вагітностей, динаміка зниження показників ОС (8-ІЗП) та рівней МЛТ в сироватці крові.

З об'єктивних причин не проводилась оцінка динаміки рівнів МЛТ та 8-ІЗП в фолікулярній рідині у одного ж і того пацієнта до і після АМГТ, порівнювались показники фолікулярної рідини між групами.

Через відсутність оваріальної відповіді на застосовані протоколи КОС - «відміна циклу», не проводилось визначення рівнів МЛТ та 8-ІЗП в фолікулярній рідині у 3 пацієток І групи.

Аналіз протоколів КОС показав, що тривалість періоду десенситизації в середньому становить $13,5 \pm 0,05$ днів. У ІЬ підгрупі, де застосовувався ант-ГнРГ з АМГТ, тривалість введення препарату в 3,85 рази коротше: $3,0 \pm 0,05$ днів, оскільки антагоніст завдяки своїй здатності негайно блокувати рецептори ГнРГ в гіпофізі вводився вже на тлі проведеної стимуляції суперовуляції саме в ті дні, коли був можливий передчасний підйом ЛГ. Тривалість введення лМГ в ІЬ підгрупі та ІЬ підгрупі із застосуванням ант-ГнРГ була найкоротшою і склала $11 \pm 0,5$ днів. У підгрупах з а-ГнРГ лМГ вводився довше - $14 \pm 0,2$ днів. Доза лМГ з розрахунку на цикл стимуляції суперовуляції в ІЬ підгрупі ант-ГнРГ+ АМГТ склала 1800 ± 150 МО, що на 500-600 МЕ менше, ніж у Іа пігрупі із застосуванням а- ГнРГ (2200 ± 150 МО). Важливою характеристикою пацієнтів з НОР є підвищена резистентність яєчників до стимуляції, що диктує необхідність використання більш високих доз гонадотропінів протягом тривалого часу стимуляції.

Особливої уваги заслуговує оцінка якості оваріальної відповіді в залежності від застосованої схеми КОС (табл.5.2)

Таблиця 5.2

Оцінка показників ефективності ДРТ залежно від схеми КОС

Основна група				
Показник	І група (n=30) стандартна схема КОС без АМГТ		ІІ група (n=33) модифікована схема КОС з АМГТ	
	Ia підгрупа (n=15) а-ГнРГ+лМГ	Ib підгрупа (n=15) ант-ГнРГ+ лМГ	IIa підгрупа (n=16) аГнРГ+ лМГ+МЛТ	IIb підгрупа (n=17) ант-ГнРГ+ лМГ + МЛТ
Кількість фолікулів	3,83 ±0,39*	3,92±0,29*	8,01±0,92*	7,85 ± 0,69*
Кількість ооцитів	3,04±0,43*	2,95±0,42*	5,98±0,96*	5,03 ± 0,87*
Кількість ПЕ	2,61 ± 0,33	1,98±0,32*	4,22 ± 0,77*	3,91 ± 0,55
Зрілі ооцити	2,98±0,37*	2,34±0,34*	4,01 ± 0,68*	3,78 ± 0,56*
Запліднені ооцити	2,76 ± 0,43*	2,04 ± 0,23*	3,89 ± 0,56*	3,67 ±0,45*
Незрілі ооцити	1,19±0,31*	1,21±0,32*	0,78 ± 0,09*	0,86 ±0,05*

Примітка.* – $p < 0,05$ значима достовірність відмінностей показників з групами, які отримували АМГТ.

Згідно даним табл. 5.2 не виявлено достовірних відмінностей у якості оваріальної відповіді залежно від використовуваної схеми КОС з а-ГнРГ або ант-ГнРГ, проте зафіксовано вірогідну різницю в кількості фолікулів, ооцитів, перенесених ембріонів між пацієнтками І групи які отримували стандартні протоколи КОС і пацієнтками ІІ групи, які отримували модифіковану схему КОС з АМГТ. Також спостерігається вірогідне покращення зрілості ооцитів і процент запліднюваності у жінок з НОР ІІ групи порівняно з жінками з НОР І групи ($p < 0,05$), що свідчить на користь протекторного впливу АМГТ на зріючий ооцит в програмах ДРТ (Рис. 5.3).

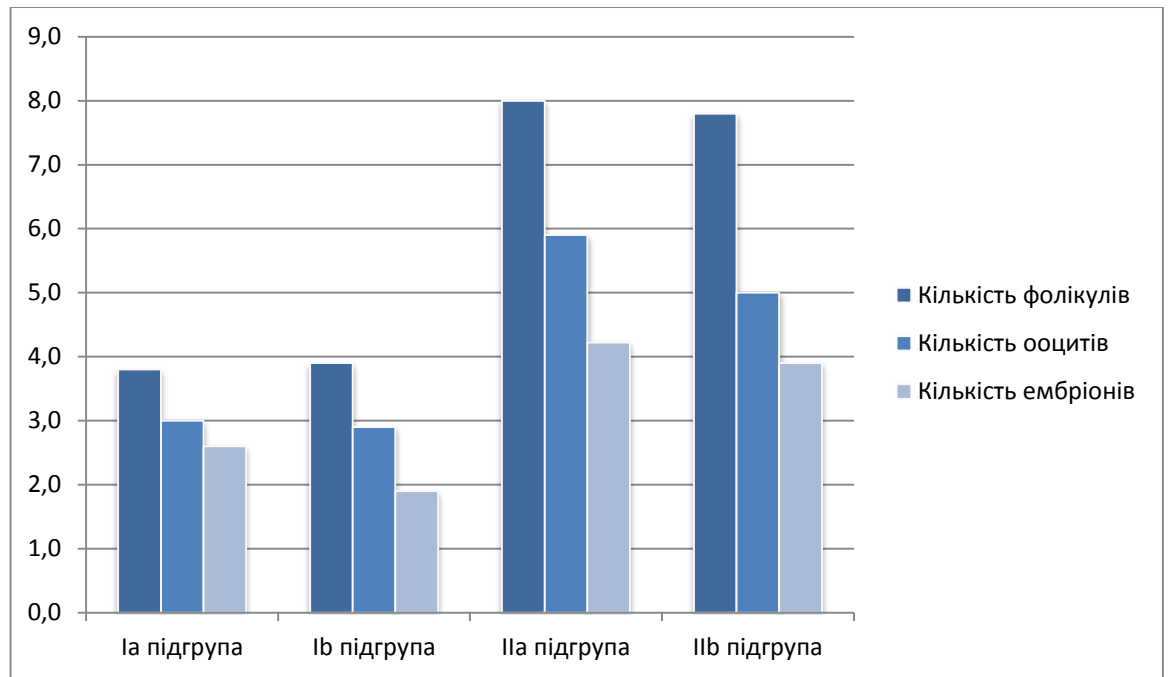


Рис. 5.3. Оцінка якості оваріальної відповіді та кількості перенесених ембріонів залежно від схеми КОС у пацієнок з НОР

Таблиця 5.3.

Параметри ранніх етапів ембріогенезу у пацієнок з безпліддям

Основна група				
Показник	І група (n=30) стандартна схема КОС без АМГТ		ІІ група (n=33) модифікована схема КОС з АМГТ	
	Ia підгрупа (n=15) а-ГнРГ+лМГ	Ib підгрупа (n=15) ант-ГнРГ+ лМГ	IIa підгрупа (n=16) аГнРГ+ лМГ+МЛТ	IIb підгрупа (n=17) ант-ГнРГ+ лМГ + МЛТ
Кількість ембріонів на стадії 2-3 бластомерів	1,20 ± 0,34*	1,18 ± 0,29*	0,76 ± 0,33*	0,45 ± 0,22*
Кількість ембріонів на стадії 4-5 бластомерів	0,86 ± 0,33	0,98 ± 0,32	0,98 ± 0,15	1,03 ± 0,18
Кількість ембріонів на стадії 6 та більше бластомерів	0,98 ± 0,37*	0,73 ± 0,14*	1,22 ± 0,31*	1,61 ± 0,24*

Примітка.* –р <0,05 значима достовірність відмінностей показників з групами, які отримували АМГТ.

Проводився порівняльний аналіз ранніх етапів ембріогенезу в досліджуваних групах. В табл. 5.3 представлені параметри раннього ембріогенезу у пацієток з НОР в залежності від схеми КОС.

Згідно з даними, представленими в таблиці 5.3, інтенсивність дроблення оцінювалась за кількістю бластомерів у ембріонів в день перенесення в порожнину матки жінки (на 2-3 добу культивування). Відомо, що уповільнення або припинення розвитку ембріонів на стадії до 4-х бластомерів (після культивування протягом 48 годин зі стадії пронуклеусів) є характерними ознаками порушення розвитку ембріонів в культуральних середовищах і відображає якість отриманих ооцитів.

Проведений нами аналіз розподілу ембріонів за числом бластомерів показав, що кількість ембріонів на стадії більше 4-х бластомерів достовірно не відрізнявся у жінок Ia та Ib підгруп, що складало $(1,84 \pm 0,38)$ і $(1,71 \pm 0,28)$ відповідно, проте була нижчою, ніж у жінок IIa та IIb підгруп, що складало $(2,2 \pm 0,24)$ і $(2,64 \pm 0,21)$ відповідно ($p < 0,05$).

Частота настання вагітності та живонародження у жінок з НОР в залежності від використання стандартної, або модифікованої схеми (з АМГТ) схеми КОС представлена на Рис. 5.4

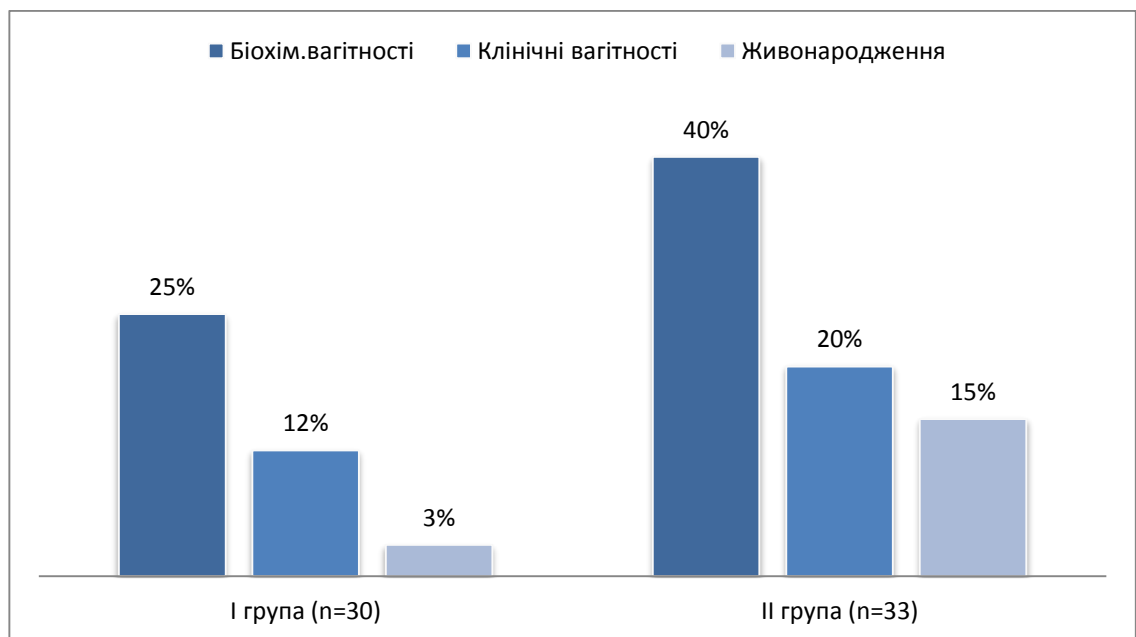


Рис. 5.4. Оцінка ефективності ДРТ у жінок з НОР I і II групи

У результаті проведення модифікованого протоколу КОС з а-ГнРГ та ант-ГнРГз АМГТ у пацієнток II групи спостерігались вірогідно вищі показники настання біохімічної, клінічної вагітності та народження живих дітей порівняно з I групою, яка отримувала стандартні протоколи КОС з а-ГнРГ та ант-ГнРГ без додаткового антиоксидантного захисту ($p < 0,01$).

Частота НВЯ була найвищою в I групі, в якій складала 84%, що 1,26 разів вище, ніж в II групі – 66,6%, яка отримувала КОС з АМГТ ($p < 0,05$). В I групі було зафіксовано три випадки «відміни циклу», тоді як в II групі таких епізодів не виникало.

Відсоток настання біохімічних вагітностей у пацієнток II групи складав 40%, клінічних вагітностей - 20%, народження живих дітей - 15%, незважаючи на низькі показники оваріального резерву, в ході застосування модифікованої схеми КОС з АМГТ були отримані зрілі ооцити достатньо високої якості, що пояснює високу результативність ДРТ у даної групи пацієнтів з НОР.

Резюме

Порівняльний аналіз ефективності етіопатогенетичної терапії ОС у вигляді АМГТ у складі КОС, у хворих на безпліддя жінок з НОР, свідчить про її виїняткову значущість. Як показало дослідження, у пацієнток з НОР, яким призначався мелатонін, процес КОС завдавав меншої оксидативної шкоди, що дозволило покращити оваріальну відповідь, якість ооцитів та відсоток клінічних вагітностей у пацієнток з безпліддям. Ефективність застосованих методик ДРТ (ЕКЗ та ІКСІ) у хворих на безпліддя жінок з НОР залежить не безпосередньо від віку та вибору між протоколами КОС з а-ГнРГ та ант-ГнРГ, а від стану оваріального резерву, рівнів оксидативного стресу, та завчасного попередження АФК-обумовленого пошкодження ооцитів. Патогенетична терапія спрямована на основні ланки оксидативного процесу та корекції антиоксидантного захисту на локальному та системному рівнях. Таким чином, препарати мелатоніну можуть бути рекомендовані до включення в схему КОС у жінок з НОР в програмах ДРТ.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Одним з найважливіших факторів успішного застосування методик ДРТ у жінок з безпліддям є ефективна оваріальна стимуляція і отримання достатньої кількості зрілих ооцитів. У зв'язку з цим проведення ЕКЗ та ІКСІ у пацієнтів з НВЯ є актуальною проблемою, оскільки призводить до зменшення кількості та якості одержуваних ооцитів, здатності до запліднення, а отже і вибору ембріонів для переносення і подальшої імплантації. Як правило, оваріальний резерв формує підґрунття для реалізації жіночої репродуктивної функції. Зниження оваріального резерву призводить до підвищення ризику НВЯ, а отже, низької ефективності ДРТ.

Відповідно до поставленої мети під наглядом перебувало 96 жінок репродуктивного віку, з них 66 хворих на безпліддя жінок, яким показано застосування ДРТ, склали основну групу, 30 здорових жінок – донорів яйцеклітин, склали контрольну групу. Пацієнтки основної групи були включені в дослідження за наявності мінімум одного з Болонських критеріїв «поганих відповідей» (пізній репродуктивний вік, отримання 3х і менше ооцитів у попередніх спробах ЕКЗ, зниження показників оваріального тесту: АМГ менше 1,1 нг/мл, ЧАФ менше 5 згідно УЗД) і в залежності від використаної лікувальної схеми були поділені на дві клінічні групи. До першої групи увійшли 33 пацієнтки з НОР, яким проводили традиційні схеми контрольованої оваріальної стимуляції з гонадотропінами та (ант-ГнРГ+ лМГ, n=16; а-ГнРГ+ лМГ, n=17). До другої групи увійшли 33 жінки з НОР, яким проводилася модифікована схема КОС ГТ та мелатоніном з метою зменшення шкідливої дії оксидативного стресу (ант-ГнРГ+ лМГ+ Млт, n=16; а-ГнРГ+ лМГ+ Млт, n=17). Пацієнтки другої групи додатково отримували двотижневий превентивний курс мелатонін-гормонотерапії (3мг перорально, щоденно перед сном), що передував старту протоколу стимуляції.

Усім пацієнткам проведено динамічне клініко-інструментальне обстеження, що дозволяло комплексно оцінити стан репродуктивної системи та оваріального резерву згідно до Наказу Міністерства охорони здоров'я

України №787 від 09.09.2013 р. про затвердження порядку застосування ДРТ в Україні.

Гормональні дослідження включали вивчення рівнів ФСГ, ЛГ, ПРЛ, Е₂, прогестерону, тестостерону, кортизолу та АМГ в сироватці крові імуноферментним методом за допомогою стандартних ІФА-наборів системи ELISA «IBL», Німеччина.

Вивчення роботи АОС та активності оксидативного стресу проводилось за допомогою визначення мелатоніну та 8-ізопростану в сироватці крові на 2-3 день менструального циклу та фолікулярній рідині, отриманій під час забору яйцеклітин шляхом трансвагінальної пункції. Вимірювання виконували методом ІФА за допомогою наборів Melatonin ELISA Kit, 8-Isoprostane ELISA Kit «IBL» (Німеччина) на флюороімуноному аналізаторі 1420 VIKTOR фірми “WALLACOY” (Фінляндія).

Усім жінкам обстежених груп проводилися динамічні ультразвукові дослідження протягом вагітності за допомогою апарату «SonoAce 8000 SE» (фірми «Medison», Корея, 2007), який має доплерівський блок, із застосуванням комбінованого датчика з частотою 3,5 МГц, працює в імпульсному режимі із частотним фільтром 100 Гц.

При дослідженні яєчників вимірювали їх розміри, структуру та стан фолікулярного апарату. За допомогою трансвагінального датчика на 3-4 день менструального циклу усім пацієнткам визначали стан оваріального резерву. Для кожного яєчника при скануванні підраховували об'єм яєчника, котрий визначали за формулою $0,5236 \times D1 \times D2 \times D3$, де D1 - повздовжній, D2 - передньозадній, D3 – поперечний розмір яєчника; кількість антральних фолікулів діаметром від 2 до 10 мм у кожному яєчнику; середній діаметр лідируючого фолікула $0,5 \times (a + b)$, де а і b його перпендикулярні розміри. УЗД-моніторинг проводили для оцінки динаміки росту та дозрівання фолікулів, оцінки товщини ендометрія. Спочатку на 2-3 день менструального циклу, надалі – на протязі усього періоду стимуляції суперовуляції. Дозрілим

фолікул вважали при розмірах 18 мм, концентрації естрадіолу в сироватці крові понад 300-400 пг/мл, з підрахунку на кожний фолікул.

Пункція фолікулів та аспірація фолікулярної рідини (забір ооцитів) виконувались в умовах малої операційної під контролем трансвагінальної ехографії на апаратах SONOACE PICO. Використовувались голки для аспірації ооцитів COOK (Австралія). Кількість яйцеклітин, кількість та якість ембріонів оцінювалась в умовах ембріологічної лабораторії за допомогою мікроскопів NIKON ECLIPSE TE 2000-U (Японія), ZEISS STEMI SV (Німеччина).

За допомогою УЗД оцінювали динаміку наростання ендометрія. Усім пацієнткам, у котрих темпи росту ендометрія були знижені і не відповідали 2-4 мм в перший день КОС (2-3 день МЦ), 10-12 мм в останні дні КОС, призначали відповідну терапію. УЗД вагітності виконували на 21 день після ембріотрансферу з метою візуалізації плідного яйця в порожнині матки та жовтого тіла у яєчнику, визначення серцебиття плоду визначали у терміні вагітності 4-5 тижнів.

Обстеження на наявність інфекцій сечостатевої системи включало в себе мікроскопію мазка виділень з піхви, пофарбованого за Грамом, за необхідністю – посів на середовища для виявлення збудника, ПЦР або ІФА дослідження (*Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma urealiticum*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonada vaginalis*, ЦМВ, ВПГ, ВПЛ). Оцінка стану біоценозу піхви виконувалась за допомогою спеціального дослідження Фемофлор 4, 6, 12. Відсутність інфекцій, що входять до складу TORCH-комплексу, а також сифілісу, гонореї, гепатиту, було обов'язковою умовою до включення пацієнток до програм ДРТ.

Статистична обробка результатів досліджень проводилася на персональному комп'ютері з використанням параметричних та непараметричних методів варіаційної статистики за допомогою прикладного програмного забезпечення «Statistica» (StatSof, 2006).

Комісією з біоетики Харківського національного медичного

університету встановлено, що дане дослідження не суперечить основним біоетичним нормам (протокол № 5 від 06.05.2015).

Віковий склад основної групи коливався від 24 до 45 років, середній вік складав $36,00 \pm 4,86$ років, медіана знаходилась на рівні 36 років, в контрольній групі коливався від 23 до 35, середній вік складав $28,67 \pm 2,61$ років, медіана знаходилась на рівні 28 років.

Структура основної групи була представлена пацієнтками з низьким оваріальним резервом. Більшість пацієнток основної групи - 90,9% мали рівні АМГ нижче 1,1 нг/мл, в 29% були низькі показники ЧАФ, в 27% - пізній репродуктивний вік, в 24 % - перенесені операції на яєчниках, в 20% - НВЯ в попередньому циклі ЕКЗ. 9% (n=6) пацієнток основної групи мали нормативні значення АМГ у поєднанні з трьома іншими факторами ризику: НВЯ в попередньому циклі ЕКЗ, операції на яєчниках в анамнезі, знижене ЧАФ.

Серед жінок основної групи провідною скаргою було безпліддя. Середня тривалість безпліддя у пацієнток основної групи склала $9,14 \pm 3,18$ років ($M \pm \sigma$), що було обумовлено тривалим попереднім лікуванням з приводу даного захворювання, у тому числі попередніх спробах ЕКЗ, які не були ефективні.

Аналіз конституційного типу показав, що середній показник зросту основної групи складав $165,44 \pm 6,37$ см, і вірогідно не відрізнявся від контрольної групи $163,40 \pm 5,82$ см. Середня маса тіла пацієнток основної групи складала $65,73 \pm 12,41$ кг, порівняно $59,2 \pm 10,88$ кг в контрольній групі. Гіперстенічний конституційний тип, ІМТ = 25-30 (предожиріння), зустрічався у 32% (n=21) пацієнток основної групи, що на 12% частіше, порівняно з контрольною групою - 20% (n=6), що пояснювалось більш старшою віковою структурою пацієнток з безпліддям. Астенічний тип, ІМТ = 16-18,5, зустрічався в 9% пацієнток основної групи, і значно не відрізнявся від контрольної групи - 10%.

Аналіз характеру менструальної функції показав, що у всіх жінок основної і контрольної групи до 33 років мав місце регулярний менструальний цикл. У 90% основної групи середній вік менархе складав $13,4 \pm 2,8$ років, і вірогідно не відрізнявся від контрольної групи. Пізнь менархе було виявлено у 10% пацієнток з безпліддям. Тривалість менструального циклу, характер та тривалість менструацій мали значні відмінності в основній і контрольній групах, тривалість менструального циклу коливалась від 24 до 32 днів. Середня довжина менструального циклу складала $27 \pm 3,5$ днів. Укорочення менструального циклу було виявлено в 20% випадків основної групи. Усі випадки вкорочення менструального циклу були виявлені у жінок віком від 35 років.

Дані інфекційної патології, що могла нанести шкідливий вплив на процес запліднення та розвиток плода, свідчили, що у 33,3% ($n=22$) жінок з безпліддям та 36,7% ($n=11$) жінок контрольної групи були виявлені IgG з високою авідністю до інфекцій TORCH-комплексу методом ІФА. Токсоплазмоз мав місце в 8-10% випадків, цитомегаловірусна інфекція в 3-5% випадків, віруси герпесу в 3-7% випадків.

Репродуктивний анамнез показав, що в 44% ($n=29$) жінок основної групи мало місце вторинне безпліддя. Серед жінок з вторинним безпліддям в 28% випадків в анамнезі були виявлені самовільні викидні у терміні до 12 тижнів вагітності, в 41% штучні аборти, кількість яких коливалась від 1 до 4. В 20% (6) випадків вагітність закінчилась строковими пологами, в 17% (5) випадків – передчасними. Заслужовує увагу висока частота самовільних викиднів у жінок з безпліддям – 28% порівняно з контрольною групою – 10%.

Провідне місце в структурі гінекологічної захворюваності серед жінок основної групи посів хронічний сальпінгоофорит у стадії ремісії в 39 % ($n=26$), що в 2,3 рази перевищувало контрольну групу – 17% ($n=5$). Ці дані свідчили на користь трубно-перитонеального генезу безпліддя у пацієнток основної групи. Операції з видалення маткових труб були в анамнезі у

68,2% (45) жінок основної групи, показаннями до оперативного лікування у 62,2% (28) випадків були порушена або прогресуюча позаматкова вагітність, в 37,8% (17) – гідросальпінкс.

Операції на яєчниках та фолікулярному апараті були в анамнезі у 24,2% (16) основної групи. В 6 випадках мали місце радикальні операції по типу однобічних аднексектомій з приводу кістозних утворень, в 10 випадках – резекції тканини яєчника у різному обсязі. Лікувально-діагностичні лапароскопії та реконструктивні операції з приводу відновлення прохідності маткових труб та роз'єднання злук були в анамнезі у 24,2% пацієнток основної групи. Аналізуючи обсяг хірургічного втручання та хірургічний доступ було виявлено 57 (60%) випадків хірургічних втручань ендоскопічним доступом, та 38 (40%) лапаротомним доступом. Усього виявлено 95 випадків перенесених оперативних втручань з черевно-порожнинним доступом у 66 пацієнток з безпліддям. 60,6% жінок мали більше однієї перенесеної операції в анамнезі. Таким чином переважна більшість пацієнток основної групи мали обтяжений гінекологічний анамнез, в основному за рахунок перенесених запальних, інфекційних, дисгормональних захворювань репродуктивної системи та оперативних втручань з приводу гінекологічної патології в анамнезі. Таким чином, операції на придатках матки, зокрема резекції яєчників, відіграють важливу патогенетичну роль в передчасному виснаженні оваріального резерва, втратах фолікулярного апарата, зниженні репродуктивного потенціалу та формуванні НОР.

Оцінка стану оваріального резерву в нашому дослідженні проводилась за допомогою вимірювання наступних параметрів: ЧАФ, АМГ, ФСГ, об'єму яєчників.

Сумарна кількість антральних фолікулів в обох яєчниках у жінок з безпліддям коливалась від 3 до 15, середній показник складав $6,53 \pm 2,64$. У здорових жінок контрольної групи ЧАФ коливалось від 10 до 35, середній показник вірогідно відрізнявся від основної групи і складав $19,97 \pm 7,26$

($p < 0,01$). Мінімальне ЧАФ серед пацієнток з безпліддям зустрічалось в 5 (9%) випадках, і не зустрічалось у здорових жінок. Знижене ЧАФ 5-7 серед пацієнток з безпліддям зустрічалось в 36 (51%) випадках, і також не зустрічалось у здорових жінок. Помірне ЧАФ 8-10 було визначене в 19 (26%) випадках основної групи і вірогідно відрізнялося від контрольної групи - 3 (10%) випадки ($p < 0,05$). Нормальне ЧАФ, більше 11, спостерігалось лише в 14 % жінок з безпліддям, порівняно з 90 % жінок у контрольній групі ($p < 0,01$). Таким чином більше половини (51%) жінок з безпліддям мали знижене ЧАФ, яке коливалось від 5 до 7, що відповідає Болонським критеріям «поганих відповідей». Більшість здорових жінок (90%) мали ЧАФ понад 11. На окрему увагу заслуговують пацієнтки з перенесеною однобічною аднексектомією ($n=4$), ЧАФ у єдиному яєчнику коливалось від 7 до 10, що спонукало пацієнток до спроб отримання власного ооцита в програмі ДРТ. Пацієнткам з ЧАФ 0-3 попередньо була рекомендована програма донорства ооцита, вони не брали участь у дослідженні, враховуючі вкрай високий ризик «відміни циклу». Середні показники об'єму яєчника істотно не відрізнялися в першій та другій групі і складали $5,01 \pm 2,10 \text{ см}^3$ та $4,76 \pm 1,72 \text{ см}^3$ відповідно. Звертали на себе увагу дещо нижчий об'єм яєчників у пацієнток основної групи, порівняно з контрольною групою, що пояснювалось перенесеними оперативними втручаннями за тимом резекції яєчників та видалення кістозних утворень в анамнезі пацієнток з безпліддям.

При оцінці стану репродуктивної системи та оваріального резерву за допомогою гормональних показників було виявлено, що рівні АМГ в основній групі коливались від 0,1 до 1,2 нг/мл, в контрольній групі від 1,2 до 2,5 нг/мл. Середній рівень АМГ у безплідних жінок з НОР $0,53 \pm 0,04$ нг/мл був в 3 рази нижче, порівняно зі здоровими жінками-донорами $1,85 \pm 0,07$ нг/мл ($p < 0,01$). Середній рівень АМГ в першій групі складав $0,48 \pm 0,05$ нг/мл, вірогідно не відрізнялися від середнього показника АМГ в

другій групі, який складав $0,59 \pm 0,06$ нг/мл, що свідчить на користь однорідності поділу основної групи за даним показником.

Рівень ФСГ в основній групі мав широкі коливання від 3,5 до 21 мМО/мл, середній показник складав $10,66 \pm 3,73$ мМО/мл, що мало вірогідну різницю з контрольною групою, в якій рівень ФСГ мав меншу амплітуду коливання від 2,4 до 9,6 мМО/мл і в середньому складав $5,95 \pm 1,58$ мМО/мл, що було в 2 рази нижче, ніж у жінок з безпліддям ($p < 0,05$). Середній показник ФСГ не мав статистично значущої різниці між пацієнтами з безпліддям першої та другої групи.

Рівні ЛГ у жінок з безпліддям коливались у межах нормативних значень від 2,3 до 11,9 мМО/мл, середній показник в першій групі складав $6,48 \pm 2,20$ мМО/мл, в другій групі $6,02 \pm 2,92$ мМО/мл. В контрольній групі рівень ЛГ коливався від 2,8 до 7,8 мМО/мл, середнє значення складало $6,53 \pm 1,34$ мМО/мл. Не знайдено статистично значущих відмінностей між середніми показниками ЛГ в основній та контрольній групах.

Стандарне відношення $\text{ЛГ} / \text{ФСГ} = 1-1,5$ у ранню фолікулярну фазу, спостерігалось лише у 24,2% ($n=16$) жінок основної групи та у 83,3 % ($n=25$) жінок контрольної групи. Порушення відношення ЛГ / ФСГ у пацієток основної групи відбувалося за рахунок високих концентрацій ФСГ у жінок пізнього репродуктивного віку, та характеризувало порушення з боку оваріального резерву.

Базальні рівні естрадіолу в основній групі коливались від 16,29 до 87,30 пг/мл, у середньому складали $39,98 \pm 16,59$ пг/мл в I групі та $38,49 \pm 17,85$ пг/мл в II групі, і вірогідно відрізнялись від середніх показників Е2 у контрольній групі $23,50 \pm 7,15$ пг/мл ($p < 0,01$). Високі рівні Е2 мали позитивні кореляційні зв'язки з віком

Рівень ПРЛ у хворих на безпліддя жінок коливався від 145 до 507 мМО/мл. Високі рівні ПРЛ були зафіксовані в I групі $339,23 \pm 15,94$ мМО/мл, порівняно зі здоровими жінками в контрольній групі $246,07 \pm 11,80$ мМО/мл, де рівні ПРЛ коливались від 132 до 360 мМО/мл ($p < 0,05$).

Рівні тестостерону у жінок з безпліддям основної групи коливались від 0,3 до 3,9 нмоль/л та в 15 (22,7%) випадках перевищували нормативні значення (0,2-1,8 нмоль/л), проте середній показник складав $1,71 \pm 0,6$ нмоль/л і вірогідно не відрізнявся від середнього показника контрольної групи $1,39 \pm 0,45$ нмоль/л. Рівні тестостерону у здорових жінок контрольної групи коливались від 0,4 до 2,3 нмоль/л і також спостерігалась тенденція до помірного підвищення рівню тестостерону в 5 (16,6%) випадках.

Середні рівні кортизолу були вищими у пацієток з безпліддям в першій групі $366,88 \pm 97,59$ нмоль/л, порівняно з контрольною групою $278,50 \pm 66,73$ нмоль/л ($p < 0,05$), проте не перевищували нормативних значень в популяції.

Аналіз гормональних показників функціонування репродуктивної системи виявив статистично значущі відмінності між середніми показниками ФСГ, АМГ, ЛГ, ПРЛ, прогестерону та естрадіолу у жінок основної та контрольної групи, що пояснюється, в першу чергу, наявністю порушень з боку репродуктивної системи у пацієток з НОР, що є характерним для клінічного перебігу безпліддя. Варто зауважити, що простежувались певні кореляційні зв'язки не тільки між гормональними показниками, але й між гормональними показниками та віком жінки. Сильну кореляційну залежність було виявлено з показниками ФСГ, АМГ, ЛГ, Е2 у жінок старше 33 років. Помітне підвищення рівня ФСГ починається у пацієток після 33 років, зокрема, у жінок з безпліддям у вікових діапазонах з 34-37 років, 38-41 рік та 42-45 років. Виключення з правила складали 6% жінок з безпліддям, у яких незважаючи на пізній репродуктивний вік ≥ 33 років спостерігались низькі рівні ФСГ < 8 мМО/мл, високі базальні рівні Е2 ≥ 35 пг/мл, низькі рівні АМГ $< 1,0$ нг/мл, які свідчили на користь зниженого оваріального резерву. Рівні АМГ мають чітку тенденцію до зниження у старших вікових групах. Мінімальні значення АМГ спостерігались у жінок після 40 років, проте існувало 7,5 % ($n=5$) винятків, коли у жінок з безпліддям старшої вікової групи 38-41 років ($n=3$) та 42-45 років ($n=2$), спостерігались відносно високі

рівні АМГ від 0,9 до 1,1 нг/мл, що свідчило на користь збереженого оваріального резерву та позитивно корелювало з високим ЧАФ у цих пацієнток.

Оцінка маркерів оксидативного стресу полягала у визначенні рівнів 8-ізопростану та мелатоніну. Рівні мелатоніну в сироватці крові пацієнток з безпліддям коливались від 14,80 до 35,04 пг/мл, середнє значення складало $21,60 \pm 4,77$ пг/мл, медіана і мода складали 19,44 і 19,08, відповідно, що свідчить про відносно симетричний розподіл даних. В контрольній групі рівні мелатоніну коливались від 18,10 до 47,36 пг/мл, середній показник складав $37,55 \pm 6,65$, що в 1,73 рази перевищувало показники основної групи ($p < 0,001$).

Індивідуальний інтервал вмісту 8-ізопростану в сироватці крові обстежених жінок в основній групі коливався від 32,27 до 81,34 пг/мл, середній показник і медіана складали $66,87 \pm 10,51$ пг/мл та 67,47 пг/мл відповідно і в 1,5 рази перевищували показники контрольної групи ($p < 0,001$).

Звертала на себе увагу тенденція розподілу маркерів оксидативного стресу всередині досліджуваних груп згідно до вікових діапазонів. Аналізуючи вміст МЛТ в сироватці крові у пацієнток з безпліддям була визначена тенденція зниження цього показника з віком. Так у пацієнток вікового діапазону 20-25 років середні рівні МЛТ складали $27,51 \pm 3,8$ пг/мл, тоді як у пацієнток 42-45 років середній показник складав $22,87 \pm 2,28$ пг/мл ($p < 0,05$).

Середні рівні 8-ІЗП мали тенденції до підвищення показників в більш старших вікових групах. Так у пацієнток 20-25 років середні рівні 8-ІЗП були вірогідно вищими і складали $43,47 \pm 6,4$ пг/мл, порівняно жінками 42-45 років $61,43 \pm 8,4$ пг/мл, де рівні 8-ІЗП були максимальними ($p < 0,05$). Аналіз залежностей в системі МЛТ – 8-ІЗП визначив зворотній кореляційний зв'язок між показниками.

Враховуючи різницю вікової структури пацієнток основної та контрольної групи, було проаналізовано залежність маркерів оксидативного

стресу відносно вікових діапазонів в контрольній групі. Зниження вмісту МЛТ спостерігалось після 30-33 років, порівняно з більш молодшими групами. Проте, середні рівні МЛТ залишались вірогідно вищими $33,77 \pm 4,5$ пг/мл, порівняно з пацієнтками основної групи - $19,86 \pm 3,8$ нг/мл ($p < 0,01$). Дослідження не дозволило виявити вірогідне зниження 8-ІЗП з віком, це пояснювалось більш молодшою структурою пацієнток контрольної групи, що не дозволяло повноцінно відстежити дану тенденцію у жінок-донорів.

На основі отриманих даних були розроблені нормативні показники 8-ІЗП та МЛТ в сироватці крові для жінок репродуктивного віку. Рекомендовані нормативні значення МЛТ ($30,9 - 44,1$ пг/мл) в сироватці крові можуть бути використані для оцінки роботи АОС, зокрема мелатонін-антиоксидантного захисту в організмі жінки репродуктивного віку у дослідженому віковому діапазоні 25-35 років. Запропоновані нормативні значення 8-ІЗП ($30,65 - 58,57$ пг/мл) у жінок репродуктивного віку можуть бути використані для оцінки рівню оксидативного стресу в організмі, проте 8-ІЗП є високочутливим маркером оксидативних реакцій при багатьох дегенеративних та запальних захворюваннях. визначення показників МЛТ та 8-ІЗП в фолікулярній рідині.

Вивчення показників оксидативної активності в фолікулярній рідині в умовах оваріальної стимуляції ГТ і множинного зростання фолікулів, яке призводить до активізації процесів перекисного окислення ліпідів мембранних структур всередині фолікула, включало визначення рівнів 8-ізопростану та мелатоніну. Середні показники МЛТ в фолікулярній рідині у пацієнток першої групи складали $33,86 \pm 5,76$ пг/мл, які були у 1,5 рази нижче середніх показників в другій групі $58,41 \pm 4,96$ пг/мл ($p < 0,05$), і в 1,8 рази нижче середніх показників контрольної групи $62,08 \pm 11,99$ пг/мл ($p < 0,001$). Тоді як рівні 8-ІЗП в цій групі були найвищими, і складали $346,05 \pm 65,13$ пг/мл, що свідчить на користь високої активності ОС в фолікулярній рідині.

Заслужували увагу рівні МЛТ та 8-ІЗП в фолікулярній рідині другої групи, яка отримувала протокол КОС з мелатоніном. На користь

антиоксидантного впливу цього препарату свідчать нижчі рівні 8-ІЗП $256,53 \pm 53,76$ пг/мл, порівняно з першою групою $346,05 \pm 65,13$ пг/мл ($p < 0,001$), яка знаходилась в таких же умовах, проте не отримувала мелатонін-гормонотерапію.

Для оцінки оксидативного впливу ГТ під час КОС проведено динамічну оцінку показників ОС. Оцінювались рівні МЛТ та 8-ІЗП в сироватці крові до початку стимуляції (на старті протоколу) у пацієнок з безпліддям, яким застосовано стандартний протокол КОС (перша група), у пацієнок з безпліддям, яким застосовано модифікований протокол КОС з АМГТ (друга група), пацієнткам контрольної групи, яким застосовано стандартний протокол КОС, та після завершення стимуляції мультифолікулярного зростання ГТ перед призначенням тригерної дози ХГ.

Динаміка показників ОС в сироватці крові до і після протоколів КОС, свідчить про виражений оксидативний вплив ГТ на організм. Під впливом ГТ рівні 8-ІЗП збільшуються в десятки разів, що відображали показники першої групи: на старті протоколу середні рівні 8-ІЗП склали $56,87 \pm 10,51$ пг/мл, що в 20 разів менше порівняно з $1061,70 \pm 173,26$ пг/мл ($p < 0,001$) після стандартного протоколу КОС. Рівні МЛТ також мають тенденцію до зниження в ході КОС. У пацієнок першої групи на старті протоколу КОС середні значення МЛТ склали $23,32 \pm 5,11$ пг/мл, порівняно з $8,25 \pm 1,24$ після протоколу стимуляції ($p < 0,001$). Така ж тенденція відмічається і у пацієнтів другої групи, які додатково отримували препарати мелатоніну, початкові рівні МЛТ в сироватці крові склали $25,04 \pm 4,93$ пг/мл і вірогідно не відрізнялися від першої групи. Після КОС спостерігалось вірогідне зниження в 3,5 разів рівнів МЛТ, порівняно зі стартом протоколу $7,97 \pm 1,38$ пг/мл ($p < 0,001$). Хоча мелатонін-гормонотерапія не підвищує рівні МЛТ в сироватці крові хворих на безпліддя пацієнок в програмах ДРТ, проте вона вірогідно зменшує рівень ОС, про що свідчить в 3 рази нижчий вміст 8-ІЗП – $313,89 \pm 41,22$ пг/мл, порівняно з першою групою – $1061,70 \pm 173,26$ пг/мл ($p < 0,001$), і в 1,2 рази порівняно з контрольною групою – $352,82 \pm 68,60$ пг/мл

($p < 0,01$) в фолікулярній рідині другої групи, яка отримувала модифікований протокол КОС.

Для оцінки ефективності проведеної АМГТ використовували клінічні дані щодо оваріальної відповіді на КОС, якості та кількості отриманих яйцеклітин і рівня клінічних вагітностей, також оцінювалась динаміка показників ОС (8-ІЗП) та МЛТ в сироватці крові. З об'єктивних причин не проводилась оцінка динаміки рівнів МЛТ та 8-ІЗП в фолікулярній рідині у одного ж і того пацієнта до і після АМГТ, проте порівнювались показники фолікулярної рідини між групами.

Дослідження не виявило достовірних відмінностей у якості оваріальної відповіді в залежності від використаної схеми КОС з а-ГнРГ або ант-ГнРГ, проте була зафіксована вірогідна різниця в кількості фолікулів, ооцитів, перенесених ембріонів між пацієнтками з НОР, які отримували стандартні протоколи КОС і пацієнтками з НОР, які отримували модифіковану схему КОС з АМГТ. Також спостерігалось вірогідне покращення зрілості ооцитів і процент запліднюваності у жінок з НОР другої групи, порівняно з жінками з НОР першої групи ($p < 0,05$), що свідчить на користь протекторного впливу АМГТ на зрілий ооцит в програмах ДРТ.

Проведено порівняльний аналіз ранніх етапів ембріогенезу у пацієнток з НОР в залежності від схеми КОС, інтенсивність дроблення оцінювалась за кількістю бластомерів у ембріонів в день перенесення в порожнину матки жінки (на 2-3 добу культивування). Уповільнення або зупинка розвитку ембріонів на стадії до 4-х бластомерів (після культивування протягом 48 годин зі стадії пронуклеусів) була характерними ознаками порушення розвитку ембріонів в культуральних середовищах і відображала якість отриманих ооцитів. Проведений нами аналіз розподілу ембріонів по числу бластомерів показав, що кількість ембріонів на стадії більше 4-х бластомерів достовірно не відрізнявся в групі жінок які отримували традиційні схеми КОС з а-ГнРГ або ант-ГнРГ без АМГТ, ($1,84 \pm 0,38$) і ($1,71 \pm 0,28$) відповідно,

проте була нижчою, ніж у жінок з НОР, які отримували АМГТ, ($2,2 \pm 0,24$) і ($2,64 \pm 0,21$) відповідно ($p < 0,05$).

Частота НВЯ була найвищою в першій групі, в якій складала 84%, що 1,26 разів вище, ніж в другій групі – 66,6%, яка отримувала КОС з АМГТ ($p < 0,05$). У пацієток з НОР першої групи було зафіксовано три випадки «відміни циклу», тоді як в другій групі таких епізодів не виникало.

Відсоток настання біохімічних вагітностей у пацієток з НОР другої групи складав 40 %, клінічних вагітностей – 20%, народження живих дітей – 15%, порівняно з першою групою, яка не отримувала АМГТ, в якій відсоток біохімічних вагітностей складав 25% , клінічних вагітностей – 12% , живонародження – 3%.

Таким чином, в результаті застосування модифікованого протоколу КОС з а-ГнРГ та ант-ГнРГ з АМГТ у пацієток з НОР другої групи спостерігались вірогідно вищі показники настання біохімічної, клінічної вагітності та живонародження, порівняно з першою групою, яка отримувала стандартні протоколи КОС з а-ГнРГ та ант-ГнРГ без додаткового антиоксидантного захисту ($p < 0,01$). Отримані результати свідчать, що незважаючи на низькі показники оваріального резерву, в ході застосування модифікованої схеми КОС з АМГТ були отримані зрілі ооцити достатньо високої якості, що обумовило високу результативність ДРТ у даної групи пацієнтів з НОР.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, присвяченій проблемі покращення ефективності програм ДРТ у жінок з низьким оваріальним резервом, розроблені та впроваджені методи гормональної корекції оксидативних порушень, які виникають на фоні контрольованої стимуляції яєчників і призводять до формування недостатньої оваріальної відповіді.

Дослідження дозволило зробити наступні висновки:

1. Оцінка стану оваріального резерву та корекція недостатньої оваріальної відповіді у жінок з безпліддям є актуальною та своєчасною проблемою гінекології, що обумовлено неухильним зростанням частоти безпліддя (17-19,5% загальної популяції подружніх пар), та станом демографічної ситуації на Україні. Основними патогенетичними факторами зниження оваріального резерву є вікові зміни фолікулярного апарату та перенесені оперативні втручання на яєчниках, які призводять до порушень менструального циклу, змінами гормонального статусу та формування недостатньої оваріальної відповіді на КОС у 80,9% пацієнток.
2. Застосування контрольованої стимуляції яєчників з використанням а-ГнРГ або ант-ГнРГ, як етапу ЕКЗ або ІКСІ, викликає стійкі оксидативні порушення у 76,8% пацієнток, які проявляються підвищенням рівнів 8-ІЗП у сироватці крові від 58,5 пг/мл до 78,6 пг/мл та від 180,5 до 410,9 пг/мл у фолікулярній рідині та зменшенням рівнів МЛТ від 30,9 пг/мл до 18,9 пг/мл у сироватці крові, від 74,5 пг/мл до 28,2 пг/мл у фолікулярній рідині.
3. При підвищенні активності оксидативного стресу в фолікулярній рідині спостерігається зменшення кількості зростання та дозрівання ооцитів у яєнику, що призводить до розвитку НВЯ, отримання менше 3 ооцитів у відповідь на контрольовану стимуляцію яєчників, що визначається у 56,5% жінок з НОР.

4. 8-ізопростан є високоінформативним маркером ранньої діагностики оксидативних порушень у жінок за безпліддям з 90% чутливістю та 81% специфічністю. Збільшення рівнів 8-ІЗП у сироватці крові та фолікулярній рідині призводить до отримання ооцитів низької кількості та якості.
5. Високий вміст МЛТ у сироватці крові та фолікулярній рідині у жінок з безпліддям позитивно впливає на дозрівання ооцитів під час КОС. Вміст МЛТ у фолікулярній рідині в 2,5-5,5 разів перевищує рівні МЛТ у сироватці крові. Низькі рівні МЛТ в фолікулярній рідині корелюють з найменшою кількістю отриманих ооцитів та низькими показниками клінічних вагітностей.
6. Застосування модифікованих схем КОС з мелатоніном із метою гормональної корекції оксидативних порушень під час КОС дозволяє збільшити кількість ооцитів, покращити ступінь їх зрілості та якості, коефіцієнт запліднення та збільшити рівень клінічних вагітностей у хворих на безпліддя жінок з НОР на 55,3%.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Усім жінкам з безпліддям, які потребують застосування ДРТ, є доцільним проведення комплексної оцінки стану оваріального резерву за допомогою тестів оваріального резерву. Підвищення рівнів ФСГ ≥ 11 мМО/мл, зниження рівнів АМГ $< 1,1$ нг/мл, підвищення базальних рівнів естрадіолу ≥ 35 пг/мл, зменшення співвідношення ЛГ/ФСГ < 1 , зниженням ЧАФ $< 5-7$, необхідно оцінювати як низький оваріальний резерв, який призводить до високого ризику низької відповіді яєчників в програмах ДРТ.
2. Використання ЧАФ як маркеру оваріального резерву у поєднанні з маркерами ОС (8-ізопростан, мелатонін) дозволяє найбільш чітко прогнозувати оваріальну відповідь на стимуляцію ГТ. При ЧАФ менше 5 необхідно інформувати пацієнтів про низьку імовірність отримання власного ооцита при КОС і рекомендувати донорську яйцеклітину.
3. Зниження базальних рівнів МЛТ $< 30,9$ пг/мл, підвищення 8-ізопростану $\geq 58,5$ пг/мл в сироватці крові у жінок репродуктивного віку варто оцінювати як низьку природну антиоксидантну активність, високий ризик виникнення оксидативного стресу під час КОС та отримання ооцитів низької якості.
4. Застосування модифікованих схем контрольованої оваріальної стимуляції ГТ з мелатоніном у дозі 3 мг на добу протягом 2 тижнів до старту протоколу та під час КОС є доцільним для покращення оваріальної відповіді й підвищення рівня вагітностей у жінок з НОР.
5. Застосування модифікованих схем оваріальної стимуляції ГТ з АМГТ є доцільним для покращення оваріальної відповіді у жінок з НОР і підвищення коефіцієнта запліднення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Акушерство, гинекология и здоровье женщины / Ф. Карр [и др.] ; пер. с англ. [Р. В. Парменов] ; под общ.ред. В. И. Прилепской. – Москва : МЕДпресс-информ, 2005. – 174 с.
2. Арушанян Э. Б. Беременность и эпифиз / Э. Б. Арушанян // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2012. – Т. 12, № 6. – С. 29–34.
3. Арушанян Э. Б. Гормон мозговой железы эпифиза мелатонин– универсальный естественный адаптоген / Э. Б. Арушанян, Э. В. Бейер // Успехи физиологических наук. – 2012. – Т. 43, № 3. – С. 82–100.
4. Александрова Н. В. Современные подходы к оценке овариального резерва у женщин с преждевременной недостаточностью яичников (обзор литературы) / Н. В. Александрова, Л. А. Марченко // Проблемы репродукции. – 2007. – № 2. – С. 22–29.
5. Анисимов В. Н. Световой режим, мелатонин и риск развития рака / В. Н. Анисимов, И. А. Виноградова // Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 5, № 5. – С. 491–498.
6. Анисимов В. Н. Эпифиз, биоритмы и старение организма / В. Н. Анисимов // Успехи физиологических наук. – 2008. – Т. 9, № 4. – С. 52–76.
7. Бабенко І. В. Диференційний підхід до лікування безплідності в допоміжних репродуктивних технологіях у поганих відповідачів / І. В. Бабенко // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2013. – Т. 76, № 4. – С. 69–72.
8. Безплідність у шлюбi : навчальний посібник / Ю. С. Парашук О. І. Каліновська, М. Г. Грищенко, В.Ю. Парашук. – Харків : ХНМУ, 2014. – 126 с.
9. Бесплодие в семье (причины, методы диагностики и лечения) : методические указания для студентов и врачей-интернов / сост.: Ю. С. Парашук, О. И. Калиновская. – Харьков : ХНМУ, 2012. – 43 с.

10. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению : руководство / под ред. Г. Т. Сухих, Т. А. Назаренко. – 2-е изд. испр. и доп. – Москва : Гэотар-Медиа, 2010. – 784 с.
11. Біла В. Система планування сім'ї та охорони репродуктивного здоров'я в Україні / В. Біла, Ю. Нікітіна, Л. Сазоненко // Управління закладом охорони здоров'я. – 2014. – № 6. – С. 30–39.
12. Блох М. Е. Психологическая помощь в комплексном подходе к решению проблем репродуктивного здоровья / М. Е. Блох, И. В. Добряков // Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. – Т. 62, № 3. – С. 16–19.
13. Божук О.А. Материнство як особливий прояв нужди та потребнісно-мотиваційної сфери особистості жінки // Архів психіатрії. – 2013. – Т. 19, № 1. – С. 120–123.
14. Боярский К. Ю. Факторы, определяющие овариальный резерв женщины (обзор литературы) / К. Ю. Боярский, С. Н. Гайдуков, А. С. Чкуасели // Журнал акушерства и женских болезней. – 2009. – Т. 58, № 2. – С. 65–71.
15. Боярский К. Ю. Фолликулогенез и современная овариальная стимуляция (обзор литературы) / К. Ю. Боярский // Проблемы репродукции. – 2002. – № 1. – С. 36–43.
16. Боярский К. Ю. Функциональные тесты, определяющие овариальный резерв / К. Ю. Боярский // Проблемы репродукции. – 1998. – № 3. – С. 26–31.
17. Виноградова И. А. Влияние светового режима на развитие метаболического синдрома у крыс в процессе старения / И. А. Виноградова // Успехи геронтологии. – 2007. – Т. 20, № 2. – С. 70–75.
18. Виноградова И. А. Световые режимы и овуляторная функция у крыс в онтогенезе / И. А. Виноградова, И. В. Чернова // Российский

- физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 90–98.
19. Влияние возраста женщины на процесс оплодотворения ооцитов и развитие эмбрионов в культуре / О. А. Воробьева В. С. Корсак, Е. Л. Северова [и др.] // Проблемы репродукции. – 1998. – № 6. – С. 46–49.
 20. Влияние мелатонина и эпиталона на антиоксидантную систему крыс зависит от светового режима / И. А. Виноградова, В. А. Илюха, Т. Н. Ильина [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2006. – № 3. – С. 22–26.
 21. Влияние резекции яичников на их функциональный резерв / В. С. Корсак, В. Н. Парусов, А. А. Кирсанов, Э. В. Исакова // Проблемы репродукции. – 1996. – № 4. – С. 63–67.
 22. Влияние светового режима на развитие спонтанных опухолей у самок крыс / И. А. Виноградова, А. В. Букалев, М. А. Забежинский [и др.] // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 5, № 5. – С. 554–560.
 23. Влияние световой депривации на показатели гомеостаза, продолжительность жизни и развитие спонтанных опухолей у трансгенных мышей HER-2/neu / Д. А. Батулин, И. Н. Алимова, И. Г. Попович [и др.] // Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 50, № 3. – С. 332–338.
 24. Возможности применения мелатонина для коррекции различных патологических состояний (обзор литературы) / Л. И. Мальцева, Е. А. Гафарова, Г. Х. Гарипова, Ф. А. Фаттахова // Практическая медицина. – 2007. – № 20. – С. 16–19.
 25. Вспомогательные репродуктивные технологии: ориентир на пациента // Здоров'я України. – 2014. – № 1 : Гінекологія. Акушерство. Репродуктологія. – С. 36–39.

26. Гаспаров А. С. Интраоперационная и лапароскопическая эхография в репродуктивной гинекологии : практическое пособие / А. С. Гаспаров, А. К. Хачатрян. – Москва : МИА, 2013. – 72с.
27. Генетика репродукции : руководство / С. В. Денисенко, А. С. Дарий, М. И. Кононенко, Т. Э. Зерова-Любимова ; Клиника проблем планирования семьи. – Киев : Ферзь-ТА, 2008. – 650 с.
28. Гмурман В. Е. Теория вероятностей и математическая статистика / В. Е. Гмурман. – Москва : Высшая школа, 2001. – 479 с.
29. Гончарова Н. Д. Пинеальная железа и возрастная патология (механизмы и коррекция) / Н. Д. Гончарова, В. Х. Хавинсон, Б. А. Лапин. – Санкт-Петербург : Наука, 2007. – 168 с.
30. Грищенко В. И. Динамика экскреции мелатонина у женщин в конце беременности, во время нормальных родов и в послеродовом периоде / В. И. Грищенко, Д. И. Демиденко, Л. Д. Коляда // Акушерство и гинекология. – 1976. – № 5. – С. 27–29.
31. Грищенко В. И. О роли мелатонина в патогенезе дисфункциональных маточных кровотечений. / В. И. Грищенко, Н. А. Щербина, Ю. С. Парашук // Акушерство и гинекология. – 1977. – № 12. – С. 32–34.
32. Грищенко В. И. Роль эпифиза в физиологии и патологии женской половой системы / В. И. Грищенко. – Харьков : Вища школа, 1979. – 248 с.
33. Грищенко Н. Г. Патогенетичні основи вдосконалення допоміжних репродуктивних технологій у жінок, які перенесли хронічні запальні захворювання органів малого таза / Н.Г. Грищенко.- Харків, 2011. –363 с.
34. Громадське здоров'я : підручник / за ред. акад. НАМН України В. Ф. Москаленка ; Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця. – Вид. 3-тє.– Вінниця : Нова Книга, 2013. – 559 с.

35. Громова А. М. Роль перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы плодных оболочек при их преждевременном разрыве / А. М. Громова, Н. И. Митюнина, Э. И. Крутикова // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – № 2, т. 3. – С. 123–125.
36. Губина-Вакулик Г. И. Длительное круглосуточное освещение как фактор ускоренного старения пинеальной железы / Г. И. Губина-Вакулик, Л. А. Бондаренко, Н. Н. Сотник // Успехи геронтологии. – 2007. – Т. 20, № 1. – С. 92–95.
37. Данкович Н. А. Причины и формы бесплодия. Современные возможности диагностики и лечения / Н. А. Данкович, В. Н. Воробей-Виховская // Здоровье женщины. – 2013. – № 3. – С. 192–197.
38. Донської Б. В. Імунні фактори у репродукції. Прогнозування успішності репродуктивного процесу / Б. В. Донської // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2014. – № 4. – С. 53–59.
39. Ермоленко К. С. Секреция мелатонина у женщин старшего репродуктивного возраста / К. С. Ермоленко, С. И. Рапопорт, А. В. Соловьева // Клиническая медицина. – 2013. – Т. 91, № 7. – С. 52–54.
40. Заика М. В. 8-изопростан как маркер оксидантного стресса у больных с хронической сердечной недостаточностью / М. В. Заика, О. Н. Ковалева // Український кардіологічний журнал. – 2006. – № 4. – С. 55–57.
41. Иванов С. В. Возрастная морфология эпифиза человека: прижизненное исследование / С. В. Иванов // Успехи геронтологии. – 2007. – Т. 20, № 2. – С. 60–65.
42. Камінський В. В. Медико-соціальні та законодавчі аспекти медикаментозного аборту в Україні / В. В. Камінський, Н. Г. Прядко // Репродуктивна ендокринологія. – 2014. – № 3. – С. 30–35.

- 43.Карпенко В. Г. Исследование адренокортикотропного гормона и мелатонина у беременных с преэклампсией и анемией / В. Г. Карпенко // Проблемы медицины. – 2001. – № 3/4. – С. 16–17.
- 44.Квінан Д. Т. Протоколи для вагітностей високого ризику / Д. Т. Квінан, Д. С. Хоббінс, К. У. Спонг. – Київ : Фенікс, 2009. – 792 с.
- 45.Коваленко Р. И. Эпифиз в системе нейроэндокринной регуляции / Р. И. Коваленко // Основы нейроэндокринологии / под ред. В. Г. Шаляпиной, П. Д. Шабанова. – Санкт-Петербург : Элби-СПб, 2005. – С. 7–65.
- 46.Козуб М. І. Профілактика виникнення спайок після лапароскопії у хворих із безпліддям, зумовленим ендометріозом / М. І. Козуб, Л. І. Недоступ // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2008. – № 4. – С. 30–32.
- 47.Козуб Н.И. Экспериментальное обоснование и сравнительная оценка клинического использования радиоволновой энергии, аргоноплазменной коагуляции, противовоспалительного препарата «intercoat» и комплекса реабилитации после лапароскопического лечения пациенток с синдромом поликистозных яичников и трубноперитонеальным бесплодием /Н.И. Козуб, М. П. Сокол //Медицинские новости Грузии. – 2014.– № 3 (240). – С. 74–77.
- 48.Козуб Н. И. Вопросы оперативного и консервативного лечения пациенток с патологией яичников. Обзор конференции / Н. И. Козуб, И. Б. Вовк // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2013. – № 5. – С. 21–27.
- 49.Копков В. С. Допоміжні репродуктивні технології у вирішенні демографічних проблем. Правові аспекти / В. С. Копков // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2013. – № 4. – С. 55–57.
- 50.Коркушко О. В. Пинеальная железа : пути коррекции при старении / О. В. Коркушко, В. Х. Хавинсон, В. Б. Шатило. – Санкт-Петербург : Наука, 2006. – 203 с.

- 51.Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев : Морион, 2000. – 320 с.
- 52.Лекарственные средства в акушерстве и гинекологии / [Л. В. Адамян и др.] ; под ред. Г. Т. Сухих, В. Н. Серова. – 3-е изд., испр. и доп. – Москва : Гэотар-Медиа, 2010. – 312 с.
- 53.Лечение женского и мужского бесплодия: вспомогательные репродуктивные технологии / под ред. В. И. Кулакова, Б. В. Леонова, Л. Н. Кузьмичева. – Москва : МИА, 2005. – 592 с.
- 54.Малышкина А. И. Профилактика нарушений репродуктивной функции молодой семьи / А. И. Малышкина, М. В. Кулигина, Т. П. Васильева // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 3. – С. 94–97.
- 55.Мальцев Д. В. Возможности современной иммунотерапии в репродуктологии / Д. В. Мальцев // Репродуктивная эндокринология. – 2013. – № 5. – С. 45–55.
- 56.Манухин И. Б. Гинекологическая эндокринология : клинические лекции : [руководство для врачей] / И. Б. Манухин, Л. Г. Тумилович, М. А. Геворкян. – 3-е изд., перераб. – Москва : Гэотар-Медиа, 2013. – 267 с.
- 57.Марченко Ю. Новий порядок застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні / Ю. Марченко // Практика управління медичним закладом. – 2014. – № 1. – С. 11–16.
- 58.Маслій Ю.В. Порівняльна характеристика ефективності короткого протоколу з використанням агоністів та антагоністів гонадотропін-рилізінг гормонів та довгого лютеїнового протоколу з агоністами гонадотропін-рилізінг гормонів в циклах екстракорпорального запліднення у пацієнтів із слабкою відповіддю яєчників / Ю. В. Маслій, І. О. Судома // Репродуктивное здоровье женщины. – 2006. – № 2 (26). – С. 151–155.

59. Маслій Ю. В. Біохімічні маркери яєчникового резерву у пацієнтів із синдромом слабкої відповіді на стимуляцію гонадотропінами в циклах допоміжних репродуктивних технологій / Ю. В. Маслій // Здоровье женщины. – 2006. – № 3 (27). – С. 126–131.
60. Маслій Ю. В. Етіопатогенетичні чинники синдрому слабкої відповіді яєчників в циклах допоміжних репродуктивних технологій / Ю. В. Маслій, І. О. Судома, Г. Б. Лівшиць // Здоровье женщины. – 2006. – № 4 (28). – С. 152–157.
61. Маслій Ю. В. Запліднення у природних циклах як альтернативна лікувальна тактика у пацієнтів із синдромом слабкої відповіді яєчників на стимуляцію гонадотропінами / Ю. В. Маслій, І. О. Судома // Здоровье женщины. – 2007. – № 2 (30). – С. 178–182.
62. Мелатонин в комплексном лечении больных сердечно-сосудистыми заболеваниями / Р. М. Заславская, Г. В. Лилица, А. Н. Шакирова, Э. А. Щербань. – Москва : Медпрактика-М, 2005. – 192 с.
63. Мелатонин в норме и патологии : монография / В. Н. Анисимов, С. В. Анисимов, Э. Б. Арушанян [и др.] ; под ред. Ф. И. Комарова [и др.]. – Москва : Медпрактика-М, 2004. – 307 с.
64. Мишиева Н. Г. Бесплодие у женщин позднего репродуктивного возраста: принципы диагностики и лечения в зависимости от овариального резерва : дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.01 / Мишиева Нона Годовна ; Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии. – Москва, 2010. – 272 с.
65. Назаренко Т. А. Бесплодие и возраст: пути решения проблемы / Т. А. Назаренко, Н. Г. Мишиева. – 2-е изд. – Москва : МЕДпресс-информ, 2014. – 211 с.
66. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 21 січня 2014 № 59. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної

- допомоги "Планування сім'ї". Ч. I. // Репродуктивная эндокринология. – 2014. – № 1. – С. 92–102.
67. Наказ МОЗ і НАМН України № 1030/102 "Про удосконалення системи планування сім'ї та охорони репродуктивного здоров'я в Україні" від 29.11.2013 р. Методика організації діяльності системи планування сім'ї та охорони репродуктивного здоров'я в Україні // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2014. – № 1. – С. 12–27.
68. Наказ МОЗ України №787 від 09.09.2013 р. "Про затвердження Порядку застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні" (Із змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства охорони здоров'я № 165 від 06.03.2014) // Збірник нормативно-директивних документів з охорони здоров'я. – 2014. – № 5. – С. 4–40.
69. Орлова В. В. Мелатонін – універсальний гормон жіночого організму / В. В. Орлова, В. В. Сімрок, О. А. Коробкова // Здоровье женщины. – 2013. – № 5. – С. 110–116.
70. Петри А. Наглядная статистика в медицине / А. Петри, К. Сэбин ; пер. с англ. В. П. Леонова. – Москва: Гэотар-Мед, 2003. – 144 с.
71. Профілактика та лікування ускладнень вагітності після застосування екстракорпорального запліднення / М. О. Щербина, М. І. Антонян, В. В. Лазуренко [и др.] // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 2, ч. 1. – С. 337–339.
72. Репродуктивная эндокринология / Г. М. Кроненберг [и др.] ; пер. с англ. под ред. И. И. Дедова, Г. А. Мельниченко. – Москва : Рид Элсивер, 2011. – 409 с.
73. Репродуктивное здоровье женщины в XXI веке // Здоров'я України. – 2014. – № 10. – С. 40–41.
74. Сидельникова В. М. Эндокринология беременности в норме и при патологии / В. М. Сидельникова. – 2-е изд. – Москва : МЕДпресс-информ, 2009. – 351 с.

- 75.Современные аспекты репродуктивного здоровья женщины: данные международных исследований // Здоровье женщины. – 2013. – № 1. – С. 36–42.
- 76.Статистичний щорічник України за 2013 рік/за ред. О. Г. Осауленка, відп. за вип. О. А. Вишневська ; Державна служба статистики України. – Київ, 2014. – 534 с.
- 77.Судома І. О. Синдром слабкої відповіді яєчників у циклах екстракорпорального запліднення у пацієнток з аденоміозом / І. О. Судома // Український медичний часопис. – 2005. – № 2 (46). – С. 92–101.
- 78.Судома І. О. Характеристика гонадотропін-стимульованої відповіді яєчників у програмах екстракорпорального запліднення у пацієнток з аденоміозом / І. О. Судома // Клінічна Фармація. – 2005. – Т. 9, № 2. – С. 14–19.
- 79.Теория и практика репродуктивной медицины // Здоров'я України. – 2014. – № 1 : Гінекологія. Акушерство. Репродуктологія. – С. 28–29.
- 80.Фальконе Т. Репродуктивная медицина и хирургия / Т. Фальконе, В. В. Херд ; пер. с англ. под ред. Г. Т. Сухих. – Москва : Гэотар-Медиа, 2014. – 947 с.
- 81.Чорнописька Ю. Ф. Особливості підготовки та проведення циклів допоміжних репродуктивних технологій у жінок із безпліддям та надлишковою масою тіла / Ю. Ф. Чорнописька// Здоровье женщины. – 2014. – № 5. – С. 162–167.
- 82.Щербина Н. А. Токолитическая активность мелатонина при угрожающих преждевременных родах / Н. А. Щербина, Д. И. Демиденко, А. Д. Демиденко // Медицина невідкладних станів. – 2014. – № 5. – С. 100–102.
- 83.Щербина И. Н. Интенсивность перекисного окисления липидов у женщин в перименопаузе при проведении заместительной гормональной терапии / И. Н. Щербина, О. В. Мерцалова

- // Експериментальна та клінічна ендокринологія від теорії до практики (Шості Данілевські читання): матеріали науково-практичної конференції, Харків, 22-23 лютого 2007 р. – Харків, 2007. – С. 125–126.
84. Щербина И. Н. Определение ФСГ в качестве раннего маркера патологических проявлений перименопаузального периода / И. Н. Щербина, О. П. Липко // Врачебная практика. – 2007. – № 2. – С. 66–67.
85. Щербина И. Н. Роль мелатонина в патогенезе развития перименопаузального синдрома / И. Н. Щербина, О. П. Липко, Л. В. Потапова // Збірник наукових праць Асоціації акушерів-гінекологів України. – Київ: Інтермед. – 2007. – С. 764–768.
86. Экстрапинеальный мелатонин: место и роль в нейроэндокринной регуляции гомеостаза / И. М. Кветной Н. Т. Райхлин, В. В. Южаков, И. Э. Ингель // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – Т. 127, № 4. – С. 364–370.
87. Юзько А. М. Лечение бесплодия с использованием вспомогательных репродуктивных технологий в Украине / А. М. Юзько, Н. Г. Руденко // Здоровье женщины. – 2014. – № 3. – С. 153–157.
88. Юзько О. М. Клінічно-статистичний аналіз використання в Україні допоміжних репродуктивних технологій для лікування безпліддя / О. М. Юзько, Т. А. Юзько // Буковинський медичний вісник. – 2011. – Т. 15, № 3 (59). – С. 135–137.
89. Юзько О. М. Стан та перспективи використання допоміжних репродуктивних технологій при лікуванні безпліддя в Україні / О. М. Юзько, Т. А. Юзько, Н. Г. Руденко // Здоровье женщины. – 2013. – № 8. – С. 26–30.
90. Ярмолинская М. И. Значение генитального эндометриоза в патогенезе бесплодия оплодотворения (ЭКО) / М. И. Ярмолинская, В. М. Денисова // Журнал ашерства и женских болезней. – 2013. – Т. 62, № 6. – С. 67–77.

91. Abecia J. A. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro / J. A. Abecia, F. Forcada, O. Zuniga // *Vet. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 26, N 2. – P. 151–158.
92. Absence of effect of adjuvant growth hormone therapy on follicular responses to exogenous gonadotropins in women: normal and poor responders / A. Shaker, R. Flemming, M. E. Jamieson [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1992. – Vol. 58, N 5. – P. 919–923.
93. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization : a meta-analysis / T. E. Verhagen, D. J. Hendriks, L. F. Bancsi [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2008. – Vol. 14, N 2. – P. 95–100.
94. Agarwal A. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective / A. Agarwal, S. Gupta, R. Sharma // *Reprod BioMed Online.* – 2005. – Vol. 11, N 5. – P. 641–650.
95. Agarwal A. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility : a meta-analysis / A. Agarwal, S. Prabakaran, S. S. Allamaneni // *Reprod. Biomed. Online.* – 2006. – Vol. 12, N 5. – P. 630–633.
96. Agarwal A. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction / A. Agarwal, S. S. Allamaneni // *Reprod. Biomed. Online.* – 2004. – Vol. 9, N 3. – P. 338–347.
97. Agarwal A. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review / A. Agarwal, D. Durairajanayagam, S. S. du Plessis // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2014. – Vol. 12. – DOI: 10.1186/1477-7827-12-112.
98. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation : a meta-analysis / S. L. Broer, M. Dolleman, B. C. Opmeer [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2011. – Vol. 17, N 1. – P. 46–54.

99. Anderson R. A. Measuring anti-Müllerian hormone for the assessment of ovarian reserve: when and for whom is it indicated? / R. A. Anderson, S. M. Nelson, W. H. Wallace // *Maturitas*. – 2012. – Vol. 71, N 1. – P. 28–33.
100. Antagonist/letrozole protocol in poor ovarian responders for intracytoplasmic sperm injection : a comparative study with the microdose flare-up protocol / H. Yarali, I. Esinler, M. Polat [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2009. – Vol. 92, N 1. – P. 231–235.
101. Anti Müllerian Hormone (AMH) level and expression in mural and cumulus cells in relation to age / A. Kedem, Y. Yung, G. M. Yerushalmi [et al.] // *J. Ovarian. Res.* – 2014. – Vol. 7. – DOI: 10.1186/s13048-014-0113-3.
102. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART) / A. La Marca, G. Sighinolfi, D. Radi [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2010. – Vol. 16, N 2. – P. 113–130.
103. Anti-müllerian hormone and cumulative pregnancy outcome in in-vitro fertilization / S. Kini, H. W. Li, D. Morrell [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2010. – Vol. 27, N 8. – P. 449–456.
104. Anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation and optimal timing of measurement for outcome prediction / J. R. Lee, S. H. Kim, S. M. Kim [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25, N 10. – P. 2597–2604.
105. Anti-Müllerian hormone: a marker for oocyte quantity, oocyte quality and embryo quality? // S. Lie Fong, E. B. Baart, E. Martini [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2008. – Vol. 16, N 5. – P. 664–670.
106. Antioxidant strategies to overcome OS in IVF-Embryo transfer. / M. Rakhit, S. R. Gokul, A. Agarwal, S. S. Du Plessis // *Studies on Women's Health* / A. Agarwal, N. Aziz B. Rizk. – New York : Humana Press, 2013. – P. 237–262.

107. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome / O. Oyawoye, G. A. Abdel, A. Garner [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 18, N 11. – P. 2270–2274.
108. Antioxidants rescue stressed embryos at a rate comparable with co-culturing of embryos with human umbilical cord mesenchymal cells / G. Moshkdanian, S. N. Nematollahi-Mahani, F. Pouya, A. Nematollahi-Mahani // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2011. – Vol. 28, N 4. – P. 343–349.
109. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility / G. J. Scheffer, F. J. Broekmans, M. Dorland [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1999. – Vol. 72, N 5. – P. 845–851.
110. The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intraovarian androgens and improves in vitro fertilization outcome in low responder patients : a pilot study / J. A. Garcia-Velasco, L. Moreno, A. Pacheco, [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2005. – Vol. 84, N 1. – P. 82–87.
111. An assessment of the antioxidant and the antimyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease / M. A. Pappolla, Y. J. Chyan, B. Poeggeler [et al.] // *J. Neural. Transm.* – 2000. – Vol. 107, N 2. – P. 203–231.
112. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles / S. K. Sunkara, V. Rittenberg, N. Raine-Fenning [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26, N 7. – P. 1768–1774.
113. Cicek M. N. The comparison of microdose flare-up and multiple dose antagonist protocols based on hCG day estradiol (E2), progesterone (P) and P/E2 ratio among poor responder patients in ICSI-ET cycles / M. N. Cicek, I. Kahyaoglu, S. Kahyaoglu // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2015. – Vol. 19, N 4. – P. 539–544.
114. Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation / A. Borini, M. Cattoli, C. Bulletti, G. Goticchio // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 1127. – P. 49–58.

115. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF : a systematic review / B. C. Tarlatzis, L. Zepiridis, G. Grimbizis, J. Bontis // *Hum. Reprod. Update.* – 2003. – Vol. 9, N 1. – P. 61–76.
116. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology : a review / R. J. Reiter, D. X. Tan, H. Tamura [et al.] // *Gynecol. Endocrinol.* – 2014. – Vol. 30, N 2. – P. 83–89.
117. Comparison of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist and GnRH agonist flare-up regimen in poor responders undergoing ovarian stimulation / S. Malmusi, A. La. Marca, S. Giulini [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2005. – Vol. 84, N 2. – P. 402–406.
118. Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Mullerian hormone and antral follicle counts / J. Van Disseldorp, C. B. Lambalk, J. Kwee [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25, N 1. – P. 221–227.
119. Conception rates following assisted reproduction in poor responder patients: a retrospective study in 300 consecutive cycles / U. Ulug, I. Ben-Shlomo, E. Turan [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2003. – Vol. 6, N 4. – P. 439–443.
120. A controller trial of natural cycle versus GnRH analog flare cycles in poor responders undergoing in vitro fertilization / F. Morgia, M. Sbracia, M. Schimberni [et al.] // *Fertil Steril.* – 2004. – Vol. 81. – P. 1542–1547.
121. Correlations of follicular fluid oxidative stress biomarkers and enzyme activities with embryo morphology parameters during in vitro fertilization // V. Y. Fujimoto, M. S. Bloom, H. G. Huddleston [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 96, N 6. – P. 1357–1361.
122. Cousineu T. M. Psychological impact of infertility / T. M. Cousineu, A. D. Domar // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynecol.* – 2007. – Vol. 21, N 2. – P. 293–308.
123. Cumulative live birth rate after three ovarian stimulation IVF cycles for poor ovarian responders according to the bologna criteria / H. Ke, X. Chen,

- Y. D. Liu [et al.] // J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. – 2013. – Vol. 33, N 3. – P. 418–422.
124. De Vos M. Primary ovarian insufficiency / M. De Vos, P. Devroey, B. C. Fauser // Lancet. – 2010. – Vol. 376, N 9744. – P. 911–921.
125. Defining POR during IVF cycles, in women aged <40 years, and its relationship with treatment outcome / C. Kailasam, S. D. Keay, P. Wilson [et al.] // Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 19, N 7. – P. 1544–1547.
126. Demirel A. Comparison of microdose flare-up and antagonist multiple-dose protocols for poor-responder patients: a randomized study / A. Demirel, T. Gurgan // Fertil. Steril. – 2009. – Vol. 92, N 2. – P. 481–485.
127. Devroey P. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility / P. Devroey, B. C. Fauser, K. Diedrich ; Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2008 // Hum. Reprod. Update. – 2009. – Vol. 15, N 4. – P. 391–408.
128. Different ovarian stimulation protocols for women with diminished ovarian reserve / D. Loutradis, P. Drakakis, E. Vomvolaki, A. Antsaklis. // J. Assist. Reprod. Genet. – 2007. – Vol. 24, N 12. – P. 597–611.
129. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells / M. M. Woo, C. J. Tai, S. K. Kang [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2001. – Vol. 86, N 10. – P. 4789–4797.
130. Do poor-responder patients benefit from increasing the daily gonadotropin dose during controlled ovarian hyperstimulation for IVF? / J. Haas, E. Zilberberg, A. Hourvitz [et al.] // Gynecol. Endocrinol. – 2015. – Vol. 31, N 1. – P. 79–82.
131. Effect of a supplementation with myo-inositol plus melatonin on oocyte quality in women who failed to conceive in previous in vitro fertilization cycles for poor oocyte quality: a prospective, longitudinal, cohort study / V. Unfer, E. Raffone, P. Rizzo, S. Buffo // Gynecol. Endocrinol. – 2011. – Vol. 27, N 11. – P. 857–861.

132. Effect of follicular fluid oxidative stress parameters on intracytoplasmic sperm injection outcome / M. A. Bedaiwy, S. A. Elnashar, J. M. Goldberg [et al.] // *Gynecol. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 28, N 1. – P. 51–55.
133. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice / B. Ishizuka, Y. Kuribayashi, K. Murai [et al.] // *J. Pineal. Res.* – 2000. – Vol. 28, N 1. – P. 48–51.
134. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures / E. B. Pasqualotto, A. Agarwal, R. K. Sharma [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 81, N 4. – P. 973–976.
135. Effect of oxidative stress on male reproduction / A. Agarwal, G. Virk, C. Ong, S. S. du Plessis // *World J. Men's Health.* – 2014. – Vol. 32, N 1. – P. 1–17.
136. Effects of ageing and exogenous melatonin on pituitary responsiveness to GnRH in ewes during anestrus and the reproductive season / F. Forcada, J. A. Abecia, A. Casao [et al.] // *Theriogenology.* – 2007. – Vol. 67, N 4. – P. 855–862.
137. Effects of melatonin and zinc on glycemic control in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin / S. A. Hussain, H. M. Khadim, B. H. Khalaf [et al.] // *Saudi Med. J.* – 2006. – Vol. 27, N 10. – P. 1483–1488.
138. The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques / O. Oral, K. Kutlu, E. Aksoy [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2006. – Vol. 23, N 2. – P. 81–85.
139. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program / T. Seino, H. Saito, T. Kaneko [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol. 77, N 6. – P. 1184–1190.
140. Elter K. Intercycle variabilities of basal antral follicle count and ovarian volume in subfertile women and their relationship to reproductive aging: a

- prospective study / K. Elter, A. Sismanoglu, F. Durmusoglu // *Gynecol. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 20, N 3. – P. 137–143.
- 141.ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria / A. P. Ferraretti, A. La Marca, B. C. Fauser [et al.] ; ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26, N 7. – P. 1616–1624.
- 142.Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage / M. H. Cruz, C. L. Leal, J. F. Cruz [et al.] // *Theriogenology.* – 2014. – Vol. 82, N 7. – P. 925–932.
- 143.Estradiol production during controlled ovarian hyperstimulation correlates with treatment outcome in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer / M. F. Mitwally, H. S. Bhakoo, K. Crickard [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2006. – Vol. 86, N 3. – P. 588–596.
- 144.Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation / M. Appasamy, E. Jauniaux, P. Serhal [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol. 89, N 4. – P. 912–921.
- 145.Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model / F. Berlinguer, G.G. Leoni, S. Succu [et al.] // *J. Pineal. Res.* – 2009. – Vol. 46, N 43. – P. 383–391.
- 146.Expected poor ovarian response in predicting cumulative pregnancy rates: a powerful tool / D. J. Hendriks, E. R. te Velde, C. W. Looman [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2008. – Vol. 17, N 5. – P. 727–736.
- 147.Exposure of embryos to oxygen at low concentration in a cleavage stage transfer program: reproductive outcomes in a time-series analysis / F. Calzi, E. Papaleo, E. Rabellotti [et al.] // *Clin. Lab.* – 2012. – Vol. 58, N 9/10. – P. 997–1003.

148. Factors predicting the cumulative outcome of IVF/ICSI treatment: a multivariable analysis of 2450 patients / Q. F. Cai, F. Wan, R. Huang, H. W. Zhang // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26, N 9. – P. 2532–2540.
149. Fauser B. C. Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation / B. C. Fauser, K. Diedrich, P. Devroey ; Evian Annual Reproduction Workshop Group 2007 // *Hum. Reprod. Update.* – 2008. – Vol. 14, N 1 – P. 1–14.
150. Female poor responders / A. P. Ferraretti, L. Gianaroli, M. C. Magli [et al.] // *Mol. Cell .Endocrinol.* – 2000. – Vol. 161, N 1/2. – P. 59–66.
151. Flexible, multi-dose GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders: a randomized controlled trial / E. S. Tehraninejad, A. Fazel, A. Samiei [et al.] // *Int. J. Fertil. Steril.* – 2009. – Vol. 2. – P. 165–168.
152. Follicular fluid F2-isoprostanes: a novel assessment of oxidative stress in IVF patients / K. Lin, K. Barnhart, A. Shaunik [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2005. – Vol. 84, Suppl. 1. – DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.07.112>.
153. Frydman R. Poor responders: still a problem / R. Frydman // *Fertil Steril.* – 2011. – Vol. 96, N 5. – DOI: [10.1016/j.fertnstert.2011.09.051](http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.09.051).
154. Garcia-Velasco J. A. Management of endometriomas in women requiring IVF: to touch or not to touch / J. A. Garcia-Velasco, E. Somigliana // *Hum. Reprod.* – 2009. – Vol. 24, N 3. – P. 496–501.
155. GnRH antagonists are safer than agonists: an update of a Cochrane review / H. G. Al-Inany, M. A. Youssef, M. Aboulghar [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2011. – Vol. 17, N 4. – DOI: [10.1093/humupd/dmr004](http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmr004).
156. GnRH-antagonists in ovarian stimulation for IVF in patients with poor response to gonadotrophins, polycystic ovary syndrome, and risk of ovarian hyperstimulation: a meta-analysis / G. Griesinger, K. Diedrich, B. C. Tarlatzis, E. M. Kolibianakis // *Reprod. Biomed. Online.* – 2006. – Vol. 13, N 5. – P. 628–638.

157. Gonadotropin-releasing hormone agonist versus HCG for oocyte triggering in antagonist-assisted reproductive technology / M. A. Youssef, M. A. Youssef, F. Van der Veen, H. G. Al-Inany [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2014. – Vol. 10. – CD008046. – DOI: 10.1002/14651858.CD008046.
158. Gougeon A. Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles / A. Gougeon // *Maturitas.* – 1998. – Vol. 30, N 2. – P. 137–142.
159. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses / A. Gougeon // *Endocr. Rev.* – 1996. – Vol. 17, N 2. – P. 121–155.
160. Halliwell B. Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: some rarely considered issues / B. Halliwell, C. Y. Lee // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2010. – Vol. 13, N 2. – P. 145–156.
161. Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites / R. Hardeland // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – Vol. 65, N 13. – P. 2001–2018.
162. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility / A. Ortiz, J. Espino, I. Bejarano [et al.] // *J. Pineal. Res.* – 2011. – Vol. 50, N 2. – P. 132–139.
163. High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome / J. Land, M. Yarmolinskaya, J. Dumoulin, J. L. Evers // *Fertil. Steril.* – 1996. – Vol. 65, N 5. – P. 961–965.
164. How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes / M. Sole, J. Santalo, M. Boada [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2013. – Vol. 28, N 8. – P. 2087–2092.

165. How to improve the probability of pregnancy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis / D. Kyrrou, E. Kolibianakis, C. A. Venetis [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2009, Vol. 91, N 3. – P. 749–766.
166. Impact of dehydroepiandrosterone on clinical outcome in poor responders: a pilot study in women undergoing in vitro fertilization, using bologna criteria / P. R. Jirge, S. M. Chougule, V. G. Gavali, D. A. Bhomkar // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2014. – Vol. 7, N 3. – P. 175–180.
167. Impact of oxidative stress on gametes and embryos in an ART laboratory / A. Agarwal, S. Gupta, H. Abdel-Razek [et al.] // *Clin. Embryol.* – 2006. – Vol. 9, N 3. – P. 5–22.
168. Impact of oxidative stress on IVF / S. S. du Plessis, K. Makker, N. R. Desai, A. Agarwal // *Obstet. Gynecol.* – 2008. – Vol. 34. – P. 539–554.
169. Interactions between melatonin and nicotinamide nucleotide: NADH preservation in cells and in cell-free systems by melatonin / D. X. Tan, L. C. Manchester, R. M. Sainz [et al.] // *J. Pineal. Res.* – 2005. – Vol. 39, N 2. – P. 185–194.
170. Intercycle variability of ovarian reserve tests: results of a prospective randomized study // J. Kwee, R. Schats, J. McDonnell [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2004. – Vol. 19, N 3. – P. 590–595.
171. Intervention for 'poor responders' to controlled ovarian hyper stimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF) / Z. Pandian, A. R. McTavish, L. Aucott [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2010. – N 1. – CD004379. – DOI: 10.1002/14651858.CD004379.
172. Invited review significance of oxidative stress in human reproduction / A. Chandra, N. Surti, S. Kesavan, A. Agarwal // *Arch. Med. Sci.* – 2009. – Vol. 5, N 1A. – P. S28–S42.
173. Is the modified natural in vitro fertilization cycle justified in patients with "genuine" poor response to controlled ovarian hyperstimulation?

- / A. Kedem, A. Tsur, J. Haas [et al.] // Fertil. Steril. – 2014. – Vol. 101, N 6. – P. 1624–1628.
- 174.IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis / D. B. Gomes Sobrinho, J. B. Oliveira, C. G. Petersen [et al.] // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2011. – Vol. 9. – DOI: 10.1186/1477-7827-9-143.
- 175.Kappers J. A. The mammalian pineal gland, a survey / J. A. Kappers // Acta Neurochir (Wien). – 1976. – Vol. 34, N 1/4. – P. 109–149.
- 176.Karakaş A. The effect of pinealectomy, melatonin and leptin hormones on ovarian follicular development in female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) / A. Karakaş, A. Kaya, B. Gündüz // Acta Biol. Hung. – 2010. – Vol. 61, N 4. – P. 380–390.
- 177.Karande V. A rational approach to the management of low responders in IVF / V. Karande, N. Gleicher // Hum. Reprod. – 1999. – Vol. 14, N 7. – P. 1744–1749.
- 178.Lampiao F. Free radicals generation in an in vitro fertilization setting and how to minimize them / F. Lampiao // World J. Obstet. Gynecol. – 2012. – Vol. 1, N 3. – P. 29–34.
- 179.Live birth and cumulative live birth rates in expected poor ovarian responders defined by the Bologna criteria following IVF/ICSI treatment / J. Chai, V. C. Lee, T. W. Yeung [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 3. – DOI: 10.1371/journal.pone.0119149.
- 180.Live birth rates following natural cycle IVF in women with poor ovarian response according to the Bologna criteria / N. P. Polyzos, C. Blockeel, W. Verpoest [et al.] // Hum. Reprod. – 2012. – Vol. 27, N 12. – P. 3481–3486.
- 181.Live birth rates in Bologna poor responders treated with ovarian stimulation for IVF/ICSI / N. P. Polyzos, M. Nwoye, R. Corona [et al.] // Reprod. Biomed. Online. – 2014. – Vol. 28, N 4. – P. 469–474.

- 182.Live birth rates in the different combinations of the Bologna criteria poor ovarian responders: a validation study / A. La Marca, V. Grisendi, S. Giulini [et al.] // Assist. Reprod. Genet. – 2015. – Vol. 32, N 6. – P. 931-937.
- 183.Loutradis D. Poor responder protocols for in-vitro fertilization: options and results / D. Loutradis, E. Vomvolaki, P. Drakakis // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. – 2008. – Vol. 20, N 4. – P. 374–378.
- 184.A low number of retrieved oocytes at in vitro fertilization treatment is predictive of early menopause / E. J. de Boer, I. den Tonkelaar, E. R. te Velde [et al.] ; OMEGA-project group // Fertil. Steril. – 2002. – Vol. 77, N 5. – P. 978–985.
- 185.Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies / S. Bontekoe, E. Mantikou, M. van Wely [et al.] // Cochrane Database Syst. Rev. – 2012. – Vol. 7. – CD008950. – DOI: 10.1002/14651858.
- 186.A luteal estradiol protocol for expected poor-responders improves embryo number and quality / J. L. Frattarelli, M. J. Hill, G. D. McWilliams [et al.] // Fertil. Steril. – 2008. – Vol. 89, N 5. – P. 1118–1122.
- 187.Madani T. Comparison of different stimulation protocols efficacy in poor responders undergoing IVF: a retrospective study / T. Madani, M. Ashrafi, L. M. Yeganeh // Gynecol. Endocrinol. – 2012. – Vol. 28, N 2. – P. 102–105.
- 188.Management of poor responders in IVF / F. M. Ubaldi, L. Rienzi, S. Ferrero [et al.] // Reprod. Biomed. Online. – 2005. – Vol. 10, N 2. – P. 235–246.
- 189.Maternal antimullerian hormone levels do not predict fetal aneuploidy / B. J. Plante, C. Beamon, C. L. Schmitt [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2010. – Vol. 27, N 7. – P. 409–414.
- 190.Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in-vitro

- fertilization can predict poor response / A. Lass, J. Skull, E. McVeigh [et al.]
// Hum. Reprod. – 1997. – Vol. 12, N 2. – P. 294–297.
191. Melatonin and female reproduction / H. Tamura, A. Takasaki, T. Taketani
[et al.] // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2014. – Vol. 40, N 1. – P. 1–11.
192. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological
implications / H. Tamura, Y. Nakamura, A. Korkmaz [et al.] // Fertil.
Steril. – 2009. – Vol. 92, N 1. – P. 328–343.
193. Melatonin and viral infections / E. Bonilla, N. Valero, L. Chacin-Bonilla,
S. Medina-Leendertz // J. Pineal. Res. – 2004. – Vol. 36, N 2. – P. 73–79.
194. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle / H. Tamura,
A. Takasaki, T. Taketani [et al.] // Endocr. J. – 2013. – Vol. 60, N 1. –
P. 1–13.
195. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte
maturation capacity and steroidogenesis / I. Adriaens, P. Jacquet,
R. Cortvrindt [et al.] // Toxicology. – 2006. – Vol. 228, N 2/3. – P. 333–343.
196. Melatonin improves the oocyte and the embryo in IVF patients with sleep
disturbances, but does not improve the sleeping problems / O. G. Eryilmaz,
A. Devran, E. Sarikaya [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2011. – Vol. 28,
N 9. – P. 815–820.
197. Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial
cells in vivo and in vitro / C. L. Silva, E. K. Tamura, S. M. Macedo [et al.]
// Br. J. Pharmacol. – 2007. – Vol. 151, N 2. – P. 195–205.
198. Melatonin promotes the cumulus-oocyte complexes quality of vitrified-
thawed murine ovaries; with increased mean number of follicles survival
and ovary size following heterotropic transplantation / M. Hemadi,
F. Abolhassani, M. Akbariet [et al.] // Eur. J. Pharm. – 2009. – Vol. 618,
N 1/3. – P. 84–90.
199. Melatonin, immune function and aging / V. Srinivasan, G. J. Maestroni,
D. P. Cardinali [et al.] // Immun. Ageing. – 2005. – Vol. 2. – P. 17.

200. Menstrual cycle length is an age-independent marker of female fertility: results from 6271 treatment cycles of in vitro fertilization / T. Brodin, T. Bergh, L. Berglund [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol. 90, N 5. – P. 1656–1661.
201. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows / K. Bender, S. Walsh, A. C. Evans [et al.] // *Reproduction.* – 2010. – Vol. 139, N 6. – P. 1047–1055.
202. Moore R. Y. Neural control of pineal function in mammals and birds / R. Y. Moore // *J. Neural. Transm. Suppl.* – 1978. – N 13. – P. 47–58.
203. Nargund G. The impact of ovarian cystectomy on ovarian response to stimulation during in-vitro fertilization cycles / G. Nargund, W. C. Cheng, J. Parsons // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11, N 1. – P. 81–83.
204. Nelson S. M. Serum anti-Mullerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles-implications for individualization of therapy / S. M. Nelson, R. W. Yates, R. Fleming // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, N 9. – P. 2414–2421.
205. Ng E. H. Adverse effects of excessive ovarian response on the pregnancy rate of in vitro fertilization treatment / E. H. Ng // *Gynecol. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 25, N 1. – P. 2–7.
206. Ongoing pregnancy rates in women with low and extremely low AMH levels. A multivariate analysis of 769 cycles / A. Kedem, J. Haas, A. Hourvitz [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 12. – DOI: 10.1371/journal.pone.0081629.
207. Oral melatonin supplementation improves oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer / T. Nishihara, S. Hashimoto, K. Ito [et al.] // *Gynecol. Endocrinol.* – 2014. – Vol. 30, N 5. – P. 359–362.
208. Ovarian response to standard gonadotrophin stimulation for IVF is decreased not only in older but also in younger women in couples with

- idiopathic and male subfertility / A. J. Goverde, J. McDonnell, R. Schats [et al.] // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20, N 6. – P. 1573–1577.
209. Oxidative stress and its role in female infertility and assisted reproduction: clinical implications / S. Gupta, N. Malhotra, D Sharma [et al.] // Int. J. Fertil. Steril. – 2009. – Vol. 2, N 4. – P. 147–164.
210. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate / H. Tamura, A. Takasaki, I. Miwa [et al.] // J. Pineal Res. – 2007. – Vol. 44, N 3. – P. 280–287.
211. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting / A. Agarwal, T. M. Said, M. A. Bedaiwy [et al.] // Fertil. Steril. – 2006. – Vol. 86, N 3. – P. 503–512.
212. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in vitro fertilization / Z. Wiener-Megnazi, L. Vardi, A. Lissak [et al.] // Fertil. Steril. – 2004. – Vol. 82, Suppl. 3. – P. 1171–1176.
213. Paszkowski T. Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos / T. Paszkowski, R. N. Clarke // Hum. Reprod. – 1996. – Vol. 11, N 11. – P. 2493–2495.
214. The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: the requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin / R. J. Reiter, S. Rosales-Corral, A. Coto-Montes // J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 62, N 3. – P. 269–274.
215. A pilot double-blind randomised placebo-controlled dose-response trial assessing the effects of melatonin on infertility treatment (MIART) : study protocol / S. Fernando, T. Osianlis, B. Vollenhoven [et al.] // BMJ Open. – 2014. – Vol. 4, N 8. – DOI: 10.1136/bmjopen-2014-005986.

216. The poor responder in IVF: is the prognosis always poor?: a systematic review / J. F. Oudendijk, F. Yarde, M. J. Eijkemans [et al.] // Hum. Reprod. Update. – 2012. – Vol. 18, N 1. – P. 1–11.
217. A poor response in the first in vitro fertilization cycle is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles / E. R. Klinker, F. J. Broekmans, C. W. Looman, E. R. Te Velde // Fertil. Steril. – 2004. – Vol. 81, N 5. – P. 1247–1253.
218. Poor response to ovulation induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH: a life table analysis / R. Lawson, T. El-Toukhy, A. Kassab [et al.] // Hum. Reprod. – 2003. – Vol. 18, N 3. – P. 527–533.
219. Prospective evaluation of two stimulation protocols for low responders who were undergoing in vitro fertilization-embryo transfer / A. Weissman, J. Farhi, M. Royburt [et al.] // Fertil. Steril. – 2003. – Vol. 79, N 4. – P. 886–892.
220. A prospective randomised study comparing a GnRH-antagonist versus a GnRH-agonist short protocol for ovarian stimulation in patients referred for IVF / S. Gordts, C. Van Turnhout, R. Campo [et al.] // Facts Views Vis. Obgyn. – 2012. – Vol. 4, N 2. – P. 82–87.
221. Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells / T Taketani, H Tamura, A Takasaki [et al.] // J. Pineal. Res. – 2011. – Vol. 51, N 2. – P. 207–213.
222. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos / N. Esfandiari, T. Falcone, A. Agarwal [et al.] // Obstet. Gynecol. – 2005. – Vol. 105, N 3. – P. 653–660.
223. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients / M. E. Hammadeh, S. Al. Hasani, P. Rosenbaum [et al.] // Arch. Gynecol. Obstet – 2008 Vol. 277, N 6. – P. 515–526.

- 224.Recombinant follicle stimulating hormone stimulation in poor responders with normal basal concentrations of follicle stimulating hormone and oestradiol: improved reproductive outcome / F. Raga, F. Bonilla-Musoles, E. M. Casan, F. Bonilla // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, N 6. – P. 1431–1434.
- 225.Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle / L. Rombauts, A. M. Suikkari, V. MacLachlan [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1998. – Vol. 69, N 4. – P. 665–669.
- 226.Reichman D. E. Value of antimullerian hormone as a prognostic indicator of in vitro fertilization outcome / D. E. Reichman, D. Goldschlag, Z. Rosenwaks // *Fertil. Steril.* – 2014. – Vol. 101, N 4. – P. 1012–1018.
- 227.Reiter R. J. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology / R. J. Reiter, D. X. Tan, M. D. Maldonado // *J. Pineal. Res.* – 2005. – Vol. 39, N 2. – P. 215–216.
- 228.Reiter R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar / R. J. Reiter // *Experientia.* – 1993. – Vol. 49, N 8. – P. 654–664.
- 229.The relation between immunoglobulin G antibodies to Chlamydia trachomatis and poor ovarian response to gonadotropin stimulation before in vitro fertilization / S. D. Keay, R. Barlow, A. Eley, [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1998. – Vol. 70, N 2. – P. 214–218.
- 230.Relevance of triple CGG repeats in the FMR1 gene to ovarian reserve / N. Gleicher, A. Weghofer, K. Oktay, D. Barad // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. – Vol. 19, N 3. – P. 385–390.
- 231.Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen / C. S. Branco, M. E. Garcez, F. F. Pasqualotto [et al.] // *Cryobiology.* – 2010. – Vol. 60, N 2. – P. 235–237.
- 232.A retrospective evaluation of prognosis and cost-effectiveness of IVF in poor responders according to the Bologna criteria / A. Busnelli,

- E. Papaleo, D. Del Prato [et al.] // Hum. Reprod. – 2015. – Vol. 30, N 2. – P. 315–322.
233. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome / Rotterdam ESHRE/ASRM sponsored PCOS Consensus Workshop Group // Fertil. Steril. – 2004. – Vol. 81, N 1. – P. 19–25.
234. Rizzo P. Effect of the treatment with myo-inositol plus folic acid plus melatonin in comparison with a treatment with myo-inositol plus folic acid on oocyte quality and pregnancy outcome in IVF cycles. A prospective clinical trial / P. Rizzo, E. Raffone, V. Benedetto // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2010. – Vol. 14, N 6. – P. 555–561.
235. The role of anti-Mullerian hormone assessment in assisted reproductive technology outcome / S. L. Broer, B. Mol, M. Dolleman [et al.] // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. – 2010. – Vol. 22, N 3. – P. 193–201.
236. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count / S. L. Broer, B. W. Mol, D. Hendriks, F. J. Broekmans // Fertil. Steril. – 2009. – Vol. 91, N 3. – P. 705–714.
237. Role of baseline antral follicle count and anti-mullerian hormone in prediction of cumulative live birth in the first in vitro fertilization cycle: a retrospective cohort analysis // H. W. Li, V. C. Lee, E. Y. Lau [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 4. – DOI: 10.1371/journal.pone.0061095.
238. The role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction / S. Gupta, L. Sekhon, Y. Kim, A. Agarwal // Curr. Women's Health Rev. – 2010. – Vol. 6, N 3. – P. 227–238.
239. Serum oxidizability and antioxidant status in patients undergoing in vitro fertilization / I. Aurrekoetxea, J. I. Ruiz-Sanz, A. R. Agua [et al.] // Fertil. Steril. – 2010. – Vol. 94, N 4. – P. 1279–1286.

- 240.Short term use of gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide) for in vitro fertilization / K. Katayama, M. Roesler, G. Gunnarson [et al.] // J. In Vitro Fert. Embryo Transf. – 1988. – Vol. 5, N 6. – P. 332–337.
- 241.Should we advise patients undergoing IVF to start a cycle leading to a day 3 or a day 5 transfer? / E. M. Kolibianakis, K. Zikopoulos, W. Verpoest [et al.] // Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 19, N 11. – P. 2550–2554.
- 242.Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization / L. Sabatini, C. Wilson, A. Lower [et al.] // Fertil. Steril. – 1999. – Vol. 72, N 6. – P. 1027–1034.
- 243.Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells / L. Matos, D. Stevenson, F. Gomes [et al.] // Mol. Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 15, N 7. – P. 411–419.
- 244.Surrey E. S. Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques / E. S. Surrey, W. B. Schoolcraft // Fertil. Steril. – 2000. – Vol. 73, N 4. – P. 667–676.
- 245.A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome / J. Broekmans, J. Kwee, D. J. Hendriks [et al.] // Hum. Reprod. Update. – 2006. – Vol. 12, N 6. – P. 685–718.
- 246.Tomas C. Pretreatment transvaginal ultrasound examination predicts ovarian responsiveness to gonadotrophins in in-vitro fertilization / C. Tomas, S. Nuojua-Huttunen, H. Martikainen // Hum. Reprod. – 1997. – Vol. 12, N 2. – P. 220–223.
- 247.Tomas-Zapico C. Melatonin as antioxidant under pathological processes / C. Tomas-Zapico, A. Coto-Montes // Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov. – 2007. – Vol. 1. – P. 63–82.
- 248.Trisomic pregnancy and elevated FSH: implications for the oocyte pool hypothesis / J. K. Kline, A. M. Kinney, B. Levin [et al.] // Hum. Reprod. – 2011. – Vol. 26, N 6. – P. 1537–1550.

249. Undernutrition and exogenous melatonin can affect the in vitro developmental competence of ovine oocytes on a seasonal basis / M. I. Vázquez, F. Forcada, A. Casao [et al.] // *Reprod. Domest. Anim.* – 2010. – Vol. 45, N 4. – P. 677–684.
250. The use of androgens or androgen-modulating agents in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis / J. K. Bosdou, C. A. Venetis, E. M. Kolibianakis [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2012. – Vol. 18, N 2. – P. 127–145.
251. The value of increasing the dose of HMG in women who initially demonstrate a poor response / D. Manzi, K. L. Thornton, L. B. Scott, J. C. Nulsen // *Fertil. Steril.* – 1994. – Vol. 62, N 2. – P. 251–256.
252. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage / G. Kalthur, S. Raj, A. Thiagarajan [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 95, N 3. – P. 1149–1151.
253. Vollenhoven B. Is there an ideal stimulation regimen for IVF for poor responders and does it change with age? / B. Vollenhoven, T. Osianlis, J. Catt // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2008. – Vol. 25, N 11/12. – P. 523–529.
254. Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve—an eight year study / T. El-Toukhy, Y. Khalaf, R. Hart [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, N 6. – P. 1519–1524.
255. Younis J. S. The Bologna criteria for poor ovarian response; has the job been accomplished? / J. S. Younis // *Hum. Reprod.* – 2012. – Vol. 27, N 6. – P. 1874–1875.