

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Рязанский государственный медицинский университет  
имени академика И.П. Павлова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**Лопухов Сергей Владимирович**

**КАРДИОВАСКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА, СЕРДЕЧНО-  
СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ГЕННЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ  
У ЖЕНЩИН С ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЙ ОВАРИАЛЬНОЙ  
НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ**

3.1.18. Внутренние болезни

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор  
Филиппов Евгений Владимирович

Рязань – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	17
1.1. Бремя преждевременной овариальной недостаточности у женщин по данным современных исследований .....	17
1.2. Роль климактерического синдрома у пациенток с преждевременной овариальной недостаточностью.....	19
1.3. Взаимоотношения между сердечно-сосудистой патологией и преждевременной овариальной недостаточностью.....	22
1.4. Структура смертности у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью .....	25
1.5. Оценка генных полиморфизмов у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью.....	28
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	48
2.1. Базы проведения исследования .....	48
2.2. Дизайн исследования .....	48
2.3. Первый этап исследования.....	50
2.4. Второй этап исследования.....	58
2.5. Этические аспекты исследования.....	66
2.6. Методы статистической обработки.....	67
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	68
3.1. Сбор и оценка клинических данных у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью и контрольной группы.....	68
3.2. Оценка сердечно-сосудистых исходов у женщин с преждевременной овариальной недостаточностью.....	75
3.3. Оценка конечных точек .....	77
3.4. Исследование генных полиморфизмов у женщин с преждевременной овариальной недостаточностью.....	79

<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	87
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	93
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b> .....	95
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	96
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	98

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Несмотря на все успехи современной медицины преждевременная овариальная недостаточность все еще играет важную роль в развитии и течении сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [59]. Распространённость преждевременной овариальной недостаточности составляет около 1-2% среди лиц женского пола [72]. Частота возникновения первичной ПОН составляет 1% среди женщин в возрасте до 40 лет и 0,1 % среди женщин в возрасте до 30 лет [3,4]. Частота возникновения вторичной ПОН зависит от распространенности других заболеваний, следствием которых она является, в первую очередь, злокачественных новообразований [18,129].

ПОН ассоциирована не только с бесплодием, нарушением минеральной плотности кости, онкологическими, аутоиммунными, мочеполовыми, сердечно-сосудистыми и неврологическими заболеваниями, но и с повышенным риском преждевременной смерти [157]. Кроме того, ПОН может также выступать в качестве независимого фактора риска ишемической болезни сердца и общего сердечно-сосудистого риска [50,135,75]. Длительное снижение концентрации эстрогена у таких женщин может привести к потере его кардиопротективных свойств, что в свою очередь способно привести к увеличению риска сердечно-сосудистых заболеваний [73,52].

Совокупное влияние этих компонентов на риск сердечно-сосудистых заболеваний до сих пор остается неясным, а данные о более молодых возрастных группах все еще малочисленны. Одна из гипотез предполагает, что генетически обусловленное ускорение соматического старения может проявляться как в раннем ухудшении здоровья сердечно-сосудистой системы, так и в преждевременном старении яичников [121,120,110]. Другая гипотеза утверждает, что старение яичников может быть результатом ухудшения состояния сердечно-сосудистой системы, что может привести к снижению васкуляризации яичников

из-за атеросклеротических поражений [94]. Обе гипотезы подчеркивают наличие связи между ПОН и ССЗ, которая требует изучения [131].

Таким образом, необходима дополнительная оценка ПОН и её связей с сердечно-сосудистыми заболеваниями, и влияния на отдалённые сердечно-сосудистые риски.

### **Степень разработанности темы исследования**

Проблемы, связанные с диагностикой и пониманием ПОН, уже не одно десятилетие волнуют научное сообщество, так как данная проблема напрямую влияет на качество жизни и ожидаемую продолжительность жизни, затрагивая важные демографические аспекты [109]. ПОН во многом обусловлена проявлением постменопаузального синдрома [108]. Также большое влияние оказывают гормональные нарушения, в первую очередь за счёт дисбаланса эстрогенов, за которым необходимо тщательно следить [128,60,152,38].

В современной зарубежной научной литературе как никогда актуален стал вопрос о связях между ПОН и различными генетическими полиморфизмами, генетические молекулярные методы стали активнее применяться. В связи с чем было выпущено большое количество работ, проливающих свет на различные аспекты данной патологии [126, 65, 162, 163, 87, 125, 78, 107, 100, 62, 99, 161, 64, 66, 61, 79, 80, 57, 84, 137, 69, 141, 147]. Данный тренд в исследовании ПОН мы видим в большинстве западных источников, однако первое место в этих исследованиях занимает Китайская Народная Республика (КНР), сейчас являющаяся передовой в исследовании ПОН.

В Российской Федерации (РФ), такие исследования также проводились, однако большинство этих работ посвящено причинам, диагностике и ассоциациям ПОН с другими заболеваниями [18,7,1,23,17,10,30,6]. Также в Российской литературе активно исследуется вопрос о ассоциациях между дисбалансом уровня эстрогенов и сердечно-сосудистым риском [98,2,4,5,7,9,20,2225,26,27,28,29].

Таким образом, имеется ряд предпосылок для получения актуальной научной информации о сердечно-сосудистом профиле пациентов с ПОН, а также факторах, определяющих ближайший (госпитальный) и более отдаленный прогноз у данной категории пациентов в отдельном регионе России.

### **Цель исследования**

Оценить профиль кардиоваскулярных факторов риска и сердечно-сосудистых заболеваний у пациенток с преждевременной овариальной недостаточностью различного генеза и ее ассоциации с генными полиморфизмами.

### **Задачи исследования**

1. Оценить сердечно-сосудистые факторы риска у пациенток с первичной и вторичной ПОН в сравнении со здоровыми женщинами.
2. Выявить ассоциации между первичной и вторичной ПОН с традиционными факторами риска и оценить относительный риск их развития.
3. Оценить 10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, рассчитанный с использованием Фрамингемской шкалы оценки (FRS) и SCORE 2, а также рассчитать риск неблагоприятных исходов по шкале SCORE у пациентов с ПОН, в сравнении со здоровыми женщинами при их длительном наблюдении.
4. Определить частоту встречаемости генных полиморфизмов Met235Thr; C807T; C786T; 455G-A; Leu59Pro; 675 5G/4G-; G(-572)C; Lys198Asn в группе пациентов с ПОН.
5. Оценить наличие ассоциаций между преждевременной овариальной недостаточностью различного генеза и исследуемыми генными полиморфизмами Met235Thr; C807T; C786T; 455G-A; Leu59Pro; 675 5G/4G-; G(-572)C; Lys198Asn у женщин.

## Методология и методы исследования

Женщины с диагнозом преждевременная оварияльная недостаточность были отобраны из лечебных учреждений Рязани и Рязанской области, вся информация до них была донесена в доступной и понятной форме, они подписали информированное добровольное согласие. Преждевременная оварияльная недостаточность определялась как возникновение аменореи  $\geq 4$  месяцев в возрасте до 45 лет вместе с уровнем ФСГ выше 40 МЕ/л.

Критериями включения в исследуемую группу были: подписанное информированное согласие, женский пол, возраст наступления менопаузы до 40 лет, наличие аменореи  $\geq 4$  месяцев, уровень ФСГ выше 40 МЕ/л, или уже выставленный ранее диагноз «преждевременная оварияльная недостаточность» или различные его варианты.

Критериями исключения были: мужской пол, возраст старше 45 лет, отсутствие подписанного информированного согласия.

Контрольная группа была сформирована исходя из критериев сопоставимости по полу, возрасту и ИМТ, для того чтобы минимизировать влияние фенотипа на результаты исследования и состояла из женщин без признаков у них ПОН.

В соответствии с рассчитанной мощностью исследования необходимый размер выборки основной и контрольной группы с допущением вариации основных признаков около 10% составил 129 пациентов. В исследование были включены 133 женщины, страдающие первичной ПОН. В группы сравнения было включено такое же количество женщин. Группы были сравнимы по полу, возрасту и ИМТ.

Таким образом, в результате получилось три группы:

1. пациенты с первичной ПОН – 133 человека,
2. пациенты со вторичной ПОН – 133 человека,
3. контрольная группа, состоящая из здоровых женщин, сопоставимых по возрасту и ИМТ – 133 человека.

Согласно дизайну исследование проходило в два этапа.

На первом этапе происходил сбор и анализ имеющейся отечественной и зарубежной литературы, формирование критериев включения и исключения из исследования, и на их основе комплектовались обследуемые группы. В исследовании участвовало две обследуемые группы плюс контроль. На первом этапе проводились: физикальное, лабораторное и инструментальное обследование, а также анализ имеющейся медицинской документации. Затем был произведён расчёт относительного риска (RR) и отношения шансов (OR) сердечно-сосудистых событий и оценка сердечно-сосудистого риска с использованием шкал FRS, SCORE и SCORE2.

На втором этапе происходил забор свежесобранного биологического материала (венозная кровь) с последующей быстрой транспортировкой её в исследовательскую лабораторию, как правило, без использования заморозки, далее проводился её генетический анализ на наличие в ней генных полиморфизмов: Met235Thr; C807T; C786T; 455G-A; Leu59Pro; 675 5G/4G-; G(-572)C; Lys198Asn и расчёт относительного риска (RR) и отношения шансов (OR).

Медиана наблюдения составила 963 (721;1217) дней; цифры в скобках означают минимальное и максимальное время наблюдений в нашей выборке. Конечные точки оценивались как для пациентов с первичной, так и со вторичной ПОН, все обследуемые пациенты прошли второй срез. Конечными точками считались: смерть по любой причине, нефатальный инсульт, инфаркт миокарда, ИБС, госпитализация по причине ССЗ.

На первом этапе, согласно дизайну исследования, были оценены такие факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний, как окружность талии, индекс массы тела (ИМТ), артериальное давление, липидный профиль, распространенность сахарного диабета и метаболического синдрома, а также анамнестические данные (были получены из соответствующей медицинской документации). Сердечно-сосудистое обследование проводилось кардиологами или врачами-терапевтами. Оценивались: общий медицинский, акушерский и семейный анамнез, статус курения и антропоморфные показатели.



Артериальное давление измерялось сфигмоманометром, расположенным на правой руке, после периода отдыха в сидячем положении трижды с использованием среднего значения трёх измерений. Артериальная гипертензия определялась при наличии: систолического артериального давления  $\geq 140$  мм рт. ст. и (или) диастолического артериального давления  $\geq 90$  мм рт. ст., а также при наличии в анамнезе указаний на регулярный приём антигипертензивных препаратов.

Под аритмией понималось любое нарушение ритма сердца. ИБС диагностировалась только в случае наличия в медицинской документации подтверждения ишемии и визуализации атеросклеротической бляшки, либо в случае инфаркта миокарда в анамнезе. Сахарный диабет определялся при наличии в анализах уровня глюкозы натощак  $\geq 7,0$  ммоль/л или наличием в анамнезе данных о регулярном приёме сахароснижающих препаратов.

Согласно протоколу исследования, диагноз дислипидемия устанавливался при концентрации общего холестерина более 5,0 ммоль/л и уровне ЛПНП свыше 3,0 ммоль/л. Диагноз метаболический синдром (МС) ставился на основании последних рекомендаций национальной образовательной программы по холестерину (NCEP III). Согласно ему, МС определяется при наличии  $\geq 3$  из следующих признаков: окружность талии  $\geq 88$  см, уровень глюкозы натощак  $\geq 6,1$  ммоль / л, АД  $> 130/85$  мм. рт. ст., холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП)  $< 1,3$  ммоль/л, триглицериды (ТГ)  $\geq 1,7$  ммоль/л.

10-летний риск развития ССЗ с использованием Фрамингемской шкалы оценки (FRS) и SCORE2, а также риск развития смерти от тех же заболеваний в течение ближайших 10 лет по шкале SCORE был рассчитан для трех исследуемых групп.

По Фрамингемской шкале оценки (FRS) низкий риск определялся как 10-летний риск развития ССЗ менее 10%, промежуточный – как 10-20%, высокий – как более 20%.

В соответствии со шкалой SCORE2 риск менее 2,5% считается низким, в пределах от 2,5 до 7,5% – умеренным, более 7,5% – высоким. Согласно шкале

SCORE, низким считается сердечно-сосудистый риск менее 1%, умеренным – от 1 до 5%, высоким – от 5 до 10%, очень высоким – более 10%.

Расчет рисков по различным шкалам проводился математически по формулам в соответствии с рекомендациями по использованию шкал SCORE, SCORE2 и FRS.

На втором этапе материалом для исследования служила свежесобранная венозная кровь. Метод исследования – проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР-тест). Форма детекции ЭФ – детекция продуктов ПЦР электрофоретическим методом в агарозном геле. Использовались наборы реагентов для определения полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР с электрофоретической схемой детекции результата «SNP-ЭКСПРЕСС».

Аналізу подвергалась геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». С образцом выделенной ДНК параллельно проводились две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров, детекция амплифицированного фрагмента ДНК проводилась электрофоретическим методом в агарозном геле. Результаты анализа позволяют дать три типа заключений: гомозигота по аллели 1, гетерозигота, гомозигота по аллели 2.

Все группы были сравнимы между собой, так как исследование на генные полиморфизмы не предполагало дополнительных критериев исключения. Все 399 ранее отобранных пациентов прошли данное исследование в несколько этапов.

Вся информация по ходу исследования доводилась до пациентов в доступной и понятной для них форме, все они подписали информированное добровольное согласие на проведение медицинских манипуляций.

Данное исследование, как и форма согласия, была одобрена Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России протокол №2 от 08.10.2019.

Вся информация по включённым в исследование пациентам в обезличенном виде вносилась в электронную базу данных Excel 2010 (Microsoft Corporation,

США). С помощью программного обеспечения данного приложения проведён математический анализ и визуализация результатов исследования.

Статистический анализ проводился с помощью программы Statistica 13.0. (StatSoft Inc., США). Для оценки соответствия количественных параметров закону нормального распределения применялся критерий Шапиро-Уилка. Величины с нормальным распределением представлены в виде среднего значения ( $M$ ) и среднеквадратического отклонения ( $\sigma$ ), с отличным от нормального распределением – в виде медианы ( $Me$ ) и интерквартильного размаха ( $Q1;Q3$ ), где  $Q1$  – нижний квартиль (25%),  $Q3$  – верхний квартиль (75%). Частота встречаемости признаков представлена в виде абсолютных ( $n$ ) и относительных (%) значений.

Определение статистической значимости различий между средними величинами двух независимых групп проводилось с использованием критерия Стьюдента – для величин с нормальным распределением, критерия Манна-Уитни – для величин с отличным от нормального распределением. Для сравнения групп по качественным признакам применялся критерий Пирсона ( $\chi^2$ ) с поправкой на непрерывность по Йетсу, в случае если в одной из ячеек таблицы сопряжённости значение было менее 5 – двусторонний критерий Фишера.

С целью определения предикторов исходов применялся метод регрессионного анализа в моделях Кокса, результаты представлены в виде отношения шансов («ОШ»/«OR») и относительного риска (RR) в рамках 95% доверительного интервала (95% ДИ).

Во всех случаях статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

### **Научная новизна исследования**

1. Впервые были отдельно исследованы группы пациентов с первичной и вторичной ПОН, а также обнаружены ассоциации между ними и традиционными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний.

2. Впервые сердечно-сосудистый риск был оценен отдельно для групп

пациентов с первичной и вторичной ПОН и в обеих группах было статистически значимо его увеличение.

3. При оценке результатов молекулярно-генетического исследования впервые было обнаружено статистически значимое различие в частоте встречаемости генных полиморфизмов в группе пациентов с первичной ПОН при её сравнении с контрольной группой.

4. Были обнаружены ассоциации между первичной ПОН и следующими генными полиморфизмами: Met235Thr; C807T; C786T; 455G-A; Leu59Pro; 675 5G/4G; G(-572)C; Lys198Asn.

### **Теоретическая значимость работы**

В ходе исследования подтверждено наличие ассоциации между преждевременной овариальной недостаточностью и традиционными факторами риска ССЗ.

В результате использования шкал FRS, SCORE и SCORE 2 обнаружены различия в 10-летнем риске развития сердечно-сосудистых заболеваний и их смертельных исходов у лиц с ПОН различного генеза при их сравнении с контрольной группой.

При оценке результатов молекулярно-генетического исследования, было обнаружено статистически значимое различие в частоте встречаемости генных полиморфизмов у пациентов с первичной и вторичной ПОН. Были также обнаружены ассоциации между мутациями в генах *AGT*, *ITGA2*, *NOS3*, *FGB*, *ITGB3*, *SERPINE (PAI) 1*, *IL6*, *EDN1* и первичной ПОН.

### **Практическая значимость работы**

Внедрение результатов данного диссертационного исследования в практику способно помочь не только в выявлении преждевременной овариальной недостаточности, но и в первичной профилактике многих её серьёзных

осложнений, что поможет избежать падения качества жизни и уровня здоровья больных женщин, а также предотвратить развитие смертельных исходов.

Пациенты с впервые установленным у них диагнозом «преждевременная овариальная недостаточность», независимо от этиологии данного заболевания, должны находиться на диспансерном наблюдении у врача.

В случае хирургического удаления одного яичника или же в результате иных причин, которые могут вызывать преждевременную овариальную недостаточность, женщине должно быть рекомендовано пройти исследование на уровень сывороточного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и в случае если уровень (ФСГ >40 МЕ/л), ей также должен быть выставлен диагноз «преждевременная овариальная недостаточность» и она должна быть поставлена на диспансерный учёт. Женщины с диагнозом «преждевременная овариальная недостаточность» должны ежегодно проходить диспансерное наблюдение на предмет развития у них вторичных осложнений ПОН, а также они должны проходить диагностический скрининг, так как имеют значительно более высокий риск развития у себя сердечно-сосудистых и иных патологий внутренних органов. Женщинам с диагнозом «первичная преждевременная овариальная недостаточность» должно быть рекомендовано прохождение медико-генетического обследования на предмет наличия у них наиболее распространенных генных полиморфизмов, что позволит более чётко предсказать развитие ассоциированных с ними заболеваний, а также начать, как можно раньше проводить первичную профилактику этих состояний. Больные разными формами ПОН также должны включаться в специальный регистр, помогающий практикующим врачам в лечении и первичной профилактике болезней внутренних органов.

### **Степень достоверности результатов**

Основные положения диссертационной работы базируются как на материалах первичной медицинской документации, так и на новых медицинских данных, полученных в процессе исследования. Автор лично занимался сбором

клинических данных и биологического материала, а также участвовал в формировании медицинских рекомендаций. Оценка генных полиморфизмов проводилась в центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Полученные в результате генетического анализа данные подтверждают выдвинутую в начале исследования гипотезу о наличии ассоциаций между первичной ПОН и исследуемыми генными полиморфизмами. Высокая степень достоверности основных научных положений и обоснованности выводов, обусловлена большим объёмом выборки, суммарно 399 человек. Исследование опирается на большое количество данных как зарубежной, так и отечественной литературы. Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. ПОН ассоциировалась со значимо более высоким бременем факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, таких как: увеличение окружности талии, более высокие цифры систолического и диастолического артериального давления, повышение частоты сердечных сокращений, повышение уровня общего холестерина, триглицеридов и ЛПНП, снижение уровня ЛПВП, а также увеличение частоты таких сердечно-сосудистых заболеваний как: АГ, аритмия, ИБС, сахарный диабет и метаболический синдром.

2. 10-летний риск развития ССЗ повышен у пациентов с ПОН независимо от ее этиологии. За время наблюдения сердечно-сосудистые риски у пациентов с ПОН не изменялись.

3. Частота генных полиморфизмов, ассоциированных с ССЗ, выше в группе пациентов с первичной ПОН.

### **Внедрение результатов в практику**

Результаты исследования внедрены в образовательный процесс кафедры

поликлинической терапии, профилактической медицины и общей врачебной практики, кафедры факультетской терапии имени профессора В.Я. Гармаша ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, а также в лечебный процесс ГБУ РО «Городская поликлиника №2» ОКБ им. Н.А. Семашко, ГБУ РО «Городская клиническая поликлиника №6», ГБУ РО «Рязанский областной клинический онкологический диспансер».

### **Апробация результатов исследования**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на конференциях:

1. Всероссийский конкурс молодежных проектов стратегии социально-экономического развития «РОССИЯ-2035». 12.03.2021 – 14.03.2021. Москва.
2. XVII Всероссийский конгресс «Артериальная гипертензия 2021: новое в диагностике и лечении». 17 – 18.03.2021 (онлайн).
3. Международная книжная выставка Liber madrid 2021. 13.10.2021 – 15.10.2021 (онлайн).
4. Международная книжная выставка Frankfurter Buchmesse 2021. 20.10.2021 – 24.10.2021 (онлайн).
5. XVII Национальный конгресс терапевтов. 12–14.10.2022. Москва.
6. Межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием «Клинические рекомендации, клиническое мышление и клинические примеры в современной терапевтической практике». 18–19.11.2022. Рязань.
7. Ежегодная научная конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвященной 10-летию науки и технологий. 16 .12.2022. Рязань.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 117 страницах печатного текста и содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования,

результаты, заключение, выводы и практические рекомендации. Список литературы состоит из 165 источников.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 5 научных статей, из них 3 статьи в журналах, включенных Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций.

### **Личный вклад автора**

Автор лично провел подбор и анализ литературных данных, участвовал в определении цели и задач исследования, разработке материалов и методов, выполнил сбор первичной информации, формирование базы данных, математическую и статистическую обработку данных, анализ результатов, формулировку выводов и практических рекомендаций, написание печатных работ и диссертации, а также представлял результаты исследования на конгрессах и конференциях.



## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Бремя преждевременной овариальной недостаточности у женщин по данным современных исследований

Преждевременная овариальная недостаточность (ПОН) определяется как недостаточность яичников, наступившая в возрасте до 40 лет, которая приводит к развитию гипергонадотропного гипогонадизма [59]. Преждевременная овариальная недостаточность по своей этиологии делится на две большие группы: первичную и вторичную. Распространённость преждевременной овариальной недостаточности составляет около 1-2% от всех женщин во всём мире [72]. Частота возникновения первичной ПОН, составляет 1% среди женщин в возрасте до 40 лет и 0,1 % среди женщин в возрасте до 30 лет [3,4]. Частота возникновения вторичной ПОН различается в странах и регионах мира, так как полностью зависит от распространённости заболеваний, следствием которых она является, в первую очередь онкологических заболеваний [18,129].

Критерием первичной постановки диагноза может служить прекращение менструации сроком не менее чем на четыре месяца. Однако, для постановки более точного диагноза необходим анализ крови на содержание в ней сывороточного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), диагноз можно подтвердить, если уровень ФСГ  $>40$  МЕ/л [70].

Первичная преждевременная овариальная недостаточность может иметь генетические, аутоиммунные, системно-воспалительные, ферментные, метаболические или очень часто идиопатические причины [122]. Вторичная ПОН возникает главным образом как осложнение в результате лечения, в первую очередь онкологических заболеваний, различными способами, такими как: хирургические вмешательства (билатеральная оофорэктомия), химиотерапия, радиотерапия и их различные комбинации [122].

Последствия преждевременной овариальной недостаточности, можно условно разделить на две группы: краткосрочные и долгосрочные. Краткосрочные

последствия ПОН, возникают главным образом, вследствие быстро нарастающего дефицита эстрогенов в организме. Краткосрочные последствия схожи со спонтанной менопаузой и относятся в основном к проявлениям климактерического синдрома. Они часто включают в себя вазомоторные симптомы, такие как приливы крови, ночное потоотделение, чувство сердцебиения, головные боли и т. д. [157].

В более долгосрочной перспективе преждевременная овариальная недостаточность затрагивает целый ряд аспектов.

Долгосрочными последствиями ПОН будут являться такие патологии как бесплодие, нарушение минеральной плотности кости, онкологические, аутоиммунные, мочеполовые, сердечно-сосудистые и неврологические заболевания, а также повышенный риск преждевременной смерти [157].

Также было выявлено наличие более высокого атерогенного липидного профиля у женщин, страдающих ПОН [114].

Кроме того, преждевременная овариальная недостаточность может также выступать в качестве независимого фактора риска ишемической болезни сердца и общего сердечно-сосудистого риска в соответствии с ранее сообщенной отрицательной связью между возрастом наступления менопаузы и риском сердечно-сосудистых заболеваний [50,135,75].

Совокупное влияние этих компонентов на риск сердечно-сосудистых заболеваний остается неясным, а данные о более молодых возрастных группах все еще малочисленны. Значительно более длительное снижение воздействия эстрогена может привести к потере его кардиопротективных свойств, что приведет к увеличению риска сердечно-сосудистых заболеваний [73,52].

Депривация эстрогена также связана с увеличением провоспалительных маркеров, таких как интерлейкины, которые связаны с диабетом, атеросклерозом и сердечно-сосудистыми заболеваниями [85].

Одна из гипотез предполагает, что генетически обусловленное ускорение соматического старения может проявляться как в раннем ухудшении здоровья сердечно-сосудистой системы, так и в преждевременном старении яичников

[121,120,110]. Другая гипотеза утверждает, что старение яичников может быть результатом ухудшения состояния сердечно-сосудистой системы, что может привести к снижению васкуляризации яичников из-за атеросклеротических поражений [94].

Независимо от неопределенности, связанной с этими гипотезами, связь между ранней менопаузой и сердечно-сосудистыми заболеваниями была наиболее убедительно подтверждена у женщин с хирургически индуцированной ПОН, которое можно интерпретировать как лишение эстрогена, являющееся преобладающим фактором повышения сердечно-сосудистого риска [131].

Факторы риска развития ССЗ, такие как артериальная гипертензия и метаболический синдром [90], все чаще присутствуют у женщин в постменопаузе, и они, конечно, вносят свой вклад в развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Также имеются данные о взаимосвязи ПОН и вредных привычек, таких как курение, алкоголизм и наркомания [150]. У больных ПОН в ряде исследований обнаружена ассоциация с развитием остеопороза [117,118,143]. Женщины с ПОН также имеют нарушения со стороны ЦНС и когнитивных функций [74,102].

Всё это ведёт к прогрессирующему ухудшению качества жизни пациентов с ПОН, что выражается в росте числа сердечно-сосудистых, онкологических, аутоиммунных и многих других заболеваний и неуклонно ведёт к сокращению ожидаемой продолжительности жизни этих женщин.

## **1.2. Роль климактерического синдрома у пациенток с преждевременной овариальной недостаточностью**

Климактерический синдром (КС) – комплекс вегетативно-сосудистых, психических и обменно-эндокринных нарушений, возникающих у женщин на фоне угасания гормональной функции яичников и общего старения организма, который значительно снижает качество жизни [21].

КС наблюдается у 30–60% женщин и является осложнением естественного течения климактерического периода [21].

## Периоды климактерия

- период менопаузального перехода (период, характеризующийся вариабельностью циклов, начинается в 40-45 лет и заканчивается с наступлением менопаузы);
- менопауза (стойкое прекращение менструаций, последняя самостоятельная менструация, обусловленная возрастным снижением или выключением функции яичников);
- перименопауза (период менопаузального перехода + 12 месяцев после последней самостоятельной менструации);
- постменопауза (период после наступления менопаузы).

Периоды климактерия могут индивидуально различаться, исходя из возраста своего наступления, однако мы всё ещё можем выделить общие закономерности (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Хронологическая периодизация климактерия

## Причины возникновения

В репродуктивном периоде яичник, как основной источник половых гормонов у женщин, обеспечивает надежную защиту организма. С возрастом его функция снижается и к менопаузе выработка женских гормонов практически полностью прекращается. Рецепторы к половым гормонам находятся практически во всех органах и системах. Поэтому выраженный дефицит половых стероидов,

особенно эстрогенов, вызывает системные изменения в органах и тканях, что и вызывает различные проявления КС.

Частота, характер и тяжесть климактерических нарушений во многом зависит от внешних факторов (питания, вредных привычек и др.), сопутствующих экстрагенитальных заболеваний.

### **Клинические проявления климактерического синдрома (КС)**

В ранней постменопаузе доминируют симптомы эстрогенодефицита, которые могут начинаться в перименопаузе и продолжаться в постменопаузе:

- **Вазомоторные:** приливы, повышенная потливость;
- **Психологические:** депрессивные симптомы, раздражительность, возбудимость, расстройство сна, слабость, сниженная память и концентрация внимания;
- **Общие физические:** астенизация, прибавка массы тела, головные боли, мышечно-суставные боли, появление морщин, нарушение тургора кожи, выпадение волос;
- **Урогенитальные и сексуальные:** зуд, жжение, сухость, диспареуния, нарушение мочеиспускания, снижение сексуального влечения;

Поздние возможные нарушения, связанные также и с длительным дефицитом половых гормонов:

- **Метаболические** (избыточный вес, ожирение, абдоминальное отложение жира, инсулинорезистентность и риск сахарного диабета 2 типа);
- **Сердечно-сосудистые** (поражение эндотелия сосудов, нарушение липидного обмена и т.д.);
- **Скелетно-мышечные** (ускорение потери костной ткани, остеопения, остеопороз, повышение риска переломов, саркопения);
- **Урогенитальные** (атрофический вульвовагинит, учащенное мочеиспускание, циститы, ургентное недержание мочи, дизурия).

### **1.3. Взаимоотношения между сердечно-сосудистой патологией и преждевременной овариальной недостаточностью**

Основной причиной сокращения продолжительности жизни у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью являются сердечно-сосудистые заболевания [89], и поэтому в некоторых исследованиях рассматривается вопрос о риске сердечно-сосудистых заболеваний у этой группы пациентов. На сегодняшний день показано, что женщины с ПОН подвержены нескольким факторам риска развития сердечно-сосудистых заболеваний: эндотелиальная дисфункция, вегетативная дисфункция, аномальный липидный профиль, нарушение инсулинового действия и метаболический синдром.

Функция эндотелия, измеряемая как поточно-опосредованное расширение плечевой артерии, значительно снижается у женщин с ПОН. Аналогичным образом уменьшается количество циркулирующих клеток-предшественниц эндотелия, что коррелирует со снижением концентрации эстрадиола в сыворотке крови [101,49]. У женщин с преждевременной овариальной недостаточностью наблюдается увеличение толщины интимы сонной артерии и диастолической функции левого желудочка [114]. Интересно, что гормональная терапия продолжительностью 6 месяцев способна улучшить поточно-опосредованное расширение в 2,4 раза, до тех же уровней, что и у здоровых людей [114]. Goldmeier S, et al. [49], также показали нормальную эндотелиально-зависимую вазодилатацию у женщин с ПОН при гормональной терапии. Несмотря на это, в том же исследовании авторы показали ослабленную чувствительность к барорефлексу (у пациентов с ПОН  $3,9 \pm \sigma 1,38$  против  $7,15 \pm \sigma 3,62$  у контрольной группы мс/мм рт.ст.) и пониженную вариабельность сердечного ритма (у пациентов с ПОН  $2310 \pm \sigma 1173$  против  $3754 \pm \sigma 1921$  у контрольной группы мс<sup>2</sup>) у женщин с ПОН (N = 17) в сравнении со здоровыми людьми из контрольной группы (N = 15) [149].

Пациенты с преждевременной овариальной недостаточностью имеют отклонения в липидном профиле, но результаты противоречивы в отношении отдельных липопротеидов.

Как сообщили Knauff E.A., et al. [114], у женщин с ПОН (N = 90) уровень ТГ значительно выше (средняя разница: 0,17 лог-ммоль/л [95% ДИ 0,06-0,29]) и ниже уровень холестерина ЛПВП по сравнению с контрольной группой (n = 198) после коррекции с учетом возраста, индекса массы тела и курения.

Эта разница не была подтверждена в меньшем по размеру исследовании (N = 47 ПОН против 60 в контрольной группе) Gulhan I., et al. [149]. Тем не менее, эта группа выявила более высокие уровни ТГ и ЛПОНП у пациентов с ПОН и отрицательную корреляцию между эстрадиолом и уровнями ТГ ( $r = -0.291$ ,  $P = 0.047$ ).

Недавно Ates S., et al. [56], сообщили об увеличении уровня ТГ и холестерина ЛПВП у женщин с ПОН (N = 59) по сравнению со здоровыми женщинами из контрольной группы (N = 59).

M. Kulaksizoglu в ходе своего исследования, не обнаружил у женщин с ПОН существенного отклонения от контрольной группы таких показателей как: уровень глюкозы крови, концентрация инсулина, индекс инсулинорезистентности (НОМА-IR), холестерин липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и триглицериды, однако частота встречаемости метаболического синдрома была значительно выше чем в контрольной группе [145]. Другие авторы, напротив, обнаружили увеличение сывороточной глюкозы, инсулина и индекса инсулинорезистентности (НОМА-IR) у женщин с ПОН (N = 43) по сравнению с контролем (N = 33) [66].

Несмотря на наличие противоречивых данных по липидному профилю и индексам инсулинорезистентности, общий сердечно-сосудистый риск у женщин с ПОН, по-видимому, значительно возрос, как показал анализ причин смертности в этой группе. Особенно в группе женщин с ишемической болезнью сердца риск смерти от нее увеличивается примерно на 80% по сравнению с женщинами с менопаузой в возрасте 49-55 лет [106].

Существует значительное количество литературы, связывающей раннюю менопаузу с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и смерти. В Фрамингемском исследовании было обнаружено, что женщины в возрасте до сорока лет, которые находились в постменопаузе, достоверно имели повышенную частоту сердечно-сосудистых заболеваний по сравнению с женщинами того же возраста, которые были в пременопаузе [119]. Аналогичным образом, повышенный риск сердечно-сосудистых заболеваний у женщин с ПОН по сравнению с женщинами с менопаузой в возрасте 50 лет и старше, был отмечен в другом крупном мета-анализе [120].

Parashar et al. [67] выявили, что ПОН влияет на риск развития стенокардии и инфаркта миокарда. Они обнаружили, что женщины с первичной или вторичной менопаузой в возрасте до 40 лет, имеют в два раза больший риск развития стенокардии и инфаркта миокарда по сравнению с женщинами, переживающими менопаузу в возрасте 50 лет и старше [67].

Недавно были проведены два исследования, которые предположили наличие связи между ПОН и риском развития сердечной недостаточности.

В многоэтническом исследовании, Ebong et al., было обнаружено, повышение риска развития сердечной недостаточности, он был увеличен на 66% у женщин с ПОН, по сравнению с женщинами с физиологической менопаузой [33].

Аналогичным образом, Rahman et al. сообщили о 36% увеличении частоты сердечной недостаточности у женщин с ПОН в возрасте 40-45 лет по сравнению с женщинами с менопаузой в возрасте 50-54 лет, при этом риск сердечной недостаточности снижается на 2% с каждым год увеличения возраста наступления менопаузы [139].

Остается неясным, играет ли дефицит эстрогена роль в этиологии сердечной недостаточности, у женщин, или другие факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний способствуют более раннему возрасту менопаузы, а также риску сердечно-сосудистых заболеваний [45,93].

ПОН связана с ранней смертностью, которая, как полагают, связана в первую очередь с повышенным риском развития ИБС.



Когортное исследование пациентов с овариоэктомией в клинике Майо выявило повышенный риск смерти у женщин с ПОН в возрасте до 45 лет и не получавших ЗГТ по сравнению с референтными женщинами [93,134,154,103].

В исследовании «Здоровая медсестра» женщины с ПОН в возрасте до 40 лет имели значительное увеличение смертности от всех причин, общего рака и сердечно-сосудистых заболеваний за 28 лет наблюдения [115].

Аналогичным образом, Gierach et al. обнаружили, что более молодой возраст наступления ПОН связан с повышенным риском смерти от всех причин и, в частности, со смертностью, связанной с ИБС. Этот риск постепенно снижался с увеличением возраста наступления менопаузы и полностью исчезал к 50 годам. Было обнаружено, что ЗГТ снижает риск смерти, ассоциированной с ПОН [116].

Многочисленные обсервационные исследования показали, что раннее наступление менопаузы или снижение продолжительности, активной работы яичников, связано с повышенным риском развития инсульта, в частности ишемического инсульта [146,132,98,35,127,133].

Многоэтническое исследование показало, что женщины разного этнического происхождения с ПОН идиопатического или хирургического генеза имели повышенный риск развития ИБС и инсульта [68].

ПОН связана с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и смерти, при этом более ранний возраст наступления ПОН оказывает большее влияние на риск.

#### **1.4. Структура смертности у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью**

Женщины, с диагнозом преждевременная овариальная недостаточность, достоверно имеют повышенный риск смерти от всех причин, но, в первую очередь, от сердечно-сосудистых.

По данным крупного Норвежского исследования, в котором участвовало 19731 женщина, было обнаружено, что менопауза в возрасте до 40 лет связана с

повышением смертности на 1,06 (доверительный интервал (ДИ) 0,99-1,14) по сравнению с женщинами, у которых менопауза наступила в возрасте 50-52 года [105]. Также, в ходе этого исследования было показано, что ранний возраст наступления менопаузы, сокращает ожидаемую продолжительность жизни.

Другое крупное когортное исследование, проведённое в Соединённых Штатах Америки (США) и включившее в себя 68154 взрослые женщины, показало, что смертность от всех причин выше среди женщин, сообщивших о наступлении у них менопаузы в возрасте 40-44 лет, по сравнению с женщинами, сообщившими о том же в возрасте 50-54 лет (коэффициент процента (КП) = 1,04, 95%; ДИ 1,00-1,08) [34].

Повышенный риск смерти от всех причин, в основном связан со смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) (КП = 1,09, 95% ДИ 1,00-1,18), болезней дыхательных системы (КП = 1,19, 95% ДИ 1,02-1,39), мочеполовых заболеваний (КП = 1,39, 95% ДИ 1,07-1,82) и внешних причин (КП = 1,56, 95% ДИ 1,21-2,02) [89].

Структура смертности, пациентов с ПОН, весьма разнообразна, однако, исходя из этиологических причин, можно выделить четыре основных фактора (Рисунок 2).

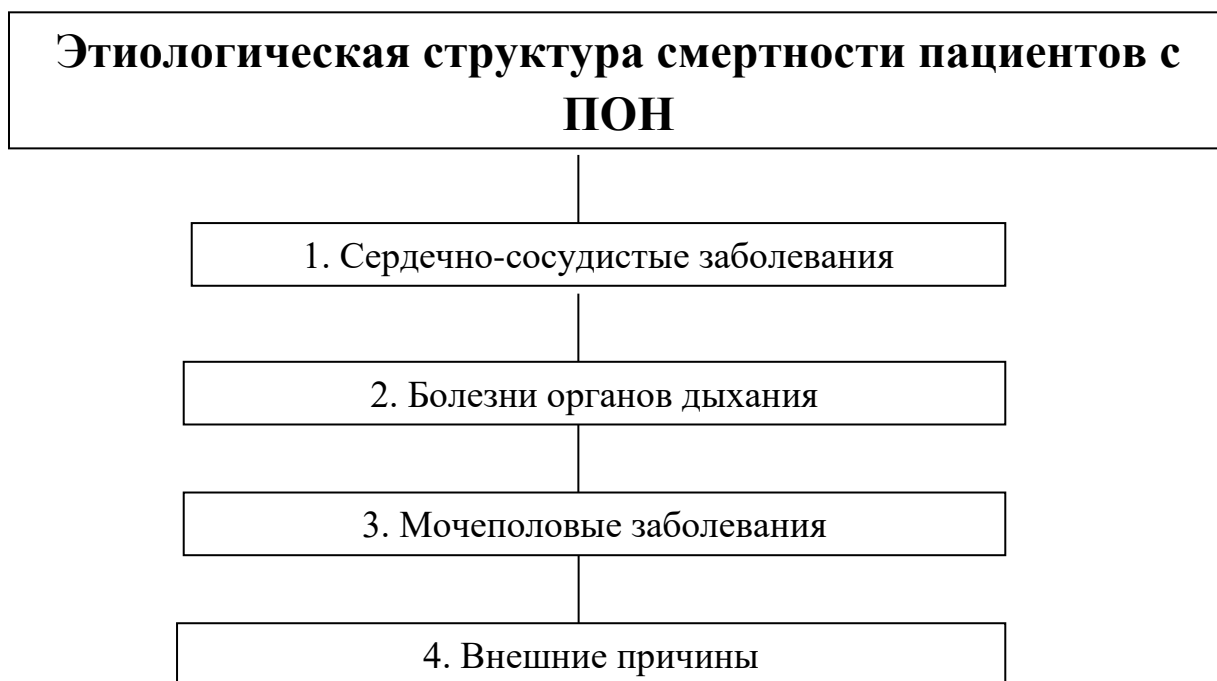


Рисунок 2 – Этиологическая структура смертности пациентов с ПОН

Европейским обществом репродукции человека опубликовано руководство по ведению больных с преждевременной овариальной недостаточностью [72].

По мнению экспертов, женщин с преждевременной овариальной недостаточностью, в первую очередь, следует консультировать по вопросам снижения факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Им следует отказаться от употребления алкоголя и никотина, заняться регулярными, но не чрезмерными физическими нагрузками, поддерживать нормальную массу тела, а также прекратить бесконтрольный приём антидепрессантов, как средств лечения повседневных стрессов, с целью снижения у них риска преждевременной смерти. Сердечно-сосудистая оценка должна состоять из ежегодного мониторинга артериального давления, уровня холестерина, индекса массы тела, а также статуса курения.

### 1.5. Оценка генных полиморфизмов у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью

Исследованию на наличие у них ассоциации с преждевременной овариальной недостаточностью (ПОН), подвергались следующие наиболее часто встречаемые генные полиморфизмы, ассоциированные с сердечно-сосудистыми заболеваниями: ген *AGT* полиморфизм (Met235Thr), ген *ITGA2* полиморфизм (C807T), ген *NOS3* полиморфизм (C786T), ген *FGB* полиморфизм (455G-A), ген *ITGB3* полиморфизм (Leu59Pro), ген *SERPINE (PAI) 1* полиморфизм (675 5G/4G), ген *IL6* полиморфизм (G(-572)C), ген *EDN1* полиморфизм (Lys198Asn) (Таблица 1). Данные полиморфизмы, оценивались в исследованиях по нескольким причинам: на основании достаточно высокой частоты их встречаемости в европейской популяции, и из-за наличия доказанной у них ассоциации с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Таблица 1 – исследуемые генные полиморфизмы, частота встречаемости и ассоциированные заболевания

Ген	Полиморфизм	Частота встречаемости	Ассоциированные заболевания
AGT	Met235Thr	41 %	Артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, хроническая почечная недостаточность, эклампсия и преэклампсия
ITGA2	C807T	40 %	Тромбоз, тромбоэмболия, инфаркт миокарда, ишемический инсульт
NOS3	C786T	35 %	Ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, ишемический инсульт

FGB	455G-A	20 %	Тромбоз, ишемический инсульт, привычное невынашивание, фетоплацентарная недостаточность
ITGB3	Leu59Pro	13 %	Инфаркт миокарда, тромбоэмболия, тромбоцитопения у новорождённых, посттрансфузионная пурпура, аутизм и раннее прерывание беременности
SERPINE (PAI) 1	675 5G/4G	53-61 %	Атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, тромбоз, тромбоэмболические осложнения беременности, преэклампсия, ожирение, инсулинорезистентность, менингококковая инфекция и остеопороз
IL6	G(-572)C	5 %	Острый коронарный синдром (ОКС), снижение минеральной плотности костей, идиопатический юношеский сколиоз
EDN1	Lys198Asn	23 %	Дилатационная кардиомиопатия, артериальная гипертензия, гипертрофия левого желудочка, сердечная недостаточность, легочная гипертензия, ишемического инсульт

## ГЕН *AGT*, МУТАЦИЯ T704C (MET235THR)

Ген *AGT* (OMIM: +106150) локализован в хромосоме – 1q42.2.

Ген *AGT* кодирует белок ангиотензиноген – сывороточный глобулин, вырабатываемый клетками печени, из которого под действием ренина образуется ангиотензин I.

Участок ДНК гена *AGT*, в котором тимин (Т) заменяется на цитозин (С) в позиции 704, называется генетическим маркером T704C. В результате такой замены, в белке ангиотензиногене, в позиции 235 аминокислотной последовательности, происходит замещение аминокислоты метионина на триптофан (Met235Thr) [63].

Встречаемость С-аллеля в европейской популяции составляет 41 % [159].

Данная мутация ассоциирована с такими заболеваниями как: артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, хроническая почечная недостаточность, эклампсия и преэклампсия.

Ген *AGT* кодирует белок ангиотензиноген, сывороточный глобулин альфа-глобулиновой фракции, вырабатываемый в основном клетками печени, из которого под действием ренина образуется ангиотензин I. Ренин отщепляет декапептид (пептид из 10 аминокислот Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) от ангиотензиногена, гидролизуя пептидную связь между лейцином и валином, что приводит к высвобождению ангиотензина I. Ангиотензин I не обладает биологической активностью и является только предшественником активного ангиотензина II. Ангиотензиноген относится к серпинам, хотя в отличие от большинства серпинов он не ингибирует другие белки. Его уровень повышается под действием плазменных кортикостероидов, эстрогена, тиреоидного гормона и ангиотензина II.

Существует около 15 различных аллельных вариантов гена *AGT*. Ассоциация с развитием гипертензии показана для замены тимина (Т) на цитозин (С) в позиции 704 последовательности ДНК гена *AGT* – данный участок называется генетическим маркером T704C. В результате такой замены, в белке

ангиотензиногене в позиции 235 аминокислотной последовательности, происходит замещение аминокислоты метионина на триптофан (Met235Thr), а также повышается базальный уровень транскрипции гена. Из-за этого у людей с генотипом C/C в плазме увеличивается концентрация ангиотензиногена на 10-20 %, по сравнению с генотипом T/T [159].

Частота встречаемости C-аллеля среди белых европейцев, составляет около 41 %, однако, он наиболее распространен в африканской популяции, где составляет примерно 87 % [159].

Существует расовое различие в работе ренин-ангиотензиновой системы. Исследователями выявлено увеличение частоты встречаемости C-аллеля, почти в 2 раза и повышение уровня ангиотензиногена на 19 % у людей из африканской популяции, по сравнению с европейской [159].

Изучая частоты распределения генотипов в этнической группе людей, живущих в ОАЭ, ученые обнаружили, что C-аллель чаще выявляется в группе страдающих гипертонией.

Частота встречаемости C-аллеля уменьшается с течением возраста, что, по-видимому, может быть связано с сокращением продолжительности жизни носителей данного аллеля [44].

Гипертоническая болезнь, встречается примерно у 20 % населения и является фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда и ишемический инсульт. Терапия, направленная на снижение артериального давления, уменьшает вероятность ишемического инсульта на 35-40 % , а инфаркта миокарда на 25 %. На эффективность терапии оказывает влияние полиморфизм генов RAS, а именно ACE и AGT [44].

Определив, генотип пациентов и выявив у них маркеры данных полиморфизмов, можно куда более точно подобрать терапию с учётом имеющихся факторов риска.

Клиническое исследование, по изучению полиморфизма гена AGT в группе пациентов с IgA нефропатией, показало, что у пациентов с генотипами C/C и T/C

отмечалось значительное ухудшение функций почек (значения протеинурии и показатель клиренса креатинина), по сравнению с носителями Т/Т генотипа. На основании этого, был сделан вывод, что полиморфизм гена *AGT*, наряду с геном *ACE*, является важным маркером для прогноза прогрессирования хронической почечной недостаточности у пациентов с IgA-нефропатией [40].

Исследование группы из 1642 пациентов с гипертонией, 42 из которых имели отягощённый сердечно-сосудистый анамнез по поводу перенесённого ими инфаркта миокарда, на фоне терапии ингибиторами АПФ (ангиотензин-превращающий фермент), выявлено, что 6 пациентов имели генотип Т/Т и 36 – Т/С- или С/С-генотипы соответственно.

Таким образом, в результате исследования, было выявлено, что наличие как минимум одного С-аллеля связано с повышенным риском развития ИБС и инфаркта миокарда у пациентов, получающих терапию ингибиторами АПФ [37].

В результате исследования группы женщин с гипертонией, появившейся на фоне беременности, и пациенток с преэклампсией было выявлено достоверное увеличение частоты встречаемости С-аллеля (генотипов С/С и С/Т), по сравнению с его нормальной распространенностью в популяции [36].

Своевременное выявление данного генетического полиморфизма поможет предотвратить развития ряда тяжёлых заболеваний, таких как: артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, хроническая почечная недостаточность, эклампсия и преэклампсия.

### **ГЕН *ITGA2*, МУТАЦИЯ С807Т**

Ген *ITGA2* (ОМIM: +192974) локализован в хромосоме – 5q11.2.

Ген *ITGA2* кодирует белок интегрин альфа-2 – мембранный гликопротеин, известный как GPIa (platelet glycoprotein Ia, или very late activation protein (VLA)), экспрессирующийся на мембранах различных клеток, включая мегакариоциты, фибробласты и тромбоциты.



На мембране тромбоцитов GPIa образует комплекс с GPIIa, представляющий собой один из рецепторов коллагена.

Участок последовательности ДНК гена *ITGA2*, в которой происходит замена нуклеотида цитозина (С) на тимин (Т) в позиции 807, обозначается как генетический маркер С807Т [54].

Частота встречаемости Т-аллеля в европейской популяции составляет около 40 % [32].

Данная мутация ассоциирована с такими заболеваниями как: тромбоз, тромбоэмболия, инфаркт миокарда и ишемический инсульт. Это связано с регуляцией данного полиморфизма гомеостаза и устойчивости стенки сосудов к различным повреждениям.

Интегрин альфа-2, известный также как GPIa (или very late activation protein (VLA)) – это мембранный гликопротеин, экспрессирующийся на поверхности различных клеток и образующий комплексы с другими белками, он кодируется геном *ITGA2*.

Комплекс GPIa и GPIIa (ITGB1) является одним из рецепторов коллагена, расположенный на клеточной мембране тромбоцитов, а также ряда клеток, включая фибробласты и мегакариоциты.

Повышение экспрессии рецепторов GPIa/IIa на поверхности клеток тромбоцитов, обнаружено у гомозигот по аллелю Т (генотип Т/Т), в то время как у гомозигот по аллелю С (генотип С/С) наблюдалось снижение этой экспрессии. Наличие Т-аллеля, ассоциировано, с увеличением скорости адгезии тромбоцитов, что может являться фактором риска развития тромбофилии [95].

В клиническом исследовании выявлено наличие ассоциации между Т-аллелем и риском развития ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, ишемического инсульта и тромбоэмболии, особенно в молодом возрасте [91].

Исследование данного полиморфизма рекомендовано для оценки риска развития тромбозов у больных перенёсших ангиопластику и (или) стентирование коронарных артерий. Своевременное выявление данного генетического полиморфизма поможет предотвратить развития ряда тяжёлых заболеваний, таких

как: ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, ишемический инсульт и тромбоэмболия лёгочной артерии, что безусловно уменьшит смертность от этих заболеваний и увеличит ожидаемую продолжительность жизни этих пациентов.

### **ГЕН *NOS3*, МУТАЦИЯ C786T**

Ген *NOS3* (OMIM: +163729) локализован в хромосоме – 7q36.1.

Ген *NOS3* кодирует белок – эндотелиальную синтазу азота 3-го типа.

Участок в регуляторной области ДНК гена *NOS3*, в котором происходит замена тимина (Т) на цитозин (С), в позиции – 786, называется генетическим маркером Т(-786)С [155].

Частота встречаемости С-аллеля в европейской популяции составляет примерно 35 % [156].

Данная мутация, в основном ассоциирована с заболеваниями, протекающими со спазмом коронарных артерий.

В современных условиях жизни, сердечно-сосудистая система оказывается подвержена множеству рисков, что приводит к планомерному ухудшению её работы и функции. Со временем в организме происходит дисбаланс, между потребностью организма в питательных веществах и его возможностью, что в дальнейшем приводит, к возникновению сердечно-сосудистой недостаточности – частому осложнению заболеваний сердца и сосудов. Обычно ее причинами становятся ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, артериальная гипертензия и иногда кардиомиопатия.

К артериальной гипертензии могут приводить многие механизмы, одним из таких является нарушение сосудистой регуляции, ассоциированное со снижением содержания оксида азота в крови.

Оксид азота, также известный как эндотелиальный релаксирующий фактор, вызывает расслабление гладкой мускулатуры в стенках кровеносных сосудов, повышая, таким образом, проницаемость эндотелия и подавляя прилипание (адгезию) тромбоцитов к стенке сосуда. Снижение его активности вызывает

сужение просвета артерий (вазоконстрикцию), в результате которой повышается периферическое сопротивление сосудов, что ведёт к повышению артериального давления и увеличивает вероятность развития тромбозов.

Оксид азота также принимает участие в нейронной передаче импульсов и их стимуляции, в регуляции деятельности желудочно-кишечного тракта, органов дыхательной и мочеполовой системы, в формировании обонятельной памяти, синоптических связей (передаче нервного импульса) и в ангиогенезе (образовании новых кровеносных сосудов).

Оксид азота (NO) очень нестабилен, полупериод жизни молекулы составляет не более нескольких секунд, в кровяном русле он инактивируется гемоглобином или кислородом с образованием нитрита и нитрата.

NO синтезируется из L-аргинина ферментом – синтазой оксида азота (COA), с образованием конечного продукта L-цитруллина. Существует три изофермента синтазы оксида азота: I, II, III типа.

По физиологическим свойствам COA подразделяются на 2 группы:

конститутивные (нейрональная (I тип) и эндотелиальная (III тип), постоянно работающие в различных тканях и типах клеток (в основном в сосудах, нервной ткани и тромбоцитах);

индуцибельные (II тип), которые начинают синтезировать NO в ответ на воспалительную реакцию.

Эндотелиальная COA кодируется геном *NOS3* и представляет собой фермент клеток эндотелиоцитов и кардиомиоцитов, синтезирующий оксид азота в ответ на нейрогуморальное воздействие.

Экспрессия гена *NOS3* происходит постоянно, однако при физической нагрузке, стрессе, а также хронической гипоксии уровень активности COA значительно повышается.

На нормальную работу гена значительное влияние оказывает замена азотистого основания Тимина (Т) на Цитозин (С) в регуляторной области последовательности ДНК гена *NOS3*. Участок, в котором она происходит,

называется генетическим маркером T(-786)C. В результате такого замещения существенно понижается экспрессия гена.

Различные исследования доказали наличие ассоциации между C-аллелем и спазмом коронарных артерий [47]. Особенную актуальность это приобрело, в условиях современной жизни, когда сердечно-сосудистая система человека и так, постоянно подвергается разнообразным рискам. На фоне уже имеющейся генетической предрасположенности к развитию сердечно-сосудистых заболеваний (наличию в генотипе C-аллеля гена *NOS3*) вероятность развития данной патологии значительно возрастает.

Данное исследование показано при заболеваниях, сопровождающихся нарушением сосудистого тонуса, в том числе коронарного, тест особенно важен при частых стрессовых ситуациях, длительном стаже курения, а также выявленных заболеваниях сердечно-сосудистой системы у ближайших родственников.

Своевременное выявление данного генетического полиморфизма поможет предотвратить развития ряда тяжёлых заболеваний, таких как: ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда и ишемический инсульт, что уменьшит смертность от этих заболеваний и увеличит ожидаемую продолжительность жизни этих пациентов.

### **ГЕН *FGB*, МУТАЦИЯ 455G-A**

Ген *FGB* (ОМIM: \*134830) локализован в хромосоме – 4q31.3.

Ген *FGB* кодирует бета-полипептидную цепь белка фибриногена, растворимого белка плазмы крови, который относится к группе глобулинов (фактор I свёртывания крови). Под действием фермента тромбина этот белок способен превращаться в фибрин и образовывать тромб.

Участок ДНК в регуляторной области гена *FGB*, в которой происходит замена гуанина (G) на аденин (A) в позиции – 455, обозначается как генетический маркер G(-455)A. Наличие замены влияет на интенсивность синтеза белка фибриногена [53].

Частота встречаемости минорного (А) аллеля в европейской популяции составляет примерно 20 % [41].

Мутация 455G-A ассоциирована с такими заболеваниями как: тромбозы, ишемический инсульт и патология беременности (привычное невынашивание, фетоплацентарная недостаточность и т.д.). Ее действие связано с влиянием на систему свертываемости крови.

Фибриноген – белок, вырабатываемый в печени и циркулирующий в плазме крови. При активации системы свёртывания крови он подвергается ферментативному расщеплению ферментом тромбином. Образующийся фибрин-мономер под действием активного фактора свёртывания крови F13 выпадает в осадок в виде белых нитей фибрина-полимера. Фибрин представляет собой основу сгустка крови и впоследствии образует тромб, завершая процесс свертывания.

Ген *FGB* кодирует бета-полипептидную цепь белка фибриногена. Замена G (гуанина) на A (аденин) в регуляторной области гена *FGB* ассоциирована с повышенной концентрацией в плазме крови белка фибриногена.

Ряд исследований показал, что носители А-аллеля (генотип G/A и A/A) имеют повышенный риск развития у них, ишемического инсульта и наличие этого аллеля можно считать его прогностическим фактором, особенно у людей с отягощенным анамнезом: курильщиков, страдающих артериальной гипертонией, ожирением, повышенным уровнем инсулина и глюкозы крови [81].

Также было обнаружено, что повышенный уровень фибриногена в крови, вызванный присутствием в генотипе А-аллеля, приводит к атеросклеротическим изменениям в сосудах головного мозга, вызывая тем самым риск развития инсульта [113]. Причем у гомозигот по А-аллеля (генотип A/A), чаще наблюдается повреждение сосудов, по сравнению с гетерозиготами (генотип G/A) [39].

Ещё исследователи обнаружили наличие, ассоциации между А-аллелей и двукратным увеличением вероятности развития аневризмы брюшной аорты [46].

Более того, негативное воздействие А-аллеля, сильнее выражено у женщин с преждевременной менопаузой и в период после менопаузы [112].

Наличие отягощающих факторов риска, таких как курение и избыточная масса тела, оказывает негативный эффект на носителей А-аллеля, увеличивая концентрация фибриногена в плазме крови [112].

В ряде гинекологических исследований было обнаружено, что женщины с генотипом А/А чаще встречаются среди пациенток с привычным невынашиванием, но при этом, частота аллели в группах женщин с привычным невынашиванием и здоровых женщин достоверно не отличаются, поэтому можно предположить, что эффект полиморфизма гена *FGB* влияет на данную патологию не так сильно [112].

Однако А-аллель существенно влияет на риск развития венозных тромбозов, у пациентов во время беременности и в раннем послеродовом периоде [112].

Исследование полиморфизма гена *FGB* имеет прогностическое значение при оценке рисков: тромбозов, ишемического инсульта на фоне повышенного артериального давления и патологии беременности (привычное невынашивание, фетоплацентарная недостаточность и т.д.) [112].

Выявление А-аллеля позволит провести своевременные профилактические мероприятия, связанные с контролем уровня фибриногена в крови, артериального давления, коррекцию образа жизни и профилактику таких грозных осложнений, как ишемический инсульт и патология беременности.

### **ГЕН *ITGB3*, МУТАЦИЯ Leu59Pro**

Ген *ITGB3* (ОМIM: \*173470) локализован в хромосоме – 17q21.32.

Ген *ITGB3* кодирует белок интегрин бета-3 (*ITGB3*) – мембранный гликопротеин, известный как тромбоцитарный гликопротеин IIIa (platelet glycoprotein GPIIIa). На мембране тромбоцитов GPIIIa образует комплекс с GPIIb

(альфа-субъединица, кодирующаяся геном *ITGA2B*), представляющий собой тромбоцитарный рецептор фибриногена.

Участок ДНК гена *ITGB3*, где происходит замена тимина (Т) на цитозин (С) в позиции 1565, обозначается как генетический маркер T1565C. В результате такой замены меняются биохимические свойства белка GPIIa, в котором аминокислота лейцин замещается на пролин в позиции 59 (Leu59Pro) [55].

Частота встречаемости С-аллеля в европейской популяции составляет 13 % [124].

Мутация Leu59Pro ассоциирована с такими заболеваниями как: инфаркт миокарда, тромбоэмболия, тромбоцитопения у новорождённых, посттрансфузионная пурпура, аутизм и раннее прерывание беременности за счет влияния мутации на систему свертывания и васкулярную эндотелиальную функцию.

Ген *ITGB3* кодирует белок бета-3-интегрин – мембранный гликопротеин, известный как тромбоцитарный гликопротеин IIIa (platelet glycoprotein GPIIa). На мембране тромбоцитов GPIIa образует комплекс с GPIIb, представляющий собой тромбоцитарный рецептор фибриногена, а также фактора Виллебранда и фибронектина. При повреждении стенки сосуда тромбоциты, благодаря присутствию на мембране данного рецептора, взаимодействуют с фибриногеном плазмы крови, в результате чего происходит их агрегация и формируется тромб.

Рецептор IIb/IIIa играет важную роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний.

Ряд исследований показали, что носители С-аллеля имеют более высокую агрегацию тромбоцитов, что может являться причиной увеличения риска тромбообразования, приводящего к таким заболеваниям как: инфаркт миокарда, ТЭЛА и раннее прерывание беременности, вследствие тромботического поражения плаценты [31].

В одном из исследований было выявлено увеличение частоты С-аллеля в группе пациентов, перенесших инфаркт миокарда в возрасте до 60 лет, в два раза по сравнению с контрольной группой [31].

В другом же была выявлена ассоциация между полиморфизмом гена *ITGB3* и синдромами иммунных разрушений тромбоцитов, особенно с неонатальной тромбоцитопенией и аллоиммунной посттрансфузионной пурпурой [130].

В исследовании на группе здоровых мужчин, некурящих студентов-медиков в возрасте от 21 до 24 лет, было обнаружено наличие ассоциации между полиморфизмом гена *ITGB3* и повышенной выработкой тромбина с нарушением антитромботического действия аспирина на месте микрососудистых травм [130]. При дальнейшем изучении этой группы, было выявлено, что у пациентов с генотипом Т/С и С/С эффективность применения в качестве антиагрегантов такого препарата, как аспирин, значительно снижена [104].

В достаточно крупном исследовании 9 233 человек, из которых 267 наблюдались в течение 25 лет, было выявлено, что у люди с мутацией Leu59Pro имели в 2 раза более высокий риск развития у них, перелома шейки бедра по сравнению со здоровыми людьми [42]. При этом риск был особенно повышен у женщин с преждевременной менопаузой и в постменопаузе, у которых отношение рисков составило 2,6 после поправки на возраст наступления менопаузы и на применение заместительной гормональной терапии [42].

Выявление С-аллеля, мутации Leu59Pro позволит провести своевременные профилактические мероприятия, по поводу таких заболеваний как: инфаркт миокарда, тромбоэмболия, тромбоцитопения у новорождённых, посттрансфузионная пурпура, аутизм и раннее прерывание беременности, а также может быть использована, для оценки исследования результатов эффективности терапии аспирином.

### **ГЕН *SERPINE (PAI) 1*, МУТАЦИЯ 675 5G/4G**

Ген *SERPINE1* (ОМIM: \*173360) локализован в хромосоме – 7q22.1.

Ген *SERPINE1* кодирует белок – эндотелиальный ингибитор активатора плазминогена – 1 (ИАП-1), принадлежащий семейству серпинов. Белок ИАП-1



ингибирует, т. е. замедляет работу тканевого активатора плазминогена и урокиназы, которые в свою очередь активируют переход плазминогена в плазмин, расщепляющий фибрин тромбов.

Таким образом, *SERPINE1* оказывает тормозящее воздействие на фибринолиз и препятствует растворению тромбов, что повышает риск развития тромбозов и различных сосудистых осложнений.

Полиморфизм гена *SERPINE1* проявляется в изменении количества повторов гуанина (G) в промоторной (регуляторной) области гена. Существует два варианта гена с разным количеством повторов гуанина в позиции – 675:

5G обозначает наличие последовательности из пяти оснований гуанина;

4G обозначает наличие последовательности из четырех оснований гуанина – это неблагоприятный вариант, приводящий к ослаблению фибринолитической активности крови [153].

Частота встречаемости 4G-аллеля в европейской популяции составляет 53-61 % [142].

Мутация 675 5G/4G ассоциирована с такими заболеваниями, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, тромбоз, тромбоемболические осложнения беременности, преэклампсия, ожирение, инсулинорезистентность, менингококковая инфекция и остеопороз.

Одной из ключевых систем сосудистого гомеостаза является фибринолитическая система, вызывающая асимметричное расщепление фибрина/фибриногена на более мелкие фрагменты.

Главным ферментом, ответственным за расщепление фибрина до растворимых фрагментов небольших размеров, является плазмин. Он образуется из плазминогена под действием активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типов, которые синтезируются эндотелиальными клетками. Образование плазмина начинается тогда, когда синтезируемый в печени плазминоген и его активаторы присоединяются к фибрину.

Оба активатора плазминогена находятся в токе крови в комплексе с ингибиторами, наибольшее значение имеет ингибитор активатора плазминогена –

1 (ИАП-1). Он продуцируется эндотелиальными клетками, клетками гладких мышц, мегакариоцитами и накапливается в тромбоцитах, которые на месте повреждения сосуда активируются и выделяют избыточное количество ИАП-1, предотвращая этим преждевременный лизис фибрина. ИАП-1 возрастает при многих патологических состояниях. Его выработку стимулируют тромбин, трансформирующий фактор роста бета, тромбоцитарный фактор роста, интерлейкин-1, фактор некроза опухоли альфа, инсулиноподобный фактор роста, глюкокортикоиды и эндотоксины. Активированный протеин С ингибирует выделенный из эндотелиальных клеток ИАП-1 и тем самым стимулирует лизис сгустка.

Повышение активности ИАП-1 может быть также вызвано полиморфизмом кодирующего его гена *SERPINE1*.

Полиморфизм гена *SERPINE1* проявляется в изменении количества повторов гуанина в промоторной (регуляторной) области гена. Существует два варианта гена с разным количеством повторов гуанина (G) в позиции -675: 5G и 4G.

5G обозначает наличие последовательности из пяти оснований гуанина; 4G обозначает наличие последовательности из четырех оснований гуанина – неблагоприятный вариант, приводящий к ослаблению фибринолитической активности крови за счет повышения концентрации в плазме ИАП-1. Это происходит из-за изменения процессов, регулирующих работу гена *SERPINE1*. При наличии в промоторной (регуляторной) области пяти повторов гуанина с ней могут связываться как активаторы, так и супрессоры транскрипции. Поэтому регуляция такого гена происходит правильно. При наличии четырех повторов гуанина связывание супрессора нарушено, следовательно, негативной регуляции не происходит и базальная активность синтеза белка повышена. У гомозигот по аллелю 4G (генотип 4G/4G) повышение концентрации белка ИАП-1 в плазме крови приводит к повышению риска тромбообразования, а при беременности – к увеличению риска невынашивания и

к такому осложнению, как преэклампсия – она связана с тромбозом межворсинчатых или спиральных артерий плаценты.

В клиническом исследовании было выявлено, что у пациентов с генотипом 4G/4G отмечается более высокая концентрация ИАП-1 по сравнению с детьми с генотипами 4G/5G или 5G/5G, это приводит к нарушению фибринолиза (его торможению) и является важным фактором риска в патофизиологии менингококкового сепсиса [53].

С другой стороны, присутствие аллеля 5G связано с меньшим торможением активатора плазминогена и, как следствие, с повышением активации тканевых металлопротеиназ (внеклеточных протеиназ), а именно они, по мнению некоторых исследователей, запускают механизмы хронического воспаления в стенке аорты, что приводит к потере ее структурной целостности и образованию аневризмы. Таким образом, пациенты с нормальной аллелью 5G, более подвержены риску развития аневризмы брюшной аорты, чем с мутантной аллелью 4G и здесь она играет защитную роль [164].

Выявление 4G-аллеля, мутации 675 5G/4G позволит провести своевременные профилактические мероприятия, по поводу таких заболеваний как: атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, тромбоз, тромбоэмболические осложнения беременности, преэклампсия, ожирение, инсулинорезистентность, менингококковая инфекция и остеопороз.

### **ГЕН *IL6*, МУТАЦИЯ G(-572)C**

Ген *IL6* (OMIM: \*147620) локализован в хромосоме – 7p15.3.

Ген *IL6* кодирует белок интерлейкин-6, который участвует в развитии иммунного ответа, запуская острую фазу воспаления.

Участок ДНК в регуляторной области гена *IL6* в позиции – 572, в которой происходит замена гуанина (G) на цитозин (C), называется генетическим маркером G(-572)C [112].

Частота встречаемости С-аллеля в целом по популяции составляет 29 %, а среди европейцев – 5 % [164].

Мутация G(-572)C, ассоциирована с такими заболеваниями как: острый коронарный синдром (ОКС), снижение минеральной плотности костей и идиопатический юношеский сколиоз.

Иммунитет – это сложный и не до конца изученный, комплекс реакций организма, направленный на защиту его, от инфекционных агентов и инородных веществ, отличающихся биологическими свойствами (от антигенов). Врожденными факторами защиты любого человека, являются белки-цитокнины, продуцируемые клетками крови и тканей (моноцитами, макрофагами, гранулоцитами, лимфоцитами) и передающие сигналы между клетками.

Одним из таких белков цитокинов, является интерлейкин-6 (ИЛ-6), который выполняет огромное количество функций. Он активирует продукцию белков острой фазы воспаления, участвуя в иммунной защите организма; влияет на эндокринную систему, стимулируя секрецию вазопрессина, соматотропного гормона, активируя гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему и подавляя функцию щитовидной железы; оказывает термогенное действие (локально повышая температуру). А также участвует в дифференцировке нервных клеток, стимуляции гепатоцитов, пролиферации и дифференцировке В- и Т-клеток. Играет существенную роль в патогенезе остеопороза, ревматоидного артрита, онкологических и других заболеваний.

Повышение уровня ИЛ-6 в крови наблюдается при тяжелых воспалительных процессах, инфекциях и травмах.

Белок ИЛ-6 кодируется геном *IL6*. Участок ДНК в регуляторной области гена этого гена в позиции -572, в которой происходит замена гуанина (G) на цитозин (C), называется генетическим маркером G(-572)C. Ген *IL6* может существовать в виде двух аллельных вариантов, обозначаемых как G-аллель и C-аллель.

В исследованиях выявлено наличие ассоциации между уменьшением числа *IL6*-протективных аллелей: С по маркеру G(-572)C и С по маркеру G(-174)C и

значительным увеличением уровня С-реактивного белка (до 79 %) и маркеров резорбции кости (до 32 %) [111].

Также был выявлен протективный эффект С-аллеля по маркеру G(-572)C и доказан в исследовании группы пациентов с идиопатическим юношеским сколиозом [43].

Другое исследование установило, взаимосвязь между снижением защитных аллелей, в генотипе и тенденцией к снижению минеральной плотности костной ткани в поясничном отделе позвоночника [160].

А также в исследовании, была показана защитная роль генотипа C/C при развитии острого коронарного синдрома, так как для генотипа C/G было характерно увеличение риска развития заболевания в 2,2 раза, по сравнению с нормальной гомозиготой [58].

Однако, полиморфизм гена *IL6* может оказывать и положительное воздействие, так как, являясь одним из защитных факторов предупреждающих развития хронического периодонтита, С-аллель ассоциирована с более низкой восприимчивостью к данному заболеванию [58].

Выявление С-аллеля, мутации G(-572)C позволит провести своевременные профилактические мероприятия, по поводу таких заболеваний как: острый коронарный синдром (ОКС), снижение минеральной плотности костей и идиопатический юношеский сколиоз.

### **ГЕН *EDN1*, МУТАЦИЯ Lys198Asn**

Ген *EDN1* (OMIM: \*131240) локализован в хромосоме – бр24.1.

Ген Эндотелина-1 (*EDN1*) кодирует белок, играющий ключевую роль в гомеостазе эндотелия сосудов. Данный белок обладает сосудосуживающим действием наподобие ангиотензина. Эндотелин также индуцирует накопление коллагена и стимулирует митогенез миофибробластов, и фибробластов. Подобная активность играет значительную роль при регенерации тканей и формировании рубца.

В 5-м экзоне гена была обнаружена однонуклеотидная замена Lys198Asn, представляющая собой трансверсию G>T в 5665-м нуклеотиде, приводящую к замене лизина (Lys) на аспарагин (Asn) в 198-м положении аминокислотной последовательности.

Частота встречаемости T-аллеля в европейской популяции – 23 % [140].

Мутация Lys198Asn ассоциирована с такими заболеваниями как: дилатационная кардиомиопатия, артериальная гипертензия, гипертрофия левого желудочка, сердечная недостаточность, легочная гипертензия и ишемического инсульта.

У человека было идентифицировано и секвенировано семейство структурно и фармакологически различных пептидов – эндотелинов. Выявлены три изоформы эндотелина человека: эндотелин-1, -2 и -3. Эндотелин-1 – мощный вазоконстрикторный пептид из 21 аминокислоты, вырабатываемый эндотелиальными клетками сосудов. Препроэндотелин-1 мРНК человека состоит из 2 026 нуклеотидов, исключая поли(А)хвост. Эндотелин-1 был первоначально выделен из супернатанта культур эндотелиальных клеток аорты свиньи и является самым мощным из известных вазоконстрикторов. Последующее клонирование и анализ последовательности из библиотеки кДНК плаценты человека показали, что эндотелин-1 человека идентичен эндотелину свиньи. Помимо вазоконстрикторного действия, эндотелин оказывает влияние на центральную нервную систему и возбудимость нейронов.

В одном из исследований было выявлено, что T-аллель повышает в 2 раза риск развития артериальной гипертензии, но при этом его эффект коррелируется с физической активностью [86].

В результате проведения, нескольких крупных исследований, была выявлена ассоциация между Lys198Asn и риском развития дилатационной кардиомиопатии [96], легочной гипертензии, у испанцев [76] и индийцев [136, 71].

Также было выявлено, что у гомозигот по T-аллелю повышен риск развития сердечной недостаточности [77].

В другом исследовании, было выявлено, что у мужчин-китайцев Т-аллель, повышает риск развития ишемического инсульта в 1,49 раза [165].

В то же самое время, группа других исследователей, выявила, что наличие гомозиготного генотипа Lys198Lys является существенным фактором риска развития гипертрофии левого желудочка (ЛЖ) в испанской популяции [148].

Выявление Т-аллеля, мутации Lys198Lys позволит провести своевременные профилактические мероприятия, по поводу таких заболеваний как: дилатационная кардиомиопатия, артериальная гипертензия, гипертрофия левого желудочка, сердечная недостаточность, легочная гипертензия и ишемического инсульта.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Базы проведения исследования

Основным местом проведения диссертационного исследования было Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России).

Работа выполнялась на базах кафедры поликлинической терапии, профилактической медицины и общей врачебной практики ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Базы проведения исследования: ГБУ РО «Рязанский областной клинический онкологический диспансер», ГБУ РО «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», ГБУ РО «Женская консультация №1», ГБУ РО «Городская поликлиника №2» ОКБ им. Н.А. Семашко, ГБУ РО «Городская клиническая поликлиника №6», ГБУ РО «Областной клинический кардиологический диспансер», ГБУ РО «Городской клинический родильный дом №1», ГБУ РО «Городская клиническая больница №11», ГБУ РО «Областная клиническая больница».

Исследование генных полиморфизмов проводилось в центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

### 2.2. Дизайн исследования

Согласно дизайну исследования, данное научное исследование, проходило в два этапа (Рисунок 3):

➤ На первом этапе происходил сбор и анализ имеющейся отечественной и зарубежной, литературы, происходило формирование критериев включения и исключения в исследование, и на их основе комплектовались обследуемые



группы. В исследовании участвовало две обследуемые группы, плюс контроль. На первом этапе проводилось: физикальное, лабораторное и инструментальное обследование, а также анализ имеющейся медицинской документации. Затем, был произведён расчёт относительного риска (RR) и отношения шансов (OR) сердечно-сосудистых событий и оценка сердечно-сосудистого риска с использованием шкал FRS, SCORE и SCORE2.

➤ На втором этапе происходил забор свежесобранного биологического материала (кровь), с последующей быстрой транспортировкой её в исследовательскую лабораторию, как правило, без использования заморозки, далее проводился её генетический анализ на наличие в ней генных полиморфизмов: Met235Thr; C807T; C786T; 455G-A; Leu59Pro; 675 5G/4G-; G(-572)C; Lys198Asn и расчёт относительного риска (RR) и отношения шансов (OR).

Через 24 месяца оценивались конечные точки исследования и сердечно-сосудистые риски пациентов с ПОН и женщин контрольной группы. Медиана наблюдений составила 963 (721;1217) дней, цифры в скобках означают минимальное и максимальное время наблюдений в нашей выборке. Конечные точки оценивались как для пациентов с первичной, так и со вторичной ПОН, все обследуемые пациенты прошли второй срез (отклик – 100%). Конечными точками считались: смерть по любой причине, нефатальный инсульт, инфаркт миокарда, развитие любой формы ИБС, ЧКВ по любой причине госпитализация по причине ССЗ.



Рисунок 3 – Общий дизайн исследования

### 2.3. Первый этап исследования

Первый этап начался с исследования и анализа изучаемой проблематики. Было выявлено, что одним из существенных аспектов проблемы преждевременной овариальной недостаточности, как среди пациентов, так и среди медицинских работников, является проблема отсутствия единого

клинически сформированного диагноза. Это потребовало унификации понятий. Таким образом, в группу пациентов с ПОН включались пациентки, имеющие следующие диагнозы: преждевременная овариальная недостаточность, преждевременная менопауза и преждевременная недостаточность яичников.

### **Формирование исследуемых групп**

Критериями включения в исследуемую группу были: подписанное информированное согласие, женский пол, возраст наступления менопаузы до 40 лет, наличие аменореи  $\geq 4$  месяцев, уровень ФСГ выше 40 МЕ/л, или уже выставленный ранее диагноз преждевременная овариальная недостаточность или различные его варианты.

Критериями исключения были: мужской пол, возраст старше 45 лет, отсутствие подписанного информированного согласия.

Все обследуемые пациенты были разделены на три группы: женщины с первичной ПОН, женщины со вторичной ПОН, контрольная группа, которая состояла из здоровых женщин.

Все группы были сопоставимы по полу, возрасту и ИМТ.

Рассчитанное предполагаемое число женщин с первичной преждевременной овариальной недостаточностью в Рязанской области составило 1212 человек, исходя из данных о возрастном-половом составе, а также численности населения Рязанской области, предоставляемыми в открытом доступе Рязаньстатом с одной стороны и, зная о частоте встречаемости первичной ПОН 1 % среди женщин в возрасте до 40 лет и 0,1 % среди женщин в возрасте до 30 лет [18,129].

При анализе медицинской документации было выявлено 133 женщины с первичной ПОН.

Для адекватной статистической оценки и сопоставимости данных в группах исследования, количество участников в каждой исследуемой группе было зафиксировано на уровне 133 человек.

Таким образом, в анализ были включены три исследуемые группы:

1. пациенты с первичной ПОН – 133 человека,
2. пациенты со вторичной ПОН – 133 человека,
3. контрольная группа, состоящая из здоровых женщин, сопоставимых по возрасту и ИМТ – 133 человека.

### **Сбор исследуемых параметров**

Данные о поле, возрасте пациентов, основном заболевании, осложнениях, сопутствующих нозологиях, дополнительных методах обследования, их результатах, назначенной терапии были получены из амбулаторных карт пациентов (форма №025/у-04), включая также и находящиеся в них медицинские документы (выписки из стационара, результаты и протоколы проведенных обследований, а также прочие медицинские документы). Имеющиеся в амбулаторных картах данные вносились в специально созданную в ходе работы «Карту больного с ПОН». После этого информация с бумажного носителя переносилась в электронную базу данных, а затем выгружалась в таблицы программы Microsoft Excel.

После этого пациенты были обследованы и анкетированы. Пациентам была разъяснена вся информация о ходе исследования в доступной и понятной форме, они также подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Согласно протоколу исследования, оценивались следующие параметры: возраст, менархе, менопауза, постменопаузальный период, приём заместительной гормональной терапии, статус курения, ИМТ, окружность талии, окружность бёдер, отношение окружности талии к окружности бёдер, образование, систолическое АД, диастолическое АД, пульс, общий холестерин, ЛПВП, ЛПНП, триглицериды, коэффициент атерогенности, глюкоза, а также анамнестические данные, данные были получены из соответствующей медицинской документации.

Артериальное давление, измерялось, ручным сфигмоманометром, по методу Короткова, в соответствии со следующими правилами измерения артериального давления (АД):

- АД измеряют после 5 минутного отдыха, за полчаса необходимо исключить прием пищи, кофеина (чай, кофе), курение (если пациент курит) и активные физические или эмоциональные нагрузки;
- Измерение производится в положении сидя, в удобной позе: рука расположена свободно на столе, с опорой на спинку стула, ноги расслаблены и не перекрещиваются (Рисунок 4).
- Во время измерения необходимо исключить разговор;
- Необходимо использовать одну из стандартных манжет соответствующего размера, при этом манжета должна охватывать не менее 80% окружности плеча пациента.
- Середина манжеты должна быть расположена на уровне сердца (приблизительно на уровне 4 межреберья), не следует накладывать манжету на ткань одежды, между манжетой и поверхностью плеча должно оставаться расстояние размером с палец, нижний ее край должен быть на 2 см выше локтевой ямки.
- При наличии асимметрии АД на руках (САД/ДАД >10/5 мм рт.ст.) – измерения производится на руке с более высокими цифрами АД, при отсутствии асимметрии – измерение следует проводить на нерабочей руке.
- Нагнетание воздуха в манжету должно быть быстрым, выпускание – медленным (2 мм рт.ст. в секунду).
- Следует выполнить не менее 2 измерений с интервалом 1-2 минуты и оценить среднее значение полученных измерений.
- Запись значений систолического и диастолического АД производится с точностью до 2 мм рт.ст.
- При подозрении на ортостатическую гипотензию необходимо измерять АД в положении стоя через 1 минуту и 5 минут.



Рисунок 4 – Положение тела при измерении артериального давления

Артериальное давление измерялось сфигмоманометром, расположенным на правой руке после периода отдыха в сидячем положении. Артериальное давление измерялось трижды с использованием среднего значения трёх измерений. Артериальная гипертензия определялась при наличии: систолического артериального давления  $\geq 140$  мм рт. ст. и (или) диастолического артериального давления  $\geq 90$  мм рт. ст. А также при наличии в анамнезе указаний на регулярный приём антигипертензивных препаратов.

Под аритмией понималось любое нарушение ритма сердца. Диагноз ИБС устанавливался на основании данных медицинской документации, где ИБС должна была быть верифицирована (визуализация атеросклеротических бляшек в коронарных артериях, наличие ишемии при проведении стресс-теста, инфаркт миокарда в анамнезе). Сахарный диабет определялся при наличии в анализах

уровня глюкозы натощак  $\geq 7,0$  ммоль / л или наличием в анамнезе данных о регулярном приёме сахароснижающих препаратов.

Согласно протоколу исследования, диагноз дислипидемия устанавливался при концентрации общего холестерина более 5,0 ммоль/л и уровне ЛПНП свыше 3,0 ммоль/л. Диагноз метаболический синдром (МС) ставился на основании последних рекомендаций национальной образовательной программы по холестерину (NCEP III). Согласно ему МС определяется при наличии  $\geq 3$  из следующих признаков: уровень глюкозы натощак  $\geq 6,1$  ммоль/л (110 мг/дл), холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП)  $< 1,3$  ммоль/л (50 мг/дл), триглицериды (ТГ)  $\geq 1,79$  ммоль/л (150 мг/дл), окружность талии  $\geq 88$  см, Артериальное давление (АД)  $> 130/85$  мм рт. ст. (Таблица 2).

Таблица 2 – Критерии диагностики метаболического синдрома

Метаболический синдром (Параметры оценки)	Шкала оценки (NCEP АТР III)
Глюкоза, ммоль/л (мг/дл)	$\geq 6,1$ (110)
Холестерин ЛПВП, ммоль/л (мг/дл)	$< 1,3$ (50)
Триглицериды, ммоль/л (мг/дл)	$\geq 1,79$ (150)
Ожирение	ОТ $\geq 88$
Артериальное давление, мм рт. ст.	$\geq 130/85$

Примечание: ОТ – Окружность талии.

### Оценка сердечно-сосудистого риска

Для оценки сердечно-сосудистого риска использовались шкалы оценки FRS, SCORE и SCORE 2. Шкалы FRS и SCORE 2, использовались для оценки 10-летнего риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, использование сразу двух шкал, обеспечивало большую объективность исследования, так как полученные данные можно было сопоставить между собой, что защищало исследование от возможных ошибок. Другой целью использования сразу двух шкал, было определить шкалу с наибольшей чувствительностью к ПОН, что в дальнейшем можно было бы использовать в реальной клинической практике. Шкала SCORE использовалась для расчёта 10-летнего риска развития смерти от

ССЗ, а также для получения статистических данных о её возможном использовании в реальной клинической практике у пациентов с ПОН.

Во всех трёх группах был оценен 10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, рассчитанный с использованием Фрамингемской шкалы оценки (FRS) и SCORE 2, а также, рассчитать риск развития смерти, от тех же заболеваний, по шкале SCORE, у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью, в сравнении со здоровыми женщинами.

В основе метода исследование лежит использование классических шкал оценки сердечно-сосудистого риска: FRS, SCORE и SCORE 2. Шкалы использовались в оригинальном виде и не подвергались авторским изменениям.

По Фрамингемской шкале оценки (FRS): Низкий риск определялся как 10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний менее 10%, промежуточный как риск развития сердечно-сосудистых заболеваний между 10–20% и высокий 10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний был отмечен как более 20%.

По шкале SCORE2: Риск менее 2,5% считается низким, в пределах от 2,5 до 7,5 % – умеренным, более 7,5% высоким.

По шкале SCORE: Риск менее 1% считается низким, в пределах от 1 до 5 % – умеренным, от 5 до 10 % – высоким, более 10 % – очень высоким.

Расчет рисков по различным шкалам проводился математически по формулам в соответствии с рекомендациями по использованию шкал SCORE, SCORE2 и FRS. При оценке риска по шкале SCORE2 и SCORE пациенты с ИБС и сахарным диабетом были исключены из расчета как лица, имеющие высокий риск. Данные группы без ССЗ были сопоставимы по полу и возрасту.

Все собранные данные, продолжали вноситься в «Карту больного, с диагнозом ПОН». После этого информация с бумажного носителя переносилась в электронную базу данных, а затем выгружалась в таблицы программы Microsoft Excel. Дизайн исследования на первом этапе представлен на рисунке ниже (Рисунок 5).





Рисунок 5 – Дизайн исследования на I этапе

## 2.4. Второй этап исследования

На втором этапе исследование продолжилось, в уже созданных ранее группах; численность групп и их состав изменению не подлежал.

Весь генетический анализ, проводился в центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Исследованию на наличие у них ассоциации с преждевременной овариальной недостаточностью (ПОН), подвергались следующие наиболее часто встречаемые генные полиморфизмы, ассоциированные с сердечно-сосудистыми заболеваниями: ген *AGT* полиморфизм (Met235Thr), ген *ITGA2* полиморфизм (C807T), ген *NOS3* полиморфизм (C786T), ген *FGB* полиморфизм (455G-A), ген *ITGB3* полиморфизм (Leu59Pro), ген *SERPINE (PAI) 1* полиморфизм (675 5G/4G), ген *IL6* полиморфизм (G(-572)C), ген *EDN1* полиморфизм (Lys198Asn) (Таблица 1). Данные полиморфизмы, были выбраны с одной стороны, на основании достаточно высокой частоты их встречаемости в европейской популяции, а с другой из-за наличия доказанной у них ассоциации с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Частоты генотипов Met235Thr и Leu59Pro у исследуемых с первичной ПОН отклонялись от равновесия Харди-Вайнберга, частота остальных генных полиморфизмов соответствовала популяционному равновесию.

Все группы были сравнимы между собой, так как исследование на генные полиморфизмы не предполагало дополнительных критериев исключения все 399 ранее отобранных пациентов прошли данное исследование в несколько этапов.

Биологическим материалом исследования служила: венозная кровь в объеме не менее 1 мл собранная в одноразовую пластиковую пробирку с раствором антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта). Материал доставлялся в лабораторию течение 2-х часов, допускалось хранение при +2...+8°C не более 4-5 часов.

Методом исследования служила, полимеразная цепная реакция (ПЦР) в настоящее время широко используемая в исследовательских и клинических

научных работах во всём мире. В основе метода ПЦР лежит процесс многократного увеличения копий (амплификации) определенных участков ДНК, осуществляемый с помощью фермента ДНК-полимеразы.

Форма детекции ЭФ – детекция продуктов ПЦР электрофоретическим методом в агарозном геле. Наборы реагентов для определения полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР с электрофоретической схемой детекции результата "SNP-ЭКСПРЕСС". Принцип метода: анализу подвергается геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь», с образцом выделенной ДНК параллельно проводятся две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров, детекция амплифицированного фрагмента ДНК проводится электрофоретическим методом в агарозном геле; результаты анализа позволяют дать три типа заключений: гомозигота по аллели 1; гетерозигота; гомозигота по аллели 2.

Анализу подвергается геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь».

Аллель 1 указан до обозначения позиции полиморфизма (замены/делеции/инсерции).

Аллель 2 указан после обозначения позиции полиморфизма (замены/делеции/инсерции).

Схематическая визуализация процесса, представлена ниже (Таблица 3).

Таблица 3 – Примерная схема использования

Генотип Ляйден (коагуляционный фактор V) F5 Arg506 Gln	Алель 1 Arg	Алель 2 Gln
Мутация 1 BRCA1 185delAG	Алель 1 insAG	Алель 2 delAG

### Проведение амплификации

1. Приготовить и пронумеровать пробирки для проведения амплификации

вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) в соответствии с количеством анализируемых проб с учётом положительных (при наличии) и отрицательных контролей. Для каждой пробы готовятся 2 пробирки: Аллель 1 и Аллель 2.

2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для ПЦР из морозильника, разморозить содержимое. Пробирки с реакционной смесью и полностью размороженным раствором разбавителя тщательно перемешать. Перемешивание разбавителя происходит при переворачивании пробирки (пузырём воздуха). Перемешивание реакционной смеси проводят вортиксированием.

3. Из компонентов комплекта приготовить амплификационной смеси реагентов из расчёта на 1 пробу:

- 17,5 мкл разбавителя,
- 2,5 мкл реакционной смеси,
- 0,2 мкл Таq-полимеразы (вносится в последнюю очередь, перед внесением смесь рекомендуется перемешать).

Готовятся 2 амплификационной смеси: с реакционной смесью Аллель 1 и с реакционной смесью Аллель 2.

При приготовлении рабочей амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами (фильтрами). Такие же наконечники необходимо использовать и для внесения в пробирку препарата ДНК.

4. После добавления Таq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь вортиксированием.

5. Добавить по 20 мкл соответствующей рабочей амплификационной смеси во все соответствующие пробирки, подготовленные для амплификации.

6. Добавить во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.

7. Внести по 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы в пробирку с амплификационной смесью Аллель 1 и в пробирку с амплификационной смесью Аллель 2 под слой масла. В качестве отрицательного контрольного образца вносится разбавитель в объёме 5 мкл в оба типа

реакционной смеси.

8. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1500-3000 об/мин при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе.

9. Перенести пробирки в прогретый до температуры +94 °С (установившаяся температура в режиме пауза) программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию.

В нашем исследовании, в отличие от стандартной (Таблица 4), мы использовали, модифицированную программу амплификации (Таблица 5).

Таблица 4 – Стандартная программа амплификации

Т, °С	Время	Циклы
94°С	Pause	-
93°С	1 мин	1
93°С	10 сек	35
64°С	10 сек	
72°С	20 сек	
72°С	1 мин	1
10°С	Storage	-

Таблица 5 – Используемая в исследовании программа амплификации

Т, °С	Время	Циклы
94°С	Pause	-
93°С	1 мин	1
93°С	10 сек	40
64°С	10 сек	
72°С	20 сек	40
72°С	1 мин	1
10°С	Storage	-

Примечание: Использовался амплификатор типа «Терцик» алгоритм регулирования «точный», объём реакционной смеси 40 мкл.

Инициация – необходима в случае, если активация ДНК-полимеразы происходит с помощью нагревания при высоких температурах, реакционную смесь выдерживают при 93-96°C в течение нескольких минут.

Этап 1. Денатурация – реакционную смесь нагревают при 93-95°C в течение 30-40 сек., происходит расплетение двойной спирали ДНК с образованием одноцепочечных молекул.

Этап 2. Отжиг праймеров – происходит комплементарное связывание праймеров с ДНКматрицей, температура отжига специфична для каждой пары праймеров и ее значения располагаются в интервале 50-65° С, реакция протекает в течение 10-40 сек.

Этап 3. Элонгация цепи – происходит синтез новых цепей ДНК Taq-полимеразой путем удлинения праймеров в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Как правило, реакция протекает при 68-72°C, время проведения элонгации зависит от размера амплифицируемого фрагмента. Образовавшиеся в ходе первого цикла амплификации новые молекулы ДНК служат матрицей для второго цикла репликации ДНК, таким образом, происходит экспоненциальное накопление целевых фрагментов ДНК (ампликонов) в реакционной смеси. За 30-40 циклов амплификации в растворе накапливается около 10<sup>8</sup> молекул ампликона. Такого количества достаточно для визуального обнаружения ПЦР-продукта методом электрофореза в агарозном геле.

### **Стадии проведения ПЦР-анализа**

Проведение анализа с использованием метода ПЦР включает три основных этапа:

1. Выделение генетического материала из клинического образца. На данном этапе клинический образец подвергается специальной обработке, выбранная методика выделения нуклеиновых кислот зависит от характера анализируемого материала. Для проведения амплификации необходима ДНК (РНК), свободная от

клеточных фракций и посторонних примесей, которые могут ингибировать реакцию ПЦР.

2. Амплификация специфического фрагмента ДНК. На данном этапе происходит накопление целевых фрагментов ДНК, процесс амплификации проводят в специальных программируемых термостатах, автоматически меняющих температуру реакционной смеси по заданной программе. Скорость «наработки» фрагмента зависит от эффективности ПЦР, при максимальной эффективности достаточно 38-40 циклов для получения 25-50 нг/мкл ампликонов из одной исходной молекулы ДНК.

3. Детекция продуктов амплификации. Можно выделить два основных метода детекции продуктов амплификации: детекция в агарозном геле и флуоресцентная схема детекции. В первом случае происходит электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов в агарозном геле согласно размеру фрагментов ДНК. Более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. Визуализация ампликонов в геле проводится путем добавления к ним интеркалирующего агента – бромистого этидия, который встраивается в двуцепочечные цепи ДНК и флуоресцирует в оранжево-красном диапазоне видимого спектра при УФ-облучении. В зависимости от количества конечного продукта яркость свечения полос может быть различной, но дать количественную оценку ДНК-копий с помощью этого метода невозможно.

### **Детекция продуктов амплификации**

Разделение продуктов амплификации проводится в агарозном геле, приготовленном на TAE буфере, методом горизонтального электрофореза. Для визуализации результатов электрофореза в качестве красителя вносится 1% раствор бромистого этидия из расчёта 5 мкл на 50 мл расплавленного геля.

Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос под УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

## Интерпретация результатов

При интерпретации результатов важно помнить о невозможности появления в данных анализах слабopоложительных проб (Таблица 6). Все полосы на электрофорезе должны быть чёткими и примерно одинаковой интенсивности (допускаются небольшие различия в яркости как между тестами на норму и мутацию, так и от пробы к пробе).

Таблица 6 – Интерпретация результата

Амплификационная смесь Аллель 1	Амплификационная смесь Аллель 2	Интерпретация результата
+	-	Гомозигота по Аллелю 1
+	+	Гетерозигота
-	+	Гомозигота по Аллелю 2

Использование реагента «ДНК-экспресс-кровь» является принципиальным для получения корректных результатов анализа.

Полученные результаты мы также вносили в специально созданную «Карту больного, с диагнозом ПОН». После этого информация с бумажного носителя переносилась в электронную базу данных, а затем выгружалась в таблицы программы Microsoft Excel. Дизайн исследования на втором этапе представлен на рисунке ниже (Рисунок 6).



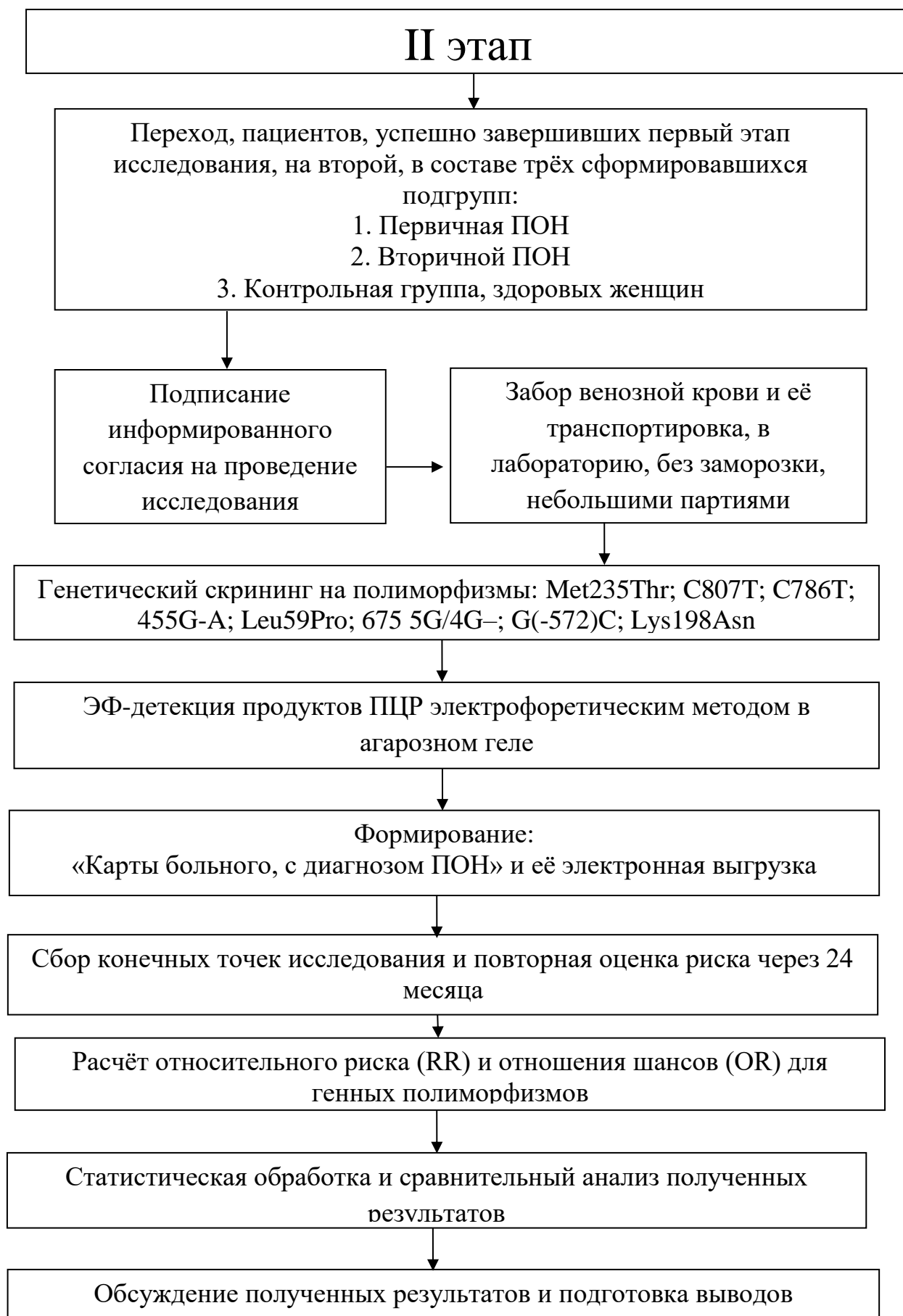


Рисунок 6 – Дизайн исследования на II этапе

## 2.5. Этические аспекты исследования

Клиническое исследование проведено в соответствии с этическими принципами соответствует действующим законодательным нормам РФ: приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. №200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики», национальный стандарт Российской Федерации, Федеральный закон от 21.11.2011 №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» и другим действующим актам.

Проводимое клиническое исследование, соответствует: «Хельсинской декларации всемирной медицинской ассоциации – этические принципы для медицинских исследований на людях» в её последней редакции, от октября 2013 г.

Исследование проводилось в соответствии со стандартами «Надлежащей клинической практики», «Надлежащей эпидемиологической практики», «Надлежащей практики регистров пациентов» [24, 82, 88].

Соблюдение, этических норм и прав человека, до подписания им информированного согласия, осуществлялось на основании современных регламентирующих документов [11, 12, 19].

Во время исследования проводились: сбор анамнеза и расспрос пациента, анкетирование отобранных пациентов, их физикальное и лабораторно-инструментальное обследование, а также забор биологического материала.

Перед проведением, всех этапов исследования проводилась информационно-разъяснительная работа, в доступной и понятной для пациента форме, а затем им предлагалось подписать, информированное согласие.

Форма информированного согласия была одобрена Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России протокол №2 от 08.10.2019.

## 2.6. Методы статистической обработки

Вся информация по включённым в исследование пациентам в обезличенном виде вносилась в электронную базу данных Excel 2010 (Microsoft Corporation, США). С помощью программного обеспечения данного приложения проведён математический анализ и визуализация результатов исследования.

Статистический анализ проводился с помощью программы Statistica 13.0. (StatSoft Inc., США). Для оценки соответствия количественных параметров закону нормального распределения применялся критерий Шапиро-Уилка. Далее величины с нормальным распределением представлены в виде среднего значения ( $M$ ) и среднеквадратическое отклонением ( $\sigma$ ), с отличным от нормального распределением – в виде медианы ( $Me$ ) и интерквартильного размаха ( $Q1;Q3$ ), где  $Q1$  – нижний квартиль (25%),  $Q3$  – верхний квартиль (75%). Частота встречаемости признаков представлена в виде абсолютных ( $n$ ) и относительных (%) значений.

Определение статистической значимости различий между средними величинами двух независимых групп проводилось с использованием критерия Стьюдента – для величин с нормальным распределением, критерия Манна-Уитни – для величин с отличным от нормального распределением. Для сравнения групп по качественным признакам применялся критерий Пирсона ( $\chi^2$ ) с поправкой на непрерывность по Йетсу, в случае если в одной из ячеек таблицы сопряжённости значение было менее 5 – двусторонний критерий Фишера.

С целью определения предикторов неблагоприятного исхода применялся метод регрессионного анализа в моделях Кокса, результаты представлены в виде отношения шансов («ОШ»/«OR») и относительного риска (RR) и 95% доверительного интервала (95% ДИ).

Во всех случаях статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Сбор и оценка клинических данных у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью и контрольной группы

В рамках исследования был проведён сравнительный анализ, сердечно-сосудистых параметров, у пациентов в трёх исследуемых группах (Таблица 7):

Таблица 7 – Сбор и оценка клинических данных в изучаемых группах

Исследуемый параметр	Группа №1 Первичная ПОН (n=133)	Группа №2 Вторичная ПОН (n=133)	Группа №3 Контрольная (n=133)	Значимость (p1/p2)*
<b>Общие сведения:</b>				
Возраст (лет)	39,8 (±4,3)	40,1 (±4,1)	40,3 (±3,9)	p1>0,05 p2>0,05
Менархе (лет)	12,6 (±1,5)	12,9 (±1,6)	13,1 (±1,7)	p1>0,05 p2>0,05
Менопауза n (%)	133 (100%)	133 (100%)	0 (0%)	–
Постменопаузальный период (лет)	5,7 (±3,2)	5,4 (±3,1)	0	–
Приём заместительной гормональной терапии n (%)	36 (27%)	109 (82%)	0 (0%)	–
Статус курения n (%)	34 (26%)	36 (27%)	40 (30%)	p1>0,05 p2>0,05
<b>Антропометрические данные:</b>				
ИМТ (кг/м <sup>2</sup> )	24,5 (21,3-28,1)	23,9 (21,1-25,9)	24,3 (21,7-27,8)	p1>0,05 p2>0,05
Окружность талии (см)	92,0 (87,3-100,1)	86,7 (83,1-94,7)	80,7 (75,1-86,8)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Окружность бёдер (см)	104,0 (97,8-109,0)	102,3 (98,0-108,4)	100,1 (96,3-104,4)	<b>p1&gt;0,05</b> <b>p2&gt;0,05</b>
Отношение окружности талии к окружности бёдер	0,88 (0,89-0,92)	0,85 (0,85-0,87)	0,80 (0,78-0,83)	<b>p1&gt;0,05</b> <b>p2&gt;0,05</b>

<b>Образование:</b>				
Среднее	33 (25%)	20 (15%)	13 (10%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Средне-специальное	56 (42%)	53 (40%)	51 (38%)	p1>0,05 p2>0,05
Высшее	44 (33%)	60 (45%)	69 (52%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
<b>Сердечно-сосудистые показатели:</b>				
Систолическое АД (мм.рт.ст.)	142 (132-156)	135 (128-149)	123 (110-142)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Диастолическое АД (мм.рт.ст.)	90 (87-97)	87 (81-94)	79 (76-90)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Частота сердечных сокращений (уд. в мин.)	87 (72-94)	79 (70-90)	73 (69-84)	<b>p1&lt;0,05</b> p2>0,05
Общий холестерин (ммоль/л)	7,0 (6,3 - 7,5)	6,7 (6,1 - 7,3)	5,4 (4,9 - 6,1)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
ЛПВП (ммоль/л)	1,1 (0,7 - 1,4)	1,4 (0,9 - 1,6)	1,7 (1,2 - 1,9)	<b>p1&lt;0,05</b> p2>0,05
ЛПНП (ммоль/л)	4,6 (3,9 - 5,2)	4,0 (3,5 - 4,6)	3,2 (2,7 - 3,8)	<b>p1&lt;0,05</b> p2>0,05
Триглицериды (ммоль/л)	2,1 (1,7 - 2,6)	1,7 (1,4 - 2,2)	1,3 (0,9 - 1,6)	<b>p1&lt;0,05</b> p2>0,05
Индекс атерогенности	5,4 (4,4-8,0)	3,8 (3,6-5,8)	2,2 (2,2-2,8)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Глюкоза (ммоль/л)	6,1 ( $\pm$ 0,9)	5,4 ( $\pm$ 1,6)	4,9 ( $\pm$ 0,5)	<b>p1&lt;0,05</b> p2>0,05
<b>Сердечно-сосудистый анамнез:</b>				
Артериальная гипертензия n (%)	110 (83%)	89 (67%)	28 (21%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Аритмия n (%)	67 (50%)	38 (29%)	16 (12%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
ИБС n (%)	41 (31%)	18 (14%)	3 (2%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Сахарный диабет n (%)	19 (14%)	8 (6%)	2 (2%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Метаболический синдром n (%)	106 (80%)	64 (48%)	4 (3%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Регулярный приём антигипертензивных препаратов n (%)	69 (63%)	53 (60%)	7 (25%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>

Продолжение таблицы 7

Регулярный приём гиполипидемических препаратов n (%)	52 (49%)	20 (31%)	1 (25%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
--	----------	----------	---------	--

Примечание: данные представлены в виде среднее ( $\pm$  среднеквадратическое отклонение) или среднее (95% доверительный интервал)

ИМТ – индекса массы тела

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ИБС – ишемическая болезнь сердца

p1 – значимость между группой №1 и №3

p2 – значимость между группой №2 и №3

Пациенты были сравнимы по полу, возрасту, статусу курения, и ИМТ. Между собой группы ПОН также не различались по средней длительности постменопаузального периода.

Наиболее существенные отклонения от показателей здоровых женщин были выявлены у пациенток с первичной ПОН: они обладали увеличенной в среднем на 11.3 см окружностью талии; на 19 мм рт. ст. более высокими цифрами систолического артериального давления и на 11 мм рт. ст. более высокими цифрами диастолического артериального давления; в среднем на 13 уд. в мин. более высокой частотой сердечных сокращений; в среднем на 3,2 ед. более высоким индексом атерогенности, что также отражалось в показателях липидного обмена, общий холестерин был в среднем на 1.6 ммоль/л выше, ЛПНП были выше на 1.4 ммоль/л, триглицериды были выше на 0.8 ммоль/л, а вот ЛПВП наоборот были ниже на 0.6 ммоль/л; также пациенты с первичной ПОН обладали в среднем на 1.2 ммоль/л более высоким уровнем глюкозы крови натощак.

Однако, также стоит отметить различие в анализируемых сердечно-сосудистых параметрах в группах пациентов с первичной и вторичной ПОН. Пациенты с первичной ПОН, в их сравнении с пациентами со вторичной, обладали более высокими рисками развития сердечно-сосудистых, а именно: они

обладали увеличенной в среднем на 5,3 см окружностью талией; в среднем обладали на 7 мм рт. ст. более высокими цифрами систолического артериального давления и на 3 мм рт. ст. более высокими цифрами диастолического артериального давления; они обладали в среднем на 8 уд. в мин. более высокой частотой сердечных сокращений; они обладали в среднем на 1,6 ед. более высоким индексом атерогенности, что также отражалось в показателях липидного обмена, общий холестерин был в среднем на 0,3 ммоль/л выше, ЛПНП были выше на 0,6 ммоль/л, триглицериды были выше на 0,4 ммоль/л, а вот ЛПВП наоборот были ниже на 0,3 ммоль/л; также пациенты с первичной ПОН обладали в среднем на 0,7 ммоль/л более высоким уровнем глюкозы крови натощак. Всё это показывает наличие более высокого сердечно-сосудистого риска у пациентов именно с первичной ПОН, за счёт в первую очередь смещения именно в количественном выражении факторов риска.

В итоге, более неблагоприятный сердечно-сосудистый профиль наблюдался у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью, в сравнении со здоровыми женщинами, сопоставимыми по возрасту и ИМТ. Результаты исследования также показывают, что изучаемые сердечно-сосудистые параметры различались в группах пациентов с первичной и вторичной ПОН, при этом, наибольшее отклонение, показывали именно пациенты с первичной, а не вторичной ПОН.

### **Расчёт относительного риска (RR) и отношения шансов (OR) сердечно-сосудистых параметров**

Был рассчитан относительный риск (RR) и отношение шансов (OR) в исследуемых группах, при их сравнении с контрольной группой, состоящей из здоровых женщин, сопоставимых по возрасту и ИМТ.

1. Сравнение группы №1 пациенты с первичной ПОН и контрольной группой: увеличение окружности талии (норма до 80 см) RR=2 (95%; ДИ 1,78-2,23), OR=111 (95%; ДИ 110,82-111,18); повышения систолического

артериального давления (САД  $\leq$  139 мм рт. ст.) RR=12 (95%; ДИ 11,79-12,22), OR=28 (95%; ДИ 27,89-12,14); повышение диастолического артериального давления (ДАД  $\leq$  89 мм рт. ст.) RR=30 (95%; ДИ 29,76-30,25), OR=70 (95%; ДИ 69,83-70,24); дислипидемия (ОХС>5 ммоль/л, ЛПНП>3 ммоль/л) RR=1.4 (95%; ДИ 1,07-1,82), OR=57 (95%; ДИ 56,68-57,32); артериальная гипертензия RR=3.9 (95%; ДИ 3,59-4,22), OR=18 (95%; ДИ 17,84-57,17); аритмия RR=4.2 (95%; ДИ 3,89-4,34), OR=7 (95%; ДИ 6,84-7,23); ИБС RR=13.7 (95%; ДИ 13,42-14,01), OR=19 (95%; ДИ 18,78-19,25); сахарный диабет RR=6.3 (95%; ДИ 6,02-5,58), OR=11 (95%; ДИ 10,69-11,32); метаболический синдром RR=26.6 (95%; ДИ 26,33-26,86), OR=127 (95%; ДИ 126,84-127,19) (Таблица 8).

Таблица 8 – Сравнение первичной ПОН и контрольной группы

<b>Исследуемый параметр</b>	<b>Относительный риск (RR)</b>	<b>Доверительный интервал (ДИ 95%)</b>	<b>Отношения шансов (OR)</b>	<b>Доверительный интервал (ДИ 95%)</b>
Увеличение окружности талии	2	1,78-2,23	111	110,82-111,18
Повышения систолического артериального давления более 140 мм рт. ст.	12	11,79-12,22	28	27,89-12,14
Повышение диастолического артериального давления более 90 мм рт. ст.	30	29,76-30,25	70	69,83-70,24
Дислипидемия	1.4	1,07-1,82	57	56,68-57,32
Артериальная гипертензия	3.9	3,59-4,22	18	17,84-57,17
Аритмия	4.2	3,89-4,34	7	6,84-7,23
ИБС	13.7	13,42-14,01	19	18,78-19,25
Сахарный диабет	6.3	6,02-5,58	11	10,69-11,32
Метаболический синдром	26.6	26,33-26,86	127	126,84-127,19



Наиболее существенные отклонения от показателей здоровых женщин были выявлены у пациенток с первичной ПОН: они обладали в два раза более высоким относительным риском развития ожирения, измеренным по окружности талии, чем у женщин без данной патологии; относительный риск повышения САД более 140 мм рт. ст. у них был в 12 раз выше; относительный риск развития повышение диастолического артериального давления более 90 мм рт. ст. у них был в 30 раз выше; относительный риск развития дислипидемии у них был в 1,4 раза выше; относительный риск развития артериальной гипертензии у них был в 3,9 раза выше; относительный риск развития аритмии у них был в 4,2 раза выше; относительный риск развития ИБС у них был в 13,7 раза выше; относительный риск развития сахарного диабета у них был в 6,3 раза выше; а относительный риск развития метаболического синдрома у них был в 26,6 раза выше чем у женщин без данной патологии.

2. Сравнение группы №2 пациенты со вторичной (индуцированной) ПОН и контрольной группой: увеличение окружности талии (норма до 80 см) RR=2 (95%; ДИ 1,82-2,19), OR=111 (95%; ДИ 110,78-111,24); повышения систолического артериального давления (САД  $\leq$  139 мм рт. ст.) RR=8 (95%; ДИ 7,83-8,21), OR=13 (95%; ДИ 12,76-13,31); повышение диастолического артериального давления (ДАД  $\leq$  89 мм рт. ст.) RR=15 (95%; ДИ 14,70-15,38), OR=20 (95%; ДИ 19,81-20,21); дислипидемия (ОХС>5 ммоль/л, ЛПНП>3 ммоль/л) RR=1.4 (95%; ДИ 1,05-1,81), OR=57 (95%; ДИ 56,73-57,33); артериальная гипертензия RR=3.1 (95%; ДИ 2,89-3,36), OR=8 (95%; ДИ 7,76-8,31); аритмия RR=2.4 (95%; ДИ 2,12-2,78), OR=3 (95%; ДИ 2,75-3,31); ИБС RR=6 (95%; ДИ 5,82-6,21), OR=7 (95%; ДИ 6,79-7,28); сахарный диабет RR=2.7 (95%; ДИ 2,42-2,99), OR=4 (95%; ДИ 3,76-4,34); метаболический синдром RR=16 (95%; ДИ 15,84-16,22), OR=30 (95%; ДИ 29,87-20,19) (Таблица 9).

Таблица 9 – Сравнение вторичной ПОН и контрольной группы

<b>Исследуемый параметр</b>	<b>Относительный риск (RR)</b>	<b>Доверительный интервал (ДИ 95%)</b>	<b>Отношения шансов (OR)</b>	<b>Доверительный интервал (ДИ 95%)</b>
Увеличение окружности талии	2	1,82-2,19	111	110,78-111,24
Повышения систолического артериального давления более 140 мм рт. ст.	8	7,83-8,21	13	12,76-13,31
Повышение диастолического артериального давления более 90 мм рт. ст.	15	14,70-15,38	20	19,81-20,21
Дислипидемия	1.4	1,05-1,81	57	56,73-57,33
Артериальная гипертензия	3.1	2,89-3,36	8	7,76-8,31
Аритмия	2.4	2,12-2,78	3	2,75-3,31
ИБС	6	5,82-6,21	7	6,79-7,28
Сахарный диабет	2.7	2,42-2,99	4	3,76-4,34
Метаболический синдром	16	15,84-16,22	30	29,87-30,19

Пациентки со вторичной ПОН, также обладали более высоким относительным риском сердечно-сосудистых заболеваний, хотя и уступали по этому параметру пациентам с первичной ПОН. Пациентки со вторичной ПОН: обладали в два раза более высоким относительным риском развития ожирения, измеренным по окружности талии, чем у женщин без данной патологии; относительный риск повышения САД более 140 мм рт. ст. у них был в 8 раз выше; относительный риск развития повышение диастолического артериального давления более 90 мм рт. ст. у них был в 15 раз выше; относительный риск развития дислипидемии у них был в 1,4 раза выше; относительный риск развития артериальной гипертензии – в 3,1 раза выше; относительный риск развития

аритмии – в 2,4 раза выше; относительный риск развития ИБС – в 6 раз выше; относительный риск развития сахарного диабета – в 2,7 раза выше; а относительный риск развития метаболического синдрома – в 16 раз выше, чем у женщин без данной патологии. В результате проведённого исследования, более неблагоприятный профиль сердечно-сосудистых факторов риска, наблюдается у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью. Более того, результаты исследования показали, что изучаемые параметры существенно различались в группах пациентов с первичной и вторичной преждевременной овариальной недостаточностью.

Полученные данные продемонстрировали значительно более высокие вероятности наличия у пациентов с первичной ПОН следующих состояний: развития повышения диастолического артериального давления более 90 мм рт. ст. – в 30 раз, метаболический синдром – в 26,6 раза, ИБС – в 13,7 раза, повышения систолического артериального давления более 140 мм рт. ст. – в 12 раз и сахарного диабета – в 6,3 раза. Полученные ассоциации между исследуемыми показателями и ПОН, вероятнее всего связаны со снижением концентрации эстрогенов в крови и как следствие этого, падением их протективных свойств в отношении сердечно-сосудистых заболеваний.

### **3.2. Оценка сердечно-сосудистых исходов у женщин с преждевременной овариальной недостаточностью**

Во всех трёх группах был оценен 10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, рассчитанный с использованием Фрамингемской шкалы оценки (FRS) и SCORE 2. Также рассчитывался риск развития фатальных осложнений по шкале SCORE. В основе метода исследования лежит использование классических шкал оценки сердечно-сосудистого риска: FRS, SCORE и SCORE 2. Шкалы использовались в оригинальном виде и не подвергались авторским изменениям. Риск рассчитывался математически по опубликованным ранее формулам. При оценке риска по шкале SCORE2 и SCORE

пациенты с ИБС и сахарным диабетом были исключены из расчета как лица, имеющие высокий риск. Группы были сопоставимы по полу и возрасту. Пациенты исследуемых групп были сравнимы по полу, возрасту, ИМТ, времени наступления менархе и статусу курения. 10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, с использованием Фрамингемской шкалы оценки (FRS) и SCORE2, а также, риск развития смерти, от тех же заболеваний, в течение ближайших 10 лет, по шкале SCORE: был рассчитан для исследуемых групп (Таблица 10).

Таблица 10 – Расчёт сердечно-сосудистого риска в начале исследования

Сердечно сосудистый риск	Группа №1 Первичная ПОН (n=73)	Группа №2 Вторичная ПОН (n=107)	Группа №3 Контрольная (n=128)	Значимость (P1/P2)*
10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, с использованием Фрамингемской шкалы оценки (FRS)	15,1% (4–25,5%)	13,3% (3,5–25,5%)	7,2% (3–22,4%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, с использованием шкалы SCORE 2	9,4% (6–14%)	7,6% (4–14%)	5,1% (3–14%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Риск развития смерти, от сердечно-сосудистых заболеваний, в течение ближайших 10 лет, по шкале SCORE	<1%	<1%	<1%	p1>0,05 p2>0,05

Примечание: p1 – значимость между группой №1 и №3

p2 – значимость между группой №2 и №3

10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, оцененный с использованием Фрамингемской шкалы оценки (FRS) статистически значимо был

повышен у женщин больных ПОН по сравнению с контрольной группой, состоящей из здоровых женщин. У женщин с первичной ПОН он составил в среднем 15,1% (4–25,5%) ( $p < 0,05$ ), что соответствует умеренному 10-летнему риску развития сердечно-сосудистых заболеваний. У женщин со вторичной ПОН он составил в среднем 13,3% (3,5–25,5%) ( $p < 0,05$ ), что также соответствует умеренному 10-летнему риску развития сердечно-сосудистых заболеваний. В свою очередь в контрольной группе он составил 7,2% (3–22,4%) ( $p < 0,05$ ), что соответствует низкому 10-летнему риску развития сердечно-сосудистых заболеваний. 10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, оцененный с использованием шкалы SCORE2 статистически значимо также был повышен у женщин больных ПОН в сравнении с контрольной группой. У женщин с первичной ПОН он составил в среднем 9,4% (6–14%) ( $p < 0,05$ ), что соответствует высокому 10-летнему риску развития сердечно-сосудистых заболеваний. У женщин со вторичной ПОН он составил в среднем 7,6% (4–14%) ( $p < 0,05$ ), что также соответствует высокому 10-летнему риску развития сердечно-сосудистых заболеваний. В свою очередь в контрольной группе он составил 5,1% (3–14%) ( $p < 0,05$ ), что соответствует умеренному 10-летнему риску развития сердечно-сосудистых заболеваний. Риск же развития смерти, от сердечно-сосудистых заболеваний, в течение ближайших 10 лет, рассчитанный по шкале SCORE, статистически значимо не различался, у женщин страдающих ПОН и здоровых женщин из контрольной группы, и соответствовал низкому риску, менее 1%.

Таким образом, у пациентов с первичной и вторичной ПОН не только значимо чаще встречалась ИБС и сахарный диабет (45% и 20% соответственно), но и были повышены сердечно-сосудистые риски по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Оценка конечных точек

Медиана наблюдений составила 963 (721;1217) дней, цифры в скобках означают минимальное и максимальное время наблюдений в нашей выборке.

Конечные точки оценивались как для пациентов с первичной, так и со вторичной ПОН, все обследуемые пациенты прошли второй срез. Конечными точками считались – смерть по любой причине, нефатальный инсульт, инфаркт миокарда, ИБС, госпитализация по причине ССЗ. По результатам текущего наблюдения, как в группе пациентов с первичной ПОН, так и в группе пациентов со вторичной ПОН выявить конечные точки не удалось. Уровень факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний существенно не изменился, рассчитанный ранее риск, также существенно не поменялся (Таблица 11).

Таблица 11 – Расчёт сердечно-сосудистого риска для оценки конечных точек

Сердечно сосудистый риск	Группа №1 Первичная ПОН (n=73)	Группа №2 Вторичная ПОН (n=107)	Группа №3 Контрольная (n=128)	Значимость (P1/P2)*
10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, с использованием Фрамингемской шкалы оценки (FRS)	15,4% (4,0–25,5%)	13,5% (3,5–25,5%)	7,3% (3–22,4%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, с использованием шкалы SCORE 2	9,6% (6–14%)	7,8% (4–14%)	5,2% (3–14%)	<b>p1&lt;0,05</b> <b>p2&lt;0,05</b>
Риск развития смерти, от сердечно-сосудистых заболеваний, в течение ближайших 10 лет, по шкале SCORE	<1%	<1%	<1%	p1>0,05 p2>0,05

Примечание: p1 – значимость между группой №1 и №3

p2 – значимость между группой №2 и №3

Как видно из таблицы выше, как пациенты с первичной ПОН, так и со вторичной ПОН, не обладали существенно более высоким сердечно-сосудистым риском, во время второго контрольного среза. Это в целом соотносится с ранее полученными нами, данными о том, что риск развития смерти, рассчитанный по шкале SCORE, статистически значимо не различается в исследуемых группах, и соответствует низкому риску, менее 1%. Повторная оценка рисков по шкалам продемонстрировала, что кардиоваскулярные риски пациентов в рамках длительного наблюдения не изменились.

Также следует отметить, что при повторной клинической оценке пациентов с ПОН и контрольной группы частота ИБС и сахарного диабета в группах оставалась прежней (45% и 20% в группах первичной и вторичной ПОН соответственно).

Таким образом, хотя у женщин с ПОН и повышен риск развития сердечно-сосудистых событий, но отсутствуют выраженные факторы риска и ССЗ, которые существенно влияют на прогноз, что привело к отсутствию изменений в прогнозе у пациентов.

#### **3.4. Исследование генных полиморфизмов у женщин с преждевременной овариальной недостаточностью**

Согласно протоколу и дизайну исследования, мы, с целью попытаться объяснить обнаруженное на предыдущем этапе отличие, решили провести генетическое исследование обследуемых групп пациентов на наличие у них наиболее типичных генных полиморфизмов, ассоциированных с сердечно-сосудистой патологией.

С целью выявления наличия ассоциации, между преждевременной овариальной недостаточностью и распространенными, среди белых европейцев, генетическими полиморфизмами, что позволило бы нам лучше понять, встречаемую клиническую картину заболевания и разработать новые современные алгоритмы диагностики этого заболевания.

Анализу на наличие в них полиморфизмов подвергались следующие гены: ген *AGT* полиморфизм (Met235Thr), ген *ITGA2* полиморфизм (C807T), ген *NOS3* полиморфизм (C786T), ген *FGB* полиморфизм (455G-A), ген *ITGB3* полиморфизм (Leu59Pro), ген *SERPINE (PAI) 1* полиморфизм (675 5G/4G), ген *IL6* полиморфизм (G(-572)C), ген *EDN1* полиморфизм (Lys198Asn). Пациенты исследуемых групп были сравнимы по полу, возрасту, ИМТ, времени наступления менархе и статусу курения.

Полученные результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Сравнительная характеристика генных полиморфизмов в исследуемых группах

Ген	AGT	ITGA2	NOS3	FGB	ITGB3	SERPINE (PAI) 1	IL6	EDN1
<b>Полиморфизм</b>	Met235 Thr	C807T	C786T	455G-A	Leu 59Pro	675 5G/4G	G (-572)C	Lys198 Asn
<b>Группа №1 первичная ПОН (n=133)</b>	110 (83%)	96 (72%)	92 (69%)	65(49%)	63(47%)	120 (90%)	26 (27%)	105 (79%)
<b>Группа №2 Вторичная ПОН (n=133)</b>	55 (41%)	53 (40%)	47 (35%)	28 (21%)	20 (15%)	76 (57%)	11 (8%)	31 (23%)
<b>Группа №3 Контрольная (n=133)</b>	51 (38%)	49 (37%)	44 (33%)	24 (18%)	17 (13%)	69 (52%)	7 (5%)	28 (21%)
<b>Значимость (P1/P2)*</b>	<b>P1&lt;0,05 P2&gt;0,05</b>	<b>P1&lt;0,05 P2&gt;0,05</b>	<b>P1&lt;0,05 P2&gt;0,05</b>	<b>P1&lt;0,05 P2&gt;0,05</b>	<b>P1&lt;0,05 P2&gt;0,05</b>	<b>P1&lt;0,05 P2&gt;0,05</b>	<b>P1&lt;0,05 P2&gt;0,05</b>	<b>P1&lt;0,05 P2&gt;0,05</b>

Примечание: P1 – значимость между группой №1 и №3

P2 – значимость между группой №2 и №3

Выявлено существенное различие в генных полиморфизмах между первичной ПОН и контрольной группой: Met235Thr – 110 (83%) против 51 (38%); C807T – 96 (72%) против 49 (37%); C786T – 92 (69%) против 44 (33%); 455G-A – 65



(49%) против 24 (18%); Leu59Pro– 63 (47%) против 17 (13%); 675 5G/4G– 120 (90%) против 69 (52%); G(-572)C– 26 (27%) против 7 (5%); Lys198Asn – 105 (79%) против 28 (21%).

Как видно из сравнительной таблицы пациенты с первичной ПОН имели достоверно ( $p < 0,05$ ) более высокий процент встречаемости всех исследуемых генных полиморфизмов, в то время как пациенты со вторичной ПОН не имели существенных отличий от контрольной группы в большинстве исследуемых полиморфизмов.

При исследовании контрольной группы, мы не выявили существенных популяционных отличий, от среднестатистической их распространенности, среди белых европейцев.

### **Расчёт относительного риска (RR) и отношения шансов (OR) генных полиморфизмов**

Нами был рассчитан относительный риск (RR) и отношение шансов (OR) в исследуемых группах, при их сравнении с контрольной группой, состоящей из здоровых женщин, сопоставимых по возрасту и ИМТ.

1. Сравнение группы №1 (пациенты с первичной ПОН) и контрольной группы: ген *AGT* полиморфизм (Met235Thr) RR=2,2 (95%; ДИ 1,99-2,43), OR=7,7 (95%; ДИ 7,42-7,98); ген *ITGA2* полиморфизм (C807T) RR=2,0 (95%; ДИ 1,84-2,21), OR=4,5 (95%; ДИ 4,38-4,72); ген *NOS3* полиморфизм (C786T) RR=2,1 (95%; ДИ 1,88-2,36), OR=4,4 (95%; ДИ 4,18-4,62); ген *FGB* полиморфизм (455G-A) RR=2,8 (95%; ДИ 2,49-3,07), OR=4,4 (95%; ДИ 4,22-4,68); ген *ITGB3* полиморфизм (Leu59Pro) RR=3,6 (95%; ДИ 3,13-3,91), OR=6,0 (95%; ДИ 5,85-6,21); ген *SERPINE (PAI) 1* полиморфизм (675 5G/4G) RR=1,7 (95%; ДИ 1,41-2,04), OR=8,6 (95%; ДИ 8,42-8,82); ген *IL6* полиморфизм (G(-572)C) RR=3,9 (95%; ДИ 3,66-4,19), OR=4,3 (95%; ДИ 4,06-4,59); ген *EDN1* полиморфизм (Lys198Asn) RR=3,8 (95%; ДИ 3,57-4,08), OR=13,9 (95%; ДИ 13,66-14,18) (Таблица 13).

Таблица 13 – Сравнение первичной ПОН и контрольной группы

Ген	AGT	ITGA2	NOS3	FGB	ITGB3	SERPINE (PAI) 1	IL6	EDN 1
<b>Полиморфизм</b>	Met235Thr	C807T	C786T	455G-A	Leu59Pro	675 5G/4G	G (-572) C	Lys198 Asn
<b>Относительный риск (RR)</b>	2,2	2	2,1	2,8	3,6	1,7	3,9	3,8
<b>Доверительный интервал (ДИ 95%)</b>	1,99-2,43	1,84-2,21	1,88-2,36	2,49-3,07	3,13-3,91	1,41-2,04	3,66-4,19	3,57-4,08
<b>Отношения шансов (OR)</b>	7,7	4,5	4,4	4,4	6,0	8,6	4,3	13,9
<b>Доверительный интервал (ДИ 95%)</b>	7,42-7,98	4,38-4,72	4,18-4,62	4,22-4,68	5,85-6,21	8,42-8,82	4,06-4,59	13,66-14,18

2. Сравнение группы №2 (пациенты со вторичной ПОН) и контрольной группы: ген *AGT* полиморфизм (Met235Thr) RR=1,1 (95%; ДИ 1,03-1,16), OR=1,1 (95%; ДИ 1,06-1,17); ген *ITGA2* полиморфизм (C807T) RR=1,1 (95%; ДИ 1,06-1,18), OR=1,1 (95%; ДИ 1,07-1,18); ген *NOS3* полиморфизм (C786T) RR=1,1 (95%; ДИ 1,05-1,19), OR=1,1 (95%; ДИ 1,07-1,16); ген *FGB* полиморфизм (455G-A) RR=1,2 (95%; ДИ 1,04-1,31), OR=1,2 (95%; ДИ 1,12-1,29); ген *ITGB3* полиморфизм (Leu59Pro) RR=1,2 (95%; ДИ 1,02-1,39), OR=1,4 (95%; ДИ 1,17-1,69); ген *SERPINE (PAI) 1* полиморфизм (675 5G/4G) RR=1,2 (95%; ДИ 1,06-1,42), OR=1,4 (95%; ДИ 1,21-1,76); ген *IL6* полиморфизм (G(-572)C) RR=1,6 (95%; ДИ 1,25-1,96), OR=1,8 (95%; ДИ 1,58-2,04); ген *EDN1* полиморфизм (Lys198Asn) RR=1,1 (95%; ДИ 1,08-1,19), OR=1,4 (95%; ДИ 1,18-1,69) (Таблица 14).

Таблица 14 – Сравнение вторичной ПОН и контрольной группы

Ген	AGT	ITGA2	NOS3	FGB	ITGB3	SERPINE (PAI) 1	IL6	EDN1
<b>Полиморфизм</b>	Met 235Thr	C807T	C786T	455G-A	Leu59 Pro	675 5G/4G	G(-572)C	Lys 198Asn
<b>Относительный риск (RR)</b>	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,6	1,1
<b>Доверительный интервал (ДИ 95%)</b>	1,03- 1,16	1,06- 1,18	1,05- 1,19	1,04- 1,31	1,02- 1,39	1,06- 1,42	1,25- 1,96	1,08- 1,19
<b>Отношения шансов (OR)</b>	1,1	1,1	1,1	1,2	1,4	1,4	1,8	1,4
<b>Доверительный интервал (ДИ 95%)</b>	1,06- 1,17	1,07- 1,18	1,07- 1,16	1,12- 1,29	1,17- 1,69	1,21- 1,76	1,58- 2,04	1,18- 1,69

Было выявлено, что вероятность наличия генных полиморфизмов была выше в группе пациентов с первичной ПОН. Благодаря расчёту отношения шансов и обнаружению наличия ассоциаций между первичной ПОН и рядом генных полиморфизмов, пусть и в разной степени выраженности, но всегда превышающей референсное значение в единицу. В группе вторичной ПОН таких ассоциаций выявлено не было. При исследовании генных полиморфизмов, в контрольной группе, не было выявлено существенных популяционных отличий, от среднестатистической их распространенности, среди белых европейцев.

Резюмируя всё вышеизложенное, можно утверждать, что имеются ассоциации первичной ПОН с рядом распространенных генных полиморфизмов, которые в свою очередь ассоциированы с сердечно-сосудистой патологией. Это может свидетельствовать о значительно более высоком риске развития ССЗ у пациентов с первичной ПОН, как по сравнению со здоровыми женщинами, так и с больными вторичной формой ПОН.

## Клинические случаи

### Пример №1. Первичная преждевременная овариальная недостаточность

В 2015 г. в ГБУ РО «Женская консультация № 1» г. Рязани обратилась пациентка А., 27 лет, с жалобами на аменорею в течение 12 месяцев. Менархе у нее наступило в 13 лет, и впоследствии у нее никогда не было регулярных менструаций. Ее менструации были светлыми и длились всего 3 дня, а циклы были каждые 3-9 месяцев. Она была нормального телосложения, но имела скудные волосы в подмышечных впадинах и на лобке. Ее грудь была по Таннеру 4 стадии, тазовое обследование было нормальным. УЗИ органов малого таза показало, что матка нормального размера, но яичники не были определенно видны. Анализы сыворотки крови были следующими: ФСГ 86,2 мМЕ/мл, ЛГ 33,1 мМЕ/мл и пролактин 106,3 мМЕ/мл. Дегидроэпиандростерон, тестостерон, антиядерные антитела и внутривенная урограмма - норма.

Был выставлен диагноз «Преждевременная овариальная недостаточность».

Физикальное обследование: рост 158 см, вес 64 кг, ИМТ 25,63 кг/м<sup>2</sup>, окружность талии 92 см, череп, размеры верхних и нижних конечностей между 50° и 75° перцентильями. Изменений пальцев рук и ног не обнаружено. Вторичные половые признаки развивались нормально. Черты лица не выявили дисморфизмов, также не было выявлено ни психических нарушений, ни когнитивного дефицита. Жизненные показатели были в норме. Гормональное исследование: ФСГ 71,38 мМЕ/л; ЛГ 35,50 мМЕ/л; эстрадиол <7 пг/мл.

При обследовании в 2020 году выявлены следующие факторы риска, характеризующие сердечно-сосудистый профиль женщины: артериальная гипертензия (САД=146 мм рт ст), общий холестерин 7,3 ммоль/л, ЛПВП 1,0 ммоль/л, ЛПНП 5,1 ммоль/л, триглицериды 2.6 ммоль/л, ИМТ 27,9 кг/м<sup>2</sup>, не курит/не курила. Данных за ИБС, фибрилляцию предсердий и сахарный диабет не

получено, получает антигипертензивную терапию. Риск FHS - 1,3%, риск SCORE2 - 6%, риск SCORE - 2%.

При обследовании в 2022 году (визит 24 месяца) выявлены следующие факторы риска, характеризующие сердечно-сосудистый профиль женщины: артериальная гипертензия (САД=142 мм рт ст), общий холестерин 7,0 ммоль/л, ЛПВП 0,9 ммоль/л, ЛПНП 5,52 ммоль/л, триглицериды 2,8 ммоль/л, ИМТ 28,4 кг/м<sup>2</sup>, не курит/не курила. Данных за ИБС, фибрилляцию предсердий и сахарный диабет не получено, получает антигипертензивную терапию. Риск FHS - 1,6%, риск SCORE2 - 6%, риск SCORE - 2%.

У данной пациентки за 24 месяца сердечно-сосудистые риски не изменились.

### **Пример №2. Вторичная преждевременная овариальная недостаточность**

2 июня 2018 г. в ГБУ РО «Женская консультация № 1» г. Рязани обратилась пациентка А. 27 лет с жалобами на аменорею и приливы жара, проходившая обследование по поводу бесплодия, страдала вторичной аменореей с 24 лет. В 24-летнем возрасте у женщины была обнаружена опухоль левого яичника размером 20 см, и в 2015 году ей была проведена овариэктомия. После этого количество менструаций увеличилось примерно на один год, а затем уменьшилось. В течение последних трех лет она получала заместительную гормональную терапию, что приводило к циклическим кровотечениям, но она оставалась ановуляторной.

На основании результатов гормонального анализа и клинических симптомов пациентке был поставлен диагноз преждевременная овариальная недостаточность (ПОН).

Жалобы: больная Б., 31 год, активных жалоб не предъявляет.

Из анамнеза: страдает, преждевременной овариальной недостаточностью 4 года, активно лечится и постоянно принимает назначенную ей заместительную гормональную терапию.

При обследовании в 2020 году выявлены следующие факторы риска, характеризующие сердечно-сосудистый профиль женщины: САД=120 мм рт ст, общий холестерин 6,1 ммоль/л, ЛПВП 1,3 ммоль/л, ЛПНП 4,14 ммоль/л, триглицериды 2,2 ммоль/л, ИМТ 27,4 кг/м<sup>2</sup>, не курит/не курила. Данных за ИБС, фибрилляцию предсердий и сахарный диабет не получено. Риск FHS - 0,1%, риск SCORE2 - 4%, риск SCORE - 1%.

При обследовании в 2022 году (визит 24 месяца) выявлены следующие факторы риска, характеризующие сердечно-сосудистый профиль женщины: САД=122 мм рт ст, общий холестерин 6,1 ммоль/л, ЛПВП 1,0 ммоль/л, ЛПНП 3,79 ммоль/л, триглицериды 2,5 ммоль/л, ИМТ 26,3 кг/м<sup>2</sup>, не курит/не курила. Данных за ИБС, фибрилляцию предсердий и сахарный диабет не получено. Риск FHS - 0,3%, риск SCORE2 - 4%, риск SCORE - 1%.

У данной пациентки за 24 месяца сердечно-сосудистые риски также не изменились.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В текущем исследовании сравнивались сердечно-сосудистые риски в когорте женщин среднего возраста с первичной и вторичной ПОН, а также данными контрольной группы, состоящей из здоровых женщин, сопоставимых по возрасту и ИМТ. Результаты исследования продемонстрировали, что женщины, страдающие преждевременной овариальной недостаточностью, обладают, целым рядом факторов риска, развития у них сердечно-сосудистых заболеваний.

Полученные данные свидетельствуют о том, что более неблагоприятный профиль кардиоваскулярных факторов риска наблюдается у пациентов с ПОН. При этом чаще факторы риска встречались в группе пациентов с первичной ПОН.

В текущем исследовании было обнаружено, что наиболее существенное отклонение биохимических показателей было в группе пациентов с первичной ПОН: они обладали в среднем на 3,2 ед. более высоким индексом атерогенности, что также отражалось в показателях основного обмена: общий холестерин был в среднем на 1.6 ммоль/л выше, ЛПНП были выше на 1,4 ммоль/л, триглицериды были выше на 0.8 ммоль/л, а ЛПВП наоборот были ниже на 0,6 ммоль/л. Похожую проблематику изучал Knauff E.A., et al. [114], однако, он в своём исследовании не разделял ПОН по этиологическому признаку, и если анализировать, полученные им результаты, то они скорее соответствовали вторичной, нежели первичной ПОН.

В ходе текущего исследования также было выявлено увеличение частоты встречаемости сердечно-сосудистых заболеваний у женщин с ПОН по сравнению с женщинами того же возраста с ненаступившей менопаузой, этот момент в своём исследовании отмечал Atsma F. et al. [131], однако, в данной работе не было разделения ПОН по этиологическому признаку, и полученные данные скорее соответствовали усредненному значению между первичной и вторичной ПОН в нашем исследовании. Похожее исследование также проводил Kalantaridou S.N., et al. [101], он обнаружил увеличение распространенности таких ССЗ как ГБ и ИБС, в группе пациентов с ПОН, однако он, опять же, не разделял ПОН по

этиологическому признаку и ограничился лишь ГБ и ИБС; оба этих упущения были исправлены в текущей работе.

В текущем исследовании было обнаружено, что пациенты с первичной ПОН обладали в среднем на 1.2 ммоль/л более высоким уровнем глюкозы в крови натощак и увеличенным в 26.6 раза относительным риском метаболического синдрома. Похожие результаты в своём исследовании получил Stanaway J.D., et al. [90], и хотя цифры уровня глюкозы в крови и были сопоставимы, однако, относительный риск, метаболического синдрома в нашем исследовании был выше, что опять же можно объяснить отсутствием деления ПОН на виды по этиологическому признаку.

В данном исследовании пациенты с первичной ПОН обладали более высоким уровнем ЛПНП и более низким ЛПВП. Похожую закономерность в своих работах отметили Gulhan I., et al. [149], и Ates S., et al. [56], и хотя, абсолютные числа в наших трёх исследованиях несколько отличаются, наличие данного сердечно-сосудистого риска уже не подлежит сомнению.

Parashar et al. [14] в своём исследовании выявил, что ПОН влияет на риск развития стенокардии и инфаркта миокарда. Он обнаружил, что женщины как с первичной, так и с вторичной менопаузой наступившей в возрасте до 40 лет, имеют в два раза более высокий риск развития стенокардии и инфаркта миокарда по сравнению с женщинами, переживающими менопаузу в возрасте 50 лет и старше в текущем исследовании, также прослеживается динамика увеличения распространенности ИБС в группе пациентов с ПОН, по сравнению с контрольной группой, однако в нашем исследовании риск был ещё выше и составил 13.7 в группе пациентов с первичной ПОН и 6 в группе с вторичной ПОН.

Подобные данные можно увидеть и в другом исследовании Многоэтническое исследование Wellons M., et al. [68] показало, что женщины разного этнического происхождения, страдающие ПОН как идиопатического, так и хирургического генеза, имели повышенный риск развития ИБС и инсульта.



Полученные нами данные, вполне сопоставимы с результатами других исследований, как выполненных нами ранее [51], так и различных международных исследований [50, 144, 34]. Более того, при использовании как разных выборок пациентов, так и разных методов статистического анализа, полученные цифры хоть и имели определённое колебание между собой, но ясно свидетельствовали о более высоком сердечно-сосудистом риске, именно у пациентов с преждевременной овариальной недостаточностью, по сравнению со здоровыми женщинами сопоставимыми по возрасту и ИМТ.

Также был рассчитан относительный риск и отношение шансов по всем параметрам, показавшим своё статистическое различие на более раннем этапе. Было обнаружено: во-первых, увеличение относительного риска по всем различающимся параметрам составило более 1, что значит увеличение наступления риска данных заболеваний в исследуемой группе (женщины с ПОН), по сравнению с контрольной, во-вторых, отношение шансов, отвечающее за ассоциацию данных явлений также превышало референсное значение в 1, что может убедительно свидетельствовать за их наличие в исследуемых группах.

Стоит отметить, что относительный риск и отношение шансов было повышено не равномерно в исследуемых группах, а со значительных преобладанием данных статистических показателей, в первой исследуемой группе, пациентов с первичной ПОН. Что может свидетельствовать не только о более высоком относительном риске наступления данных событий, но и также, об их куда более сильно выраженной ассоциации друг с другом.

Исследование подтверждает наличие нескольких факторов риска развития ССЗ у женщин с диагнозом ПОН, а именно, увеличение отношения окружности талии к окружности бёдер, более высокие цифры систолического и диастолического артериального давления, повышения частоты пульса, более высокий индекс атерогенности, изменения в худшую сторону в холестериновой формуле, а также увеличение концентрации глюкозы в крови натощак. Все вышеперечисленное является маркером, указывающим на предрасположенность к

сердечно-сосудистым заболеваниям, что соотносится с другими исследованиями [50, 51, 144].

У женщин с преждевременной овариальной недостаточностью статистически значимо повышен 10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, рассчитанный с использованием шкал оценки FRS и SCORE2. Похожие результаты мы можем наблюдать и в иных исследованиях [32,95].

Риск же развития фатальных сердечно-сосудистых событий в течение ближайших 10 лет, рассчитанный по шкале SCORE, статистически значимо не различался. Хотя в упомянутом выше исследовании отмечалось его наличие [32,95].

Проанализировав полученные данные, можно заключить, что у женщин с преждевременной овариальной недостаточностью повышен 10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Данная закономерность была выявлена как при расчёте 10-летнего риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, рассчитанного по шкале FRS, так и при расчёте по шкале SCORE2. При этом, риск развития ССЗ был выше в группе пациентов с первичной ПОН в сравнении с группой пациентов ятрогенного генеза.

Риск же развития смерти от сердечно-сосудистых заболеваний в течение ближайших 10 лет, рассчитанный по шкале SCORE, статистически значимо не различался.

При сравнении полученных результатов с другими, ранее нами опубликованными [13], мы видим, что вне зависимости от шкалы оценки, пациенты с ПОН имеют, более высокий 10-летний риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, но при этом не имеют более высокого 10-летнего риска развития смерти от тех же заболеваний.

Подобные результаты также были получены в ряде иностранных исследований, таких как [95,34], где также был выявлен более высокий риск развития ССЗ у пациентов с ПОН. А в исследовании [54] был выявлен, помимо более высокого риска развития самих ССЗ, ещё и более высокий риск развития смерти, от тех же заболеваний.

Хотя точные числовые значения и различаются от исследования к исследованию, но во всех них прослеживается общая тенденция повышению риска развития ССЗ у женщин страдающих ПОН.

Пациенты с первичной ПОН имели достоверно ( $p < 0,05$ ) более высокий процент встречаемости исследуемых генных полиморфизмов, а также благодаря расчёту отношения шансов и относительного риска было выявлено: повышение относительного риска выявления генных полиморфизмов, а также степени их ассоциации, что не было установлено у пациентов со вторичной ПОН. При этом, при исследовании генных полиморфизмов в контрольной группе, не было выявлено существенных популяционных отличий от среднестатистической их распространенности среди белых европейцев.

Полученные данные продемонстрировали, что более высокий риск развития патологии внутренних органов (в первую очередь патологии ССС) имеется у женщин с ПОН первичного генеза, что согласуется с другими исследованиями, ранее уже обнаружившими полиморфизм-зависимый риск повреждения сосудов у больных ПОН [96].

Однако, в них очень часто наблюдается один весьма спорный и противоречивый факт, а именно существенное колебание риска развития патологии внутренних органов в рамках одной исследуемой группы. Вероятно, данное колебание связано с разнородностью в контрольной группе, поэтому мы разделили её на две независимые группы, а именно больных с ПОН первичного (идиопатического) и вторичного (ятрогенного) генеза. В результате такого деления были получены более однородные данные, что подтверждает нашу гипотезу о существенно разном риске в этих исследуемых группах. Это, в свою очередь, объясняет, почему в одних исследованиях у таких больных определялся высокий, а в других средний или даже низкий риск развития заболеваний.

Наше исследование также затрагивает существенный вопрос исследования групп генных полиморфизмов, ассоциированных с ПОН. В исследовании [82] уже была выдвинута гипотеза что, частой причиной преждевременной овариальной недостаточности идиопатического генеза являются мутации в генах, сцепленных

с X-хромосомой, которые часто сопровождаются множественными полиморфизмами и в других генах, что также согласуется с нашими данными о множественном характере сопутствующих генных полиморфизмов именно у больных первичной ПОН.

Таким образом, полученные в текущем исследовании результаты хоть и различаются в ряде аспектов с результатами других исследований, как выполненными нами ранее по теме диссертационного исследования [15,16,13,14], так и приведёнными выше, однако, это вполне легко объясняется в первую очередь, различием в выборке. Так как в нашем исследовании пациенты с ПОН разделялись на две группы, а не сравнивались как единое целое.

## ВЫВОДЫ

1. У пациенток с ПОН отмечено статистически значимое по сравнению со здоровыми женщинами увеличение окружности талии, более высокие цифры систолического и диастолического артериального давления, повышенная частота сердечных сокращений, более высокий уровень общего холестерина, ЛПНП, триглицеридов, глюкозы крови натощак, а также более низкий уровень ЛПВП. Кроме того, у пациенток с ПОН статистически значимо чаще встречаются артериальная гипертензия, аритмии, ИБС, сахарный диабет и метаболический синдром.

2. Первичная и вторичная ПОН была ассоциирована со следующими факторами кардиоваскулярного риска: увеличение окружности талии, более высокие значения систолического и диастолического артериального давления, дислипидемия. Первичная ПОН ассоциирована с увеличением риска развития артериальной гипертензии в 3,9 раза, аритмии – в 4,2 раза, сахарного диабета – в 6,3 раза, ИБС – в 13,7 раз, метаболического синдрома – в 26 раз по сравнению со здоровыми женщинами. Вторичная ПОН ассоциирована с увеличением риска развития артериальной гипертензии в 3,1 раза, аритмии – в 2,4 раза, сахарного диабета – в 2,7 раза, ИБС – в 6 раз, метаболического синдрома – в 16 раз по сравнению со здоровыми женщинами.

3. Выявлено статистически значимое увеличение 10-летнего риска развития ССЗ, оцененного с использованием FRS. У женщин с первичной и вторичной ПОН он составил в среднем 15,1% и 13,3% соответственно, что соответствует умеренному 10-летнему риску развития ССЗ, в контрольной группе он составил 7,2%, что соответствует низкому 10-летнему риску. 10-летний риск развития ССЗ по шкале SCORE2 также статистически значимо был повышен у женщин с ПОН, у пациентов с первичной ПОН он составил 9,4%, у женщин со вторичной ПОН составил 7,6%, оба показателя соответствуют высокому 10-летнему риску, в контрольной группе он составил 5,1%, что соответствует умеренному 10-летнему риску развития ССЗ. Риск развития смерти от ССЗ в течение ближайших 10 лет,

рассчитанный по шкале SCORE, в группах женщин, страдающих ПОН, и группе контроля статистически значимо не различался и соответствовал низкому риску – менее 1%. Сердечно-сосудистый риск при 3-летнем наблюдении у пациентов с ПОН статистически значимо не изменился независимо от её этиологии.

4. Выявлены статистически значимые различия во встречаемости генных полиморфизмов в группе пациенток с первичной ПОН при их сравнении с контрольной группой: Met235Thr; C807T; C786T; 455G-A; Leu59Pro; 675 5G/4G; G(-572)C; Lys198Asn. У пациентов со вторичной ПОН статистически значимых различий не выявлено.

5. Выявлены ассоциации между первичной ПОН и изучаемыми генными полиморфизмами: ген *AGT* полиморфизм (Met235Thr); ген *ITGA2* полиморфизм (C807T); ген *NOS3* полиморфизм (C786T); ген *FGB* полиморфизм (455G-A); ген *ITGB3* полиморфизм (Leu59Pro); ген *SERPINE (PAI) 1* полиморфизм (675 5G/4G); ген *IL6* полиморфизм (G(-572)C); ген *EDN1* полиморфизм (Lys198Asn). У пациентов со вторичной ПОН статистически значимых ассоциаций не выявлено.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Пациенты с преждевременной овариальной недостаточностью любой формы должны регулярно наблюдаться медицинскими работниками, так как имеют более высокий сердечно-сосудистый риск и бремя факторов риска.

2. Женщины с ПОН должны ежегодно проходить обследование на предмет наличия у них сердечно-сосудистых осложнений, так как они имеют значительно более высокий риск их развития.

3. Женщинам с диагнозом «первичная преждевременная овариальная недостаточность» может быть рекомендовано прохождение медико-генетического обследования на предмет наличия у них наиболее распространенных генных полиморфизмов, что позволит более точно прогнозировать развитие ассоциированных с ними сердечно-сосудистых заболеваний и своевременно начать их профилактику.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АГ – артериальная гипертензия  
АД – артериальное давление  
АМГ – антимюллеров гормон  
АПФ – ангиотензин-превращающий фермент  
ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка  
ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон  
ДИ – доверительный интервал  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ЗГТ – заместительная гормональная терапия  
ИАП – ингибитор активатора плазминогена  
ИБС – ишемическая болезнь сердца  
ИМТ – индекс массы тела  
КС – климактерический синдром  
ЛЖ – левый желудочек  
ЛПВП – липопротеиды высокой плотности  
ЛПНП – липопротеиды низкой плотности  
МПК – минеральная плотность кости  
МС – метаболический синдром  
ОКС – острый коронарный синдром  
ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения  
ОТ – окружность талии  
ОШ – отношение шансов  
ПОН – преждевременная овариальная недостаточность  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
САД – систолическое артериальное давление  
СН – сердечная недостаточность  
СОА – синтаза оксида азота  
СС – сердечно-сосудистый



ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТЭЛА – тромбоэмболия лёгочной артерии

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЧКВ – чрезкожное коронарное вмешательство

ЭКГ – электрокардиография

ЭФ – электрофоретическая

НОМА-IR – индекс инсулинорезистентности

Ме – межквартильный интервал

NO – оксид азота

OR – отношение шансов

RR – относительный риск

Тaq-полимераза – термостабильный фермент, катализирующий удлинение новой цепи ДНК

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аверкова, В. Г. Анализ удовлетворенности лечением пациенток с преждевременной недостаточностью яичников / В. Г. Аверкова, С. В. Юренева. – Текст : непосредственный // Акушерство и гинекология. – 2022. – № 10. – С. 83-92. – DOI 10.18565/aig.2022.10.83-92.
2. Аверкова, В. Г. Оценка качества жизни пациенток с преждевременной недостаточностью яичников, принимающих заместительную гормональную терапию / В. Г. Аверкова, С. В. Юренева. – Текст : непосредственный // Акушерство и гинекология. – 2023. – № 5. – С. 50-58. – DOI 10.18565/aig.2023.16.
3. Адамян, Л.В. Патогенетические аспекты преждевременной недостаточности яичников / Л.В. Адамян, Е.В. Сибирская, А.В. Щерина. – Текст : непосредственный // Проблемы репродукции. – 2021. – Т. 27, № 1. – С. 6-12.
4. Адамян, Л. В. Преждевременная недостаточность яичников и аутоиммунитет: есть ли взаимосвязь? / Л. В. Адамян, Л. Г. Пивазян, А. А. Антонова. – Текст : непосредственный // Проблемы репродукции. – 2022. – Т. 28, № 6. – С. 116-124. – DOI 10.17116/repro202228061116.
5. Андреева, Е. Н. Этиологические и патогенетические факторы дисфункции яичников у женщин репродуктивного периода / Е. Н. Андреева, Е. В. Шереметьева, Л. В. Адамян. – Текст : непосредственный // Проблемы репродукции. – 2020. – Т. 26, № 6. – С. 34-43. – DOI 10.17116/repro20202606134.
6. Бурова, Н.А. Новый терапевтический подход в лечении преждевременной недостаточности яичников у женщин репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями органов малого таза / Н. А. Бурова, Т. А. Селезнева, О. В. Аболонина. – Текст : непосредственный // РМЖ. Мать и дитя. – 2019. – Т. 2, № 1. – С. 10-15.
7. Влияние артериального давления на смертность мужчин и женщин среднего и пожилого возраста: когортное исследование / А. Э. Имаева, Ю. А. Баланова, А. В. Капустина [и др.]. – Текст : непосредственный // Экология человека. – 2020. – № 9. – С. 49-56. – DOI 10.33396/1728-0869-2020-9-49-56.

8. Влияние полиморфизмов T-786C и G894T гена эндотелиальной синтазы оксида азота на развитие эндотелиальной дисфункции при преждевременной недостаточности яичников / Р. Е. Игнатьева, Т. А. Густоварова, А. Н. Иванян [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 83-87.

9. Диагностика и лечение сердечно-сосудистых заболеваний при беременности: национальные рекомендации - 2018 [артериальная гипертензия] / Р. И. Стрюк, Ю. А. Бунин, В. М. Гурьева [и др.]. – Текст : непосредственный // Терапия. – 2019. – Т. 5, № 1(27). – С. 24-35. – DOI 10.18565/therapy.2019.1.24-35.

10. Дубровина, С.О. Преждевременная недостаточность яичников: арсенал подходов / С.О. Дубровина, А.Д. Александрина. – Текст : непосредственный // Акушерство и гинекология. – 2022. – № 3. – С. 13-20. – DOI 10.18565/aig.2022.3.13-20.

11. Конвенция по правам человека и биомедицине Совета Европы // Экспресс-хроника. – 1997. – № 2. – Текст : электронный. – URL: <http://www.coe.ru/03conv-bio.htm>

12. Кэмпбелл, А. Медицинская этика: учеб. пособие для вузов: пер. с англ. / А. Кэмпбелл, Г. Джиллетт, Г. Джонс; под ред. акад. РАМН Ю.М. Лопухина и член-корр. РАН Б. Г. Юдина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 400 с. – Текст : непосредственный.

13. Лопухов, С.В. Анализ риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и их неблагоприятных исходов, у женщин, страдающих преждевременной овариальной недостаточностью, по сравнению со здоровыми женщинами / С. В. Лопухов, Е. В. Филиппов. – Текст : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2021. – № 4. – С. 86. – DOI 10.17513/spno.31047.

14. Лопухов, С.В. Ассоциации комбинаций однонуклеотидных полиморфизмов с неинфекционными заболеваниями и неблагоприятными исходами у женщин с преждевременной овариальной недостаточностью / С. В.

Лопухов, Е. В. Филиппов. – Текст : непосредственный // РМЖ. – 2022. – № 8. – С. 56-60.

15. Лопухов, С.В. Преждевременная овариальная недостаточность, её последствия, смертность и влияние на сердечно-сосудистую систему / С. В. Лопухов, Е. В. Филиппов. – Текст : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 147-156. – DOI 10.23888/HMJ202191147-156.

16. Лопухов, С. В. Сравнение риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний у женщин с преждевременной овариальной недостаточностью и здоровыми женщинами / С. В. Лопухов. – Текст : непосредственный // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2021. – Т. 10, № S2. – С. 149.

17. Мадаева, И.М. Этнические особенности нарушений сна у женщин климактерического периода / И.М. Мадаева, Н.В. Семенова, Л.И. Колесникова. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, № 4-2. – С. 44-49.

18. Марченко, Л.А. Генетическая гетерогенность преждевременного истощения яичников и наследственные факторы ранней менопаузы / Л.А. Марченко, Д.В. Залетаев. – Текст : непосредственный // Проблемы репродукции. – 2007. – № 1. – С. 6–12.

19. Международные этические требования к медицинским исследованиям с участием человека. – Текст : непосредственный // Терапевтический архив. – 1996. – № 11. – С. 58–64.

20. Менопауза и гиперурикемия у женщин в российской популяции (результаты исследования ЭССЕ-РФ) / С. А. Максимов, С. А. Шальнова, Г. А. Муромцева [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2021. – Т. 76, № 5. – С. 449-457. – DOI 10.15690/vramn1455.

21. Менопауза и климактерическое состояние у женщины : Клинические рекомендации / Л. В. Адамян, Е. Н. Андреева, И. А. Аполихина [и др.]. – Москва : Российское общество акушеров-гинекологов, 2021. – 85 с. – Текст : непосредственный.

22. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации «Менопауза и климактерическое состояние у женщины». – Текст : электронный. – URL: [minzdrav.gov.ru/pdf](http://minzdrav.gov.ru/pdf)
23. Надеяева, Я.Г. Синдром поликистоза яичников и менопауза / Я.Г. Надеяева, Л.В. Сутурина. – Текст : непосредственный // Доктор. Ру. – 2018. – № 10 (154). – С. 47-50.
24. Надлежащая клиническая практика: [ГОСТ Р 52379 – 2005]. – М.: Стандартинформ, 2006. – 34 с. – Текст : непосредственный.
25. Особенности липидного состава сыворотки крови женщин в период менопаузального перехода / В. И. Комедина, С. В. Юренева, В. В. Чаговец, Н. Л. Стародубцева. – Текст : непосредственный // Акушерство и гинекология. – 2022. – № 6. – С. 90-97. – DOI 10.18565/aig.2022.6.90-97
26. Региональная депривация и риск развития сердечно-сосудистых заболеваний по Фрамингемской шкале: данные ЭССЕ-РФ / А. А. Зеленина, С. А. Шальнова, Г. А. Муромцева [и др.]. – Текст : непосредственный // Профилактическая медицина. – 2023. – Т. 26, № 1. – С. 49-58. – DOI 10.17116/profmed20232601149.
27. Репродуктивные исходы у девочек-подростков с воспалительными заболеваниями органов малого таза / Л. В. Адамян, Е. В. Сибирская, С. М. Шарков [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский педиатрический журнал. – 2023. – Т. 26, № 2. – С. 140-144. – DOI 10.46563/1560-9561-2023-26-2-140-144.
28. Стрюк, Р. И. Кардиология: Национальное руководство. Беременность и сердечно-сосудистые заболевания / Р. И. Стрюк, С. Р. Мравян, В. А. Петрухин. – Текст : непосредственный // Кардиология: новости, мнения, обучение. – 2019. – Т. 7, № 4(23). – С. 51-61.
29. менопауза как фактор риска раннего развития коморбидных состояний у женщин репродуктивного возраста / О. В. Шабалова, С. В. Юренева, Е. И. Ермакова [и др.]. – Текст : непосредственный // Акушерство и гинекология. – 2021. – № 6. – С. 54-59. – DOI 10.18565/aig.2021-6.54-59.

30. Частота преждевременной недостаточности яичников и ранней менопаузы у носительниц патогенных вариантов BRCA1 / С. Д. Рштуни, Г. Е. Чернуха, А. Е. Донников [и др.]. – Текст : непосредственный // Гинекология. – 2022. – Т. 24, № 5. – С. 374-379. – DOI 10.26442/20795696.2022.5.201688.
31. A monoclonal antibody (SZ21) specific for platelet GPIIIa distinguishes PIA1 from PIA2 / E.J. Weiss, P.J. Goldschmidt-Clermont, D. Grigoryev [et al.]. – Text : visual // Tissue Antigens. – 1995. – Vol. 46. – P. 374-381.
32. A new platelet-specific alloantigen Br(a): report of 4 cases with neonatal alloimmune thrombocytopenia / V. Kiefel, S. Santoso, B. Katzmann, C Mueller-Eckhardt. – Text : visual // Vox Sang. – 1988. – Vol. 54. – P. 101-106.
33. Age at menopause and incident heart failure: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis / I.A. Ebong, K.E. Watson, D.C. Goff Jr [et al.]. – Text : visual // Menopause. – 2014. – Vol. 21. – P. 585–591.
34. Age at natural menopause and cause-specific mortality / A. M. Mondul, C. Rodriguez, E. J. Jacobs [et al.]. – Text : visual // American Journal of Epidemiology. – 2005. – Vol. 162, №11. – P. 1089–1097. – DOI: 10.1093/aje/kwi324.
35. Age at natural menopause and risk of ischemic stroke: the Framingham Heart Study / L.D. Lisabeth, A.S. Beiser, D.L. Brown [et al.]. – Text : visual // Stroke. – 2009. – Vol. 40. – P. 1044–1049.
36. Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphisms and susceptibility of pre-eclampsia: a meta-analysis / R. Lin, Y. Lei, Z. Yuan [et al.]. – Text : visual // Ann Hum Genet. – 2012. – Vol. 76, № 5. – P.377-86. [PMID: 22881375]
37. Angiotensinogen M235T polymorphism and the risk of myocardial infarction and stroke among hypertensive patients on ACE-inhibitors or beta-blockers / H. Schelleman, O.H. Klungel, J.C. Witteman [et al.]. – Text : visual // Eur J Hum Genet. – 2007. – Vol. 15, № 4. – P. 478-84. Epub 2007 Feb 14. [PMID: 17299437]
38. Aptamer-17 beta-estradiol-antibody sandwich ELISA for determination of gynecological endocrine function / Y. Huang, L. Zhang, Z. Li [et al.]. – Text : visual // Biotechnol Appl Biochem. – 2021. – Vol. 68. – P. 881–888.

39. Association analysis of genetic polymorphisms of factor V, factor VII and fibrinogen, chain genes with human abdominal aortic aneurysm / K. Oszajca, K. Wronski, G. Janiszewska [et al.]. – Text : visual // *Exp Ther Med.* – 2012. – Vol. 4, № 3. – P. 514-518. Epub 2012 Jun 12.
40. Association of angiotensinogen gene T235 variant with progression of immunoglobulin A nephropathy in Caucasian patients / Y. Pei, J. Scholey, K. Thai [et al.]. – Text : visual // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 100. – P. 814-820. [PMID: 9259580]
41. Association of genomic loci from a cardiovascular gene SNP array with fibrinogen levels in European Americans and African-Americans from six cohort studies: the Candidate Gene Association Resource (CARE) / C.L. Wassel, L.A. Lange, B.J. Keating [et al.]. – Text : visual // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – P. 268-275.
42. Association of the 4G/5G polymorphism in the promoter region of plasminogen activator inhibitor-1 with abdominal aortic aneurysms / J.I. Rossaak, A.M. Van Rij, G.T. Jones, E.L. Harris. – Text : visual // *J Vasc Surg.* – 2000. – Vol. 31, № 5. – P. 1026-32. – DOI: 10.1067/mva.2000.104589. PMID: 10805895.
43. Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women / H.W. Chung, J.S. Seo, S.E. Hur [et al.]. – Text : visual // *J Hum Genet.* – 2003. – Vol. 48, № 5. – P. 243-8. [PMID: 12768442]
44. Associations of angiotensinogen gene mutations with hypertension and myocardial infarction in a gulf population / P.M. Frossard, S.H. Hill, Y.I. Elshahat [et al.]. – Text : visual // *Clin. Genet.* – 1998. – Vol. 54. – P. 285-293. [PMID: 9831339]
45. Bertone-Johnson, E.R. Early menopause and subsequent cardiovascular disease / E.R. Bertone-Johnson, J.E. Manson. – Text : visual // *Menopause.* – 2015. – Vol. 22. – P. 1–3.
46. Beta-fibrinogen G-455A polymorphisms and recurrent miscarriage / C. Ticconi, F. Mancinelli, P. Gravina [et al.]. – Text : visual // *Gynecol Obstet Invest.* – 2011. – Vol. 71, № 3. – P. 198-201. – DOI: 10.1159/000317522. Epub 2010 Dec 15.

47. beta-Fibrinogen Gene -455 G/A Polymorphism in Korean Ischemic Stroke Patients / S.H. Lee, M.K. Kim, M.S. Park [et al.]. – Text : visual // *J Clin Neurol.* – 2008. – Vol. 4, № 1. – P. 17-22. – DOI: 10.3988/jcn.2008.4.1.17. Epub 2008 Mar 20.
48. Bove, R. Autoimmune diseases and reproductive aging / R. Bove. – Text : visual // *Clin Immunol.* – 2013. – Vol. 149, № 2. – P. 251–264.
49. Cardiovascular autonomic dysfunction in primary ovarian insufficiency: clinical and experimental evidence / S. Goldmeier, K. De Angelis, K. Rabello Casali [et al.]. – Text : visual // *Am J Transl Res.* – 2013. – Vol. 6, № 1. – P. 91–101.
50. Cardiovascular disease risk in women with premature ovarian insufficiency: A systematic review and meta-analysis / J.E. Roeters van Lennep, K.Y. Heida, M.L. Bots [et al.]. – Text : visual // *European Journal of Preventive Cardiology.* – 2014. – Vol. 23, №2. – P. 178–186. – DOI:10.1177/2047487314556004
51. Cardiovascular effects of physiological and standard sex steroid replacement regimens in premature ovarian failure / J.P. Langrish, N.L. Mills, L.E. Bath [et al.]. – Text : visual // *Hypertension.* – 2009. – Vol. 53, №5. – P. 805-811. – DOI:10.1161/hypertensionaha.108.126516
52. Cardiovascular health and the menopausal woman: the role of estrogen and when to begin and end hormone treatment / F. Naftolin, J. Friedenthal, R. Nachtigall [et al.]. – Text : electronic // *F1000Res.* – 2019. – DOI: 10.12688/f1000research.15548.1.
53. Central European Meningococcal Genetic Study Group. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene in children with systemic meningococcaemia / G. Geishofer, A. Binder, M. Müller [et al.]. – Text : visual // *Eur J Pediatr.* – 2005. – Vol. 164, № 8. – P. 486-90. – DOI: 10.1007/s00431-005-1673-4. Epub 2005 Apr 21. PMID: 15843979.
54. Characterization of inherited differences in transcription of the human integrin alpha-2 gene / B. Jacquelin, D. Rozenshteyn, S. Kanaji [et al.]. – Text : visual // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 23518-23524.
55. Characterization of the human platelet glycoprotein IIIa gene: comparison with the fibronectin receptor beta-subunit gene / F. Lanza, N. Kieffer, D.R. Phillips, L.A. Fitzgerald. – Text : visual // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. – P. 18098-18103.



56. Comparison of metabolic profile and abdominal fat distribution between karyotypically normal women with premature ovarian insufficiency and age matched controls / S. Ates, G. Yesil, O. Sevket [et al.]. – Text : visual // *Maturitas*. – 2014. – Vol. 79, № 3. – P. 306–310.
57. Concentrated exosomes from menstrual blood-derived stromal cells improves ovarian activity in a rat model of premature ovarian insufficiency / S. Zhang, B. Huang, P. Su [et al.]. – Text : visual // *Stem Cell Res Ther*. – 2021. – Vol. 12. – P. 178.
58. Correlation between an interleukin-6 -572C/G polymorphism and chronic periodontitis / L. Jingjin, G. Zemin, M. Xin [et al.]. – Text : visual // *Int J Periodontics Restorative Dent*. – 2010. – Vol. 30, № 3. – P. 301-5.
59. Coulam, C. Incidence of Premature Ovarian Failure / C. Coulam, S. Adamson, J. Annegers. – Text : visual // *Obstetrical & Gynecological Survey*. – 1987. – Vol. 42, №3. – P. 182–183.
60. Current strategies for quantification of estrogens in clinical research / N. Denver, S. Khan, N.Z.M. Homer [et al.]. – Text : visual // *J Steroid Biochem Mol Biol*. – 2019. – Vol. 192. – P. 105373.
61. Das, N. Molecular regulation of follicle-stimulating hormone synthesis, secretion and action / N. Das, T.R. Kumar. – Text : visual // *J Mol Endocrinol*. – 2018. – Vol. 60. – P. R131–R155.
62. Decreased expression of TERT and telomeric proteins as human ovaries age may cause telomere shortening / F. Uysal, E.G. Kosebent, H.S. Toru [et al.]. – Text : visual // *J Assist Reprod Genet*. – 2021. – Vol. 38. – P. 429–441.
63. Detection of putative functional angiotensinogen (AGT) gene variants controlling plasma AGT levels by combined segregation-linkage analysis / E. Brand, N. Chatelain, F. Paillard [et al.]. – Text : visual // *Europ. J. Hum. Genet*. – 2002. – Vol. 10. – P. 715-723.
64. Development of anti-immunocomplex specific antibodies and non-competitive time-resolved fluorescence immunoassay for the detection of estradiol / J.

Leivo, L. Kivimaki, E. Juntunen [et al.]. – Text : visual // *Anal Bioanal Chem.* – 2019. – Vol. 411. – P. 5633–5639.

65. DNA mismatch repair gene MSH6 implicated in determining age at natural menopause / J.R. Perry, Y.H. Hsu, D.I. Chasman [et al.]. – Text : visual // *Hum Mol Genet.* – 2014. – Vol. 23. – P. 2490–2497.

66. Dual-mode sensing platform guided by intramolecular electrochemiluminescence of a ruthenium complex and cationic *N,N*-Bis(2-(trimethylammonium iodide)propylene) Perylene-3,4,9,10-tetracarboxydiimide for estradiol assay / J. Xue, Q. Zhao, L. Yang [et al.]. – Text : visual // *Anal Chem.* – 2021. – Vol. 93. – P. 6088–6093.

67. Early menopause predicts angina after myocardial infarction / S. Parashar, K.J. Reid, J.A. Spertus [et al.]. – Text : visual // *Menopause.* – 2010. – Vol. 17. – P. 938–945.

68. Early menopause predicts future coronary heart disease and stroke: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis / M. Wellons, P. Ouyang, P.J. Schreiner [et al.]. – Text : visual // *Menopause.* – 2012. – Vol. 19. – P. 1081–1087.

69. Effects of alginate concentration and ovarian cells on in vitro development of mouse preantral follicles: a factorial study / P. Jamalzaei, M.R. Valojerdi, L. Montazeri [et al.]. – Text : visual // *Int J Fertil Steril.* – 2020. – Vol. 13. – P. 330–338.

70. EMAS position statement: managing women with premature ovarian failure / S. Vujovic, M. Brincat, T. Erel [et al.]. – Text : visual // *Maturitas.* – 2010. – Vol. 67, №1. – P. 91–93.

71. Endothelin-1 and endothelial nitric oxide polymorphism in idiopathic pulmonary arterial hypertension / S. Vadapalli, H. Surekha Rani, Bks Sastry, Pratibha Nallari. – Text : visual // *International journal of molecular epidemiology and genetics.* – 2010. – Vol. 1, № 3. – P. 208.

72. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. – Text : visual // *Hum Reprod.* – 2016. – Vol. 31, № 5. – P. 926–937. – DOI: 10.1093/humrep/dew027

73. Estrogen deprivation and cardiovascular disease risk in primary ovarian insufficiency / J.P. Christ, M.N. Gunning, G. Palla [et al.]. – Text : visual // *Fertil Steril.* – 2018. – Vol. 109, № 4. – P. 594–600. – DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.11.035
74. Estrogen, brain structure, and cognition in postmenopausal women / C.P. Boyle, C.A. Raji, K.I. Erickson [et al.]. – Text : visual // *Hum Brain Mapp.* – 2021. – Vol. 42. – P. 24–35.
75. Estrogen-mediated protection against coronary heart disease: the role of the Notch pathway / F. Fortini, F. Vieceli Dalla Sega, C. Caliceti [et al.]. – Text : visual // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2019. – Vol. 189. – P. 87–100.
76. Estudio del polimorfismo K198N en el gen EDN1 en pacientes afectados de hipertension arterial pulmonar / G. Pousada, Adolfo Baloiira, Carlos Vilariño, Diana Valverde. – Text : visual // *Med. Clin. (Barc).* – 2015. – Vol.144, № 8. – P. 348–352.
77. ET-1 Lys198Asn and ET(A) receptor H323H polymorphisms in heart failure. A case-control study / M. G. Colombo, Enrica Ciofini, Umberto Paradossi [et al.]. – Text : visual // *Cardiology.* – 2006. – Vol. 105, №4. – P. 246–252.
78. Exome sequencing of a primary ovarian insufficiency cohort reveals common molecular etiologies for a spectrum of disease / A. Jolly, Y. Bayram, S. Turan [et al.]. – Text : visual // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2019. – Vol. 104. – P. 3049–3067.
79. Exosomal miRNA-17-5p derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improves ovarian function in premature ovarian insufficiency by regulating SIRT7 / C. Ding, L. Zhu, H. Shen [et al.]. – Text : visual // *Stem Cells.* – 2020. – Vol. 38. – P. 1137–1148.
80. Exosomal miRNA-320a is released from hAMSCs and regulates SIRT4 to Prevent reactive oxygen species generation in POI / C. Ding, C. Qian, S. Hou [et al.]. – Text : visual // *Mol Ther Nucleic Acids.* – 2020. – Vol. 21. – P. 37–50.
81. Fibrinogen gene promoter -455 A allele as a risk factor for lacunar stroke / M. Martiskainen, T. Pohjasvaara, J. Mikkelsen [et al.]. – Text : visual // *Stroke.* – 2003. – Vol. 34, № 4. – P. 886-91. Epub 2003 Mar 13.

82. Fish, J.D. Hormone replacement for survivors of childhood cancer with ovarian failure – when is it worth the risk? / J.D. Fish. – Text : visual // *J Pediatr Adolesc Gynecol.* – 2011. – Vol. 24. – P. 98–101.

83. Flynn, M.R. The Cardiology Audit and research. European Epidemiology Federation / M.R. Flynn. – Text : electronic.– URL: <http://dundee.ac.uk/iea/GoodPract.html>

84. Follicular fluid exosomes: Important modulator in proliferation and steroid synthesis of porcine granulosa cells / C. Yuan, Z. Li, Y. Zhao [et al.]. – Text : visual // *FASEB J.* – 2021. – Vol. 35. – P. e21610.

85. Gameiro, C.M. Menopause and aging: changes in the immune system – a review / C.M. Gameiro, F. Romao, C. Castelo-Branco. – Text : visual // *Maturitas.* – 2010. – Vol. 67, № 4. – P. 316–320. – DOI: 10.1016/j.maturitas.2010.08.003

86. Genetic analysis of 103 candidate genes for coronary artery disease and associated phenotypes in a founder population reveals a new association between endothelin-1 and high-density lipoprotein cholesterol / C. Pare, D. Serre, D. Brisson [et al.]. – Text : visual // *Am. J. Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 80. – P. 673-682.

87. Genetic insights into biological mechanisms governing human ovarian ageing / K.S. Ruth, F.R. Day, J. Hussain [et al.]. – Text : visual // *Nature.* – 2021. – Vol. 596. – P. 393–397.

88. Gliklich, R. Good Practice for Patient Registries / R. Gliklich // *AHRQ Annual Meeting.* – Bethesda, 2008. – Text : electronic. – URL: [http://www.powershow.com/view1/e0bbfZDc1Z/Good\\_Practice\\_for\\_Patient\\_Registries\\_AHRQ\\_Annual\\_Meeting\\_Bethesda\\_MD\\_September\\_9\\_2008\\_Speaker\\_Ric\\_powerpoint\\_ppt\\_presentation](http://www.powershow.com/view1/e0bbfZDc1Z/Good_Practice_for_Patient_Registries_AHRQ_Annual_Meeting_Bethesda_MD_September_9_2008_Speaker_Ric_powerpoint_ppt_presentation)

89. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. – Text : visual // *The Lancet.* – 2015. – Vol. 385, №9963. – P. 117–171.

90. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for

195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 / J.D. Stanaway, A. Afshin, E. Gakidou [et al.]. – Text : visual // Lancet. – 2018. – Vol. 392, № 10159. – P. 1923–1994. – DOI: 10.1016/s0140-6736(18)32225-6

91. Glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and increased risk of recurrent acute coronary syndromes: a five year follow up. Scientific letters / A.M. Leone, V. De Stefano, F. Burzotta [et al.]. – Text : visual // Heart. – 2004. – Vol. 90. – P. 567-569.

92. Gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in cancer women: systematic review and meta-analysis of randomized trials / L. Del Mastro, M. Ceppi, F. Poggio [et al.]. – Text : visual // Cancer Treat Rev. – 2014. – Vol. 40. – P. 675–683.

93. Gorodeski, E.Z. Is early menopause a risk factor for heart failure? / E.Z. Gorodeski. – Text : visual // Menopause. – 2014. – Vol. 21. – P. 558–560.

94. Heart disease risk determines menopausal age rather than the reverse / H.S. Kok, K.M. van Asselt, Y.T. van der Schouw [et al.]. – Text : visual // J Am Coll Cardiol. – 2006. – Vol. 47, № 10. – P. 1976–1983. – DOI: 10.1016/j.jacc.2005.12.066

95. Hereditary variation in platelet integrin alpha-2-beta-1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha-2 gene coding sequence / T.J. Kunicki, M. Kritzik, D.S. Annis, D.J. Nugent. – Text : visual // Blood. – 1997. – Vol. 89. – P. 1939-1943.

96. Hershlag, A. Ovarian failure in adolescent cancer survivors should be treated / A. Hershlag, M.E. Raush, M. Cohen. – Text : visual // J Pediatr Adolesc Gynecol. – 2011. – Vol. 24. – P. 101–103.

97. Holzhauser, L. Endothelin receptor polymorphisms in the cardiovascular system: potential implications for therapy and screening / L. Holzhauser, R. Zolty. – Text : visual // Heart Fail Rev. – 2014. – Vol. 6. – P. 743–758.

98. Hysterectomy and risk of cardiovascular disease: a population-based cohort study / E. Ingelsson, C. Lundholm, A.L. Johansson, D. Altman. – Text : visual // Eur Heart J. – 2011. – Vol. 32. – P. 745–750.

99. Identification of a unique epigenetic profile in women with diminished ovarian reserve / K.W. Olsen, J. Castillo-Fernandez, A.C. Chan [et al.]. – Text : visual // *Fertil Steril*. – 2021. – Vol. 115. – P. 732–741.

100. Impact of ovarian aging in reproduction: from telomeres and mice models to ovarian rejuvenation / A.M. Polonio, L. Chico-Sordo, I. Cordova-Oriz [et al.]. – Text : visual // *Yale J Biol Med*. – 2020. – Vol. 93. – P. 561–569.

101. Impaired endothelial function in young women with premature ovarian failure: normalization with hormone therapy / S.N. Kalantaridou, K.K. Naka, E. Papanikolaou [et al.]. – Text : visual // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2004. – Vol. 89, № 8. – P. 3907–3913.

102. Increased Alzheimer's risk during the menopause transition: a 3-year longitudinal brain imaging study / L. Mosconi, A. Rahman, I. Diaz [et al.]. – Text : visual // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol. 13. – P. e0207885.

103. Increased cardiovascular mortality after early bilateral oophorectomy / C.M. Rivera, B.R. Grossardt, D.J. Rhodes [et al.]. – Text : visual // *Menopause*. – 2009. – Vol. 16. – P. 15–23.

104. Integrin beta-3 leu33-to-pro polymorphism and risk of hip fracture: 25 years follow-up of 9233 adults from the general population / C.L. Tofteng, P. Bach-Mortensen, S.E. Bojesen [et al.]. – Text : visual // *Pharmacogenet. Genomics*. – 2007. – Vol. 17. – P. 85-91. [PMID: 17264806]

105. Jacobsen, B.K. Age at natural menopause and all-cause mortality: a 37-year follow-up of 19,731 Norwegian women / B.K. Jacobsen. – Text : visual // *American Journal of Epidemiology*. – 2003. – Vol. 157, №10. – P. 923–929. – DOI:10.1093/aje/kwg066

106. Jacobsen, B.K. Age at natural menopause and total mortality and mortality from ischemic heart disease: the Adventist Health Study / B.K. Jacobsen, S.F. Knutsen, G.E. Fraser. – Text : visual // *J Clin Epidemiol*. – 1999. – Vol. 52. – P. 303–307.

107. Kasapoglu, I. Mitochondrial dysfunction and ovarian aging / I. Kasapoglu, E. Seli. – Text : visual // *Endocrinology*. – 2020. – Vol. 161. – P. bqaa001.

108. Koothirezhi, R. Postmenopausal Syndrome / R. Koothirezhi, S. Ranganathan. – Treasure Island: StatPearls, 2022. – Text : visual.
109. Laisk, T. Demographic and evolutionary trends in ovarian function and aging / T. Laisk, O. Tsuiko, T. Jatsenko. – Text : visual // Hum Reprod Update. – 2019. – Vol. 25. – P. 34–50.
110. Laven, J.S.E. Lessons from Genome-Wide Association Studies in Reproductive Medicine / J.S.E. Laven. – Text : visual // Seminars in reproductive medicine. – 2016. – Vol. 34, № 4. – P. 193–195. – DOI: 10.1055/s-0036-1585407
111. Lee, J.S. Polymorphism in interleukin-6 gene is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis / J.S. Lee, K.T. Suh, I.S. Eun. – Text : visual // J Bone Joint Surg Br. – 2010. – Vol. 92, № 8. – P. 1118-22. [PMID: 20675757]
112. Lefkovits, J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine / J. Lefkovits, E.F. Plow, E.J. Topol. – Text : visual // New Eng. J. Med. – 1995. – Vol. 332. – P. 1553-1559. [PMID: 7739710]
113. Level of fibrinogen and risk of fatal and non-fatal stroke. EUROSTROKE: a collaborative study among research centres in Europe / M.L. Bots, P.C. Elwood, J.T. Salonen [et al.]. – Text : visual // J Epidemiol Community Health. – 2002. – Vol. 56 (Suppl 1). – P. :i14-8.
114. Lipid profile of women with premature ovarian failure / E.A. Knauff, H.E. Westerveld, A.J. Goverde [et al.]. – Text : visual // Menopause. – 2008. – Vol. 15, № 5. – P. 919–923.
115. Long-term mortality associated with oophorectomy compared with ovarian conservation in the nurses' health study / W.H. Parker, D. Feskanich, M.S. Broder [et al.]. – Text : visual // Obstet Gynecol. – 2013. – Vol. 121. – P. 709–716.
116. Long-term overall and disease-specific mortality associated with benign gynecologic surgery performed at different ages / G.L. Gierach, R.M. Pfeiffer, D.A. Patel [et al.]. – Text : visual // Menopause. – 2014. – Vol. 21. – P. 592–601.

117. Management of osteoporosis in postmenopausal women the 2021 position statement of The North American Menopause Society. – Text : visual // Menopause. – 2021. – Vol. 28. – P. 973–997.
118. Menopausal hormone therapy for the management of osteoporosis / A. Gosset, J.M. Pouilles, F. Tremollieres [et al.]. – Text : visual // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2021. – Vol. 35. – P. 101551.
119. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham Study / W.B. Kannel, M.C. Hjortland, P.M. McNamara, T. Gordon. – Text : visual // Ann Intern Med. – 1976. – Vol. 85. – P. 447–452.
120. Menopause: Genome stability as new paradigm / J.S.E. Laven, J.A. Visser, A.G. Uitterlinden [et al.]. – Text : visual // Maturitas. – 2016. – Vol. 92. – P. 15–23. – DOI:10.1016/j.maturitas.2016.07.006
121. Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways / L. Stolk, J.R.B. Perry, D.I. Chasman [et al.]. – Text : visual // Nat Genet. – 2012. – Vol. 44, № 3. – P. 260–268. – DOI: 10.1038/ng.1051.
122. Nelson, L. Primary ovarian insufficiency / L. Nelson. – Text : visual // New England Journal of Medicine. – 2009. – Vol. 360, №6. – P. 606–614.
123. Nelson, L.M. An update: spontaneous premature ovarian failure is not a menopause / L.M. Nelson, S.N. Convington, R.W. Rebar. – Text : visual // Fertil Steril. – 2005. – Vol. 83. – P. 1327–1332.
124. Newman, P.J. The human platelet alloantigens, Pl(A1) and Pl(A2), are associated with a leucine(33)/proline(33) amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing / P.J. Newman, R.S. Derbes, R.H. Aster. – Text : visual // J. Clin. Invest. – 1989. – Vol. 83. – P. 1778-1781.
125. Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency / A. Heddar, P. Dessen, D. Flatters [et al.]. – Text : visual // Mol Genet Genomics. – 2019. – Vol. 294. – P. 1527–1534.



126. Ovarian aging: molecular mechanisms and medical management / J. Tesarik, M. Galan-Lazaro, R. Mendoza-Tesarik. – Text : visual // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 1371.

127. Ovarian conservation at the time of hysterectomy and long-term health outcomes in the nurses' health study / W.H. Parker, M.S. Broder, E. Chang [et al.]. – Text : visual // *Obstet Gynecol.* – 2009. – Vol. 113. – P. 1027–1037.

128. Paciuc, J. Hormone therapy in menopause / J. Paciuc. – Text : visual // *Adv Exp Med Biol.* – 2020. – Vol. 1242. – P. 89–120.

129. Panay, N. Management of premature ovarian failure / N. Panay, E. Kalu. – Text : visual // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* – 2009. – Vol. 23, №1. – P. 129–140.

130. P1 (A2) polymorphism of beta-3 integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin at the site of microvascular injury / A. Undas, K. Brummel, J. Musial [et al.]. – Text : visual // *Circulation.* – 2001. – Vol. 104. – P. 2666-2672. [PMID: 11723016]

131. Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis / F. Atsma, M.-L.E.L. Bartelink, D.E. Grobbee [et al.]. – Text : visual // *Menopause.* – 2006. – Vol. 13, № 2. – P. 265–279. – DOI: 10.1097/01.gme.0000218683.97338.ea

132. Premature menopause is associated with increased risk of cerebral infarction in Japanese women / Y. Baba, S. Ishikawa, Y. Amagi [et al.]. – Text : visual // *Menopause.* – 2010. – Vol. 17. – P. 506–510.

133. Premature menopause or early menopause and risk of ischemic stroke / W.A. Rocca, B.R. Grossardt, V.M. Miller [et al.]. – Text : visual // *Menopause.* – 2012. – Vol. 19. – P. 272–277.

134. Premature menopause or early menopause: long-term health consequences / L.T. Shuster, D.J. Rhodes, B.S. Gostout [et al.]. – Text : visual // *Maturitas.* – 2010. – Vol. 65. – P. 161–166.

135. Premature menopause, clonal hematopoiesis, and coronary artery disease in postmenopausal women / M.C. Honigberg, S.M. Zekavat, A. Niroula [et al.]. – Text : visual // *Circulation*. – 2021. – Vol. 143. – P. 410–423.
136. Prognostic value of circulating levels of endothelin-1 in patients after acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty / H.K. Yip, Chiung-Jen Wu, Hsueh-Wen Chang [et al.]. – Text : visual // *Chest*. – 2005. – Vol. 127. – P. 1491–1497.
137. Promotion of angiogenesis toward transplanted ovaries using nitric oxide releasing nanoparticles in fibrin hydrogel / C. Yang, N. Chung, C. Song [et al.]. – Text : visual // *Biofabrication*. – 2021. – Vol. 14. – P. 011001.
138. Quality control of fibrinogen secretion in the molecular pathogenesis of congenital afibrinogenemia / D. Vu, C. Di Sanza, D. Caille [et al.]. – Text : visual // *Hum. Molec. Genet.* – 2005. – Vol. 14. – P. 3271-3280.
139. Rahman, I. Relationship between age at natural menopause and risk of heart failure / I. Rahman, A. Akesson, A. Wolk. – Text : visual // *Menopause*. – 2015. – Vol. 22. – P. 12–16.
140. Rankinen, T. Effect of endothelin 1 genotype on blood pressure is dependent on physical activity or fitness levels / T. Rankinen. – Text : visual // *Hypertension*. – 2007. – Vol. 50, № 6. – P. 1120–1125.
141. Receptor tyrosine kinases-instructed release of its inhibitor from hydrogel to delay ovarian aging / Z. Shi, X. Li, M. Wei [et al.]. – Text : visual // *Biomaterials*. – 2021. – Vol. 269. – P. 120536.
142. Regional mapping of the plasminogen activator inhibitor type 1 gene to 7q21.3-q22 and assignment to the CF linkage group (Abstract) / K.W. Klinger, R. Winqvist, P.A. Andreassen [et al.]. – Text : visual // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1987. – Vol. 46. – P. 640.
143. Remote-controllable bone-targeted delivery of estradiol for the treatment of ovariectomy-induced osteoporosis in rats / Y. Guo, Y. Liu, C. Shi [et al.]. – Text : visual // *J Nanobiotechnol.* – 2021. – Vol. 19. – P. 248.

144. Reproductive history and mortality from cardiovascular disease among women textile workers in Shanghai, China / L.G. Gallagher, L.B. Davis, R.M. Ray [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Epidemiology*. – 2011. – Vol. 40, №6. – P. 1510–1518. – DOI:10.1093/ije/dyr134

145. Risk factors for diabetes mellitus in women with primary ovarian insufficiency / M. Kulaksizoglu, S.H. Ipekci, L. Kebapcilar [et al.]. – Text : visual // *Biol Trace Elem Res*. – 2013. – Vol. 154, № 3. – P. 313–320.

146. Risk of ischemic stroke and lifetime estrogen exposure / M. Alonso de Lecinana, J.A. Egido, C. Fernandez [et al.]. – Text : visual // *Neurology*. – 2007. – Vol. 68. – P. 33–38.

147. Santacruz-Marquez, R. Comparative effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on growth and ultrastructure of ovarian antral follicles / R. Santacruz-Marquez, A. Solorio-Rodriguez, S. Gonzalez-Posos. – Text : visual // *Reprod Toxicol*. – 2020. – Vol. 96. – P. 399–412.

148. Screening of the endothelin1 gene (EDN1) in a cohort of patients with essential left ventricular hypertrophy / M.G. Castro, F. Rodríguez-Pascual, N. Magán-Marchal [et al.]. – Text : visual // *Ann Hum Genet*. – 2007. – Vol. 71, Pt 5. – P. 601–610.

149. Serum lipid levels in women with premature ovarian failure / I. Gulhan, G. Bozkaya, I. Uyar [et al.]. – Text : visual // *Menopause*. – 2012. – Vol. 19, № 11. – P. 1231–1234.

150. Smoke, alcohol and drug addiction and female fertility / C. de Angelis, A. Nardone, F. Garifalos [et al.]. – Text : visual // *Reprod Biol Endocrinol*. – 2020. – Vol. 18. – P. 21.

151. Spanish consensus on premature menopause / N. Mendoza, D. Julia, D. Galliano [et al.]. – Text : visual // *Maturitas*. – 2015. – Vol. 80. – P. 220–225.

152. Stella, A. A sensitive and specific ESI-Positive LC-MS/MS method for the quantitation of estrogens in human serum in under three minutes / A. Stella, S. Dey. – Text : visual // *J Chromatogr Sci*. – 2021. – Vol. 59. – P. 280–288.

153. Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: nonrandom distribution of introns / D.J. Loskutoff, M. Linders, J. Keijer [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry*. – 1987. – Vol. 26. – P. 3763-3768.

154. Survival patterns after oophorectomy in premenopausal women: a population-based cohort study / W.A. Rocca, B.R. Grossardt, M. de Andrade [et al.]. – Text : visual // *Lancet Oncol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 821–828.

155. T(-786)-C mutation in the 5-prime-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm / M. Nakayama, H. Yasue, M. Yoshimura [et al.]. – Text : visual // *Circulation*. – 1999. – Vol. 99. – P. 2864-2870.

156. Tanus-Santos, J.E. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants / J.E. Tanus-Santos, M. Desai, D.A. Flockhart. – Text : visual // *Pharmacogenetics*. – 2001. – Vol. 11. – P. 719-725.

157. The association between early menopause and risk of ischaemic heart disease: influence of hormone therapy / E. Lokkegaard, Z. Jovanovic, B.L. Heitmann [et al.]. – Text : visual // *Maturitas*. – 2006. – Vol. 53, №2. – P. 226–233. – DOI:10.1016/j.maturitas.2005.04.009

158. The cardiovascular effects of premature ovarian failure / H. Yorgun, L. Tokgözoğlu, U. Canpolat [et al.]. – Text : visual // *Int J Cardiol.* – 2013. – Vol. 168, № 1. – P. 506–510.

159. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children / L.J. Bloem, A.K. Manatunga, D.A. Tewksbury, J.H. Pratt. – Text : visual // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 95. – P. 948-953. [PMID: 7883995]

160. The interleukin 6 -572 G>C (rs1800796) polymorphism is associated with the risk of developing acute coronary syndrome / J.M. Fragoso, H. Delgadillo, T. Juárez-Cedillo [et al.]. – Text : visual // *Genet Test Mol Biomarkers*. – 2010. – Vol. 14, № 6. – P. 759-63. [PMID: 20939703]

161. Towards international standardization of immunoassays for Mullerian inhibiting substance/anti-Mullerian hormone / J.M. Ferguson, D. Pepin, C. Duru [et al.]. – Text : visual // *Reprod Biomed Online*. – 2018. – Vol. 37. – P. 631–640.

162. Treg deficiency-mediated TH 1 response causes human premature ovarian insufficiency through apoptosis and steroidogenesis dysfunction of granulosa cells / X. Jiao, X. Zhang, N. Li [et al.]. – Text : visual // Clin Transl Med. – 2021. – Vol. 11. – P. e448.

163. Turan, V. BRCA-related ATM-mediated DNA double-strand break repair and ovarian aging / V. Turan, K. Oktay. – Text : visual // Hum Reprod Update. – 2020. – Vol. 26. – P. 43–57.

164. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women / S.L. Ferrari, L. Ahn-Luong, P. Garnero [et al.]. – Text : visual // J. Clin. Endocr. Metab. – 2003. – Vol. 88. – P. 255-259.

165. Zhang, L. Effect of SNP polymorphisms of EDN1, EDNRA, and EDNRB gene on ischemic stroke / L. Zhang, R. Sui. – Text : visual // Cell Biochem Biophys. – 2014. – Vol.70, №1. – P. 233–239.