
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ УРОВНЕЙ ГОРМОНОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И Фолликулярной Жидкости ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЯИЧНИКОВ В ПРОГРАММАХ ЭКО

Д.О. Жорданидзе, Т.А. Назаренко

Кафедра акушерства, гинекологии, репродуктологии и перинатологии ФПШОВ
Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова
ул. Трубецкая, 8, стр. 2, Москва, Россия, 119991

Н.Д. Фанченко

ФГУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России
ул. Академика Опарина, 4, Москва, Россия, 117997

Представлены данные значений гормонов периферической крови и фолликулярной жидкости в циклах ЭКО в зависимости от количества пунктированных фолликулов. В периферической крови уровень Е2 в преовуляторном периоде положительно коррелирует с числом пунктированных фолликулов. Отмечено достоверное снижение концентрации АМГ в периферической крови в преовуляторный период по сравнению с его исходным значением. Уровни эстрадиола и прогестерона в фолликулярной жидкости не коррелируют с числом фолликулов и уровнем этих гормонов в периферической крови. Концентрации АМГ и ингибина В в фолликулярной жидкости оказались выше у пациенток с большим количеством пунктированных фолликулов.

Ключевые слова: экстракорпоральное оплодотворение, антимюллеров гормон, эстрадиол, прогестерон, фолликулярная жидкость.

Применение вспомогательных репродуктивных технологий в современной практике лечения бесплодия предоставляет широкие возможности для изучения процессов фолликуло- и оогенеза в женском организме [1, 2]. Уровни половых гормонов в периферической крови при стимуляции яичников гонадотропинами достаточно хорошо исследованы, показано, что концентрации эстрадиола и прогестерона зависят от степени гиперстимуляции яичников, числа растущих, преовуляторных фолликулов и образовавшихся желтых тел [3]. В настоящее время актуальными являются исследования, изучающие концентрации тех или иных биологически активных веществ в микроокружении ооцитов. Целью этих исследований являются поиск маркеров, способных определить качество ооцитов и эмбрионов. Исследователи стали определять в фолликулярной жидкости АМГ, ингибин В, ингибин А, эстрадиол, прогестерон, лептин, уровень сахаров, В- и Т-клетки, мелотонин, гомоцистеин, факторы роста и цитокины [4, 5, 6]. В итоге представлены всего несколько факторов, которые предположительно могут быть ассоциированы с исходом ЭКО. В первую очередь это касается уровней АМГ в фолликулярной жидкости. Ряд авторов показали, что высокое содержание АМГ в фолликулярной жидкости — маркер успешной имплантации эмбрионов [7]. Другие исследователи придерживаются противоположного мнения и связывают успех имплантации с низкими значениями АМГ в фолликулярной жидкости [8].

Целью исследования явилось изучение уровней гормонов в периферической крови и фолликулярной жидкости при стимуляции яичников гонадотропинами в циклах ЭКО.

Объем и методы исследования. В исследовании участвовали 136 пациенток с различными формами бесплодия. Из них 38 пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием, 41 — с синдромом поликистозных яичников, 39 женщин с малыми формами наружного генитального эндометриоза и 18 — с бесплодием неясного генеза. Средний возраст пациенток, вошедших в исследование, составил $30,7 \pm 3,3$ лет (от 20 до 37 лет).

Стимуляцию яичников проводили препаратами рФСГ в «длинных» протоколах с а-ГнРГ и протоколах с ант-ГнРГ. Производили подсчет числа фолликулов при УЗ-мониторировании стимулированного цикла и оценку уровней гормонов периферической крови и фолликулярной жидкости, полученной при трансвагинальной пункции яичников. В периферической крови пациенток оценивали уровни эстрадиола, прогестерона и АМГ в первый день стимуляции, в день введения овуляторной дозы чХГ и в день переноса эмбрионов. В фолликулярной жидкости оценивали уровни эстрадиола, прогестерона, АМГ и ингибина В. Значения указанных гормонов определяли как в общем объеме фолликулярной жидкости, так и в жидкости отдельных фолликулов.

В работе были применены следующие методы обработки данных: однофакторный дисперсионный анализ, сравнительный анализ переменных с помощью непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни для несвязанных совокупностей, сравнительный анализ средних тенденций с помощью *t*-критерия Стьюдента для несвязанных совокупностей, ранговый корреляционный анализ Спирмена. Для автоматизации статистической обработки использовали статистический пакет Statistica for Windows 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение. При стимуляции яичников в программах ЭКО количество растущих фолликулов было в среднем $15,7 \pm 6,1$ (от 2 до 38), количество пунктированных фолликулов — $13,9 \pm 5,3$ (от 2 до 35), число полученных ооцитов — $10,7 \pm 5,6$ (от 1 до 30). Ввиду большой разницы в количестве аспирированных фолликулов и полученных ооцитов между пациентками, все женщины были разделены на группы в зависимости от числа аспирированных фолликулов. Первую группу составили 31 женщина, которым при трансвагинальной пункции яичников произведена аспирация менее 5 фолликулов, вторую группу составили 69 пациенток, которым пунктировано 5—15 фолликулов, а у 36 женщин в программе ЭКО аспирировано более 15 фолликулов.

При определении уровня эстрадиола в преовуляторном периоде были выявлены достоверные различия в зависимости от количества аспирированных фолликулов, что не вызывало сомнений и было продемонстрировано в ранее проведенных многочисленных исследованиях [9]. Так, у пациенток с пункцией менее 5 фолликулов уровень E2 оказался $3382,4 \pm 1314$ пмоль/л, при пункции 5—15 фолликулов — $9342,4 \pm 5166$ пмоль/л, а при аспирации более 15 фолликулов — $15\,925,2 \pm 3223,4$ пмоль/л. Корреляции между исходным уровнем прогестерона и количеством аспирированных фолликулов не отмечено, а также не было достоверных различий в уровнях прогестерона в день переноса эмбрионов.

Исходная концентрация АМГ в периферической крови оказалась выше у пациенток с большим количеством аспирированных фолликулов. В день введения

тригера овуляции уровень АМГ снижался по сравнению с исходным уровнем на 47%, или в 1,9 раз. При пункции менее 5 фолликулов базальный уровень АМГ был $1 \pm 0,3$ нг/мл, в день введения тригера овуляции — $0,5 \pm 0,3$ нг/мл, у женщин с аспирацией 5—15 фолликулов — до начала стимуляции уровень АМГ — $2,7 \pm 1,6$ нг/мл и $1,5 \pm 0,8$ нг/мл в день введения тригера овуляции, и в случае пункции более 15 фолликулов $3,7 \pm 1,3$ нг/мл и $2 \pm 0,7$ нг/мл соответственно. Указанный факт, а именно достоверное снижение уровня АМГ в преовуляторный период индуцированного гонадотропинами цикла был представлен в некоторых работах [10, 11]. Вместе с тем объяснение этого феномена высказывается лишь предположительно. Считается, что АМГ является «независимым» маркером овариального резерва, он не связан с гонадотропными гормонами и половыми стероидами и не меняется в течение менструального цикла [3]. Однако в работах La Marca и R. Fancin показано некоторое недостоверное снижение уровня АМГ в преовуляторный период спонтанного менструального цикла и достоверное снижение в ФСГ индуцированном цикле. Возможно снижение концентрации АМГ в преовуляторный период стимулированного цикла может быть связано с включением в рост антральных фолликулов, которые продуцируют этот гормон.

Кроме периферической крови уровни Е2, П, АМГ и ингибина В определяли в общей фолликулярной жидкости, полученной при трансвагинальной пункции яичников, концентрации Е2 и П также были определены в фолликулярной жидкости индивидуального фолликула. Как оказалось, уровни Е2 и П в фолликулярной жидкости не отражают количество пунктированных фолликулов, т.е. концентрация этих гормонов была одинакова у женщин с пункцией как 5, так и 20 фолликулов. Уровни Е2 $810\ 761 \pm 82\ 575$ пмоль/л и П $40\ 069 \pm 13\ 766$ нмоль/л при пункции менее 5 фолликулов и Е2 $810\ 554 \pm 96\ 144$ пмоль/л и П $40\ 471 \pm 14\ 315$ нмоль/л при пункции более 15 фолликулов. Соответственно уровни этих гормонов не коррелировали с уровнями эстрадиола и прогестерона в периферической крови в цикле стимуляции. Более того, концентрации Е2 и П в фолликулярной жидкости отдельного фолликула соответствовали таковой в жидкости, полученной в результате пункции всех имеющихся фолликулов, уровни Е2 — $1\ 195\ 251 \pm 949\ 889$ пмоль/л и П — $39\ 794 \pm 13\ 098$ нмоль/л в отдельной фолликулярной жидкости и Е2 — $904\ 196 \pm 104\ 059$ пмоль/л, П — $41\ 075 \pm 14\ 497$ нмоль/л в общей фолликулярной жидкости соответственно. Объем полученной фолликулярной жидкости также не отражал концентрацию эстрадиола и прогестерона в ней, так при объеме жидкости до 1,5 мл уровни Е2 и П составили $1\ 079\ 168 \pm 867\ 137$ пмоль/л и $37\ 032 \pm 16\ 923$ нмоль/л соответственно, при объеме 1,0—3,0 мл Е2 был $1\ 257\ 771 \pm 953\ 194$ пмоль/л и П — $39\ 358 \pm 12\ 971$ нмоль/л, и при объеме фолликулярной жидкости более 3,0 мл Е2 — $1\ 331\ 861 \pm 1\ 109\ 342$ пмоль/л и П — $37\ 874 \pm 10\ 120$ нмоль/л. Более того, не было различий в концентрации этих гормонов между фолликулами, из которых были получены ооциты, с так называемыми «пустыми» фолликулами. При наличии ооцита в фолликуле уровень Е2 — $1\ 125\ 946 \pm 971\ 486$ пмоль/л и уровень П — $38\ 376 \pm 13\ 473$ нмоль/л, в «пустых» фолликулах Е2 — $1\ 472\ 015 \pm 954\ 096$ пмоль/л и П — $39\ 036 \pm 10\ 301$ нмоль/л.

Концентрация АМГ в фолликулярной жидкости оказалась достоверно выше у пациенток с большим количеством пунктированных фолликулов. Так, при пункции менее 5 фолликулов уровень АМГ оказался $2,8 \pm 1,9$ нг/мл, при пункции 5—15 фолликулов — $4,6 \pm 3,9$ нг/мл и при пункции более 15 фолликулов — $4,1 \pm 2,9$ нг/мл. Ингибин В был определен только в фолликулярной жидкости, так как его роль в периферической крови достаточно ясна. Оказалось, что концентрация ингибина В также положительно коррелирует с количеством аспирированных фолликулов, при пункции менее 5 фолликулов ингибин В оказался $11,4 \pm 8$ нг/мл, при пункции 5—15 фолликулов — $19,4 \pm 9,1$ нг/мл, а при пункции более 15 фолликулов — $17,4 \pm 8,9$ нг/мл. Следует отметить, что уровни АМГ и ингибина В достоверно не различались между группами с пунктированными фолликулами от 5 до 15 и группой пациенток, у которых пунктировано более 15 фолликулов.

Уровни гормонов в фолликулярной жидкости в зависимости от количества аспирированных фолликулов представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Уровни гормонов в фолликулярной жидкости
в зависимости от количества аспирированных фолликулов**

Количество аспирированных фолликулов	< 5 фолликулов	5—15 фолликулов	> 15 фолликулов
Уровень Е2, пмоль/л	810 761 ± 82 575	1 091 274 ± 133 460	810 554 ± 96 144
Уровень прогестерона, нмоль/л	40 069 ± 13 766	42 686 ± 15 411	40 471 ± 14 315
Уровень АМГ, нг/мл	2,8 ± 1,9* **	4,6 ± 3,9	4,1 ± 2,9
Уровень ингибина В, нг/мл	11,4 ± 8* **	19,4 ± 9,1	17,4 ± 8,9

Примечания: * $p < 0,05$ имеются достоверные различия между группами < 5 и 5—15 аспирированных фолликулов; ** $p < 0,05$ имеются достоверные различия между группами < 5 и > 15 аспирированных фолликулов.

Заключение. Результаты проведенного исследования подтверждают, что уровень Е2 в периферической крови в преовуляторном периоде индуцированного цикла отражает количество растущих, пунктированных фолликулов и полученных ооцитов. Снижение концентрации АМГ в периферической крови в преовуляторный период может быть связано с включением в рост малых антральных фолликулов, которые продуцируют антимюллеров гормон. Можно предположить, что снижение концентрации АМГ в преовуляторный период стимулированного цикла связано с уменьшением фолликулярного пула. Это высказывание носит предположительный характер и требует более тщательного и всестороннего изучения динамики уровня АМГ как в спонтанном, так и ФСГ-индуцированном цикле. Уровни эстрадиола и прогестерона в фолликулярной жидкости не отражают количества пунктированных фолликулов. Можно предположить, что секреция этих гормонов в фолликуле происходит автономно, регулируется внутрифолликулярными факторами, которые, по всей видимости, вырабатываются клетками гранулезы и именно секреторная активность этих клеток обеспечивает характер внутрифолликулярного окружения. Обнаружено, что уровень АМГ в периферической крови достоверно снижается в преовуляторный период индуцированного цикла по срав-

нению с исходным значением. Исходный уровень АМГ в периферической крови и уровень гормона в фолликулярной жидкости прямо коррелирует с числом пунктированных фолликулов и полученных ооцитов.

Несмотря на детальное исследование уровней гормонов в фолликулярной жидкости, проведенного сравнения с многими факторами (концентрация гормонов в периферической крови, количество пунктированных фолликулов, объем фолликулярной жидкости, наличие ооцита в аспирированном фолликуле), нам не удалось установить диагностическую значимость определенных параметров. Выявленные изменения концентраций АМГ в процессе индуцированного цикла как в периферической крови, так и в фолликулярной жидкости, представляются интересными и могут явиться поводом для дальнейших исследований роли АМГ в прогнозе исхода программ ВРТ.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Mamamitsi-Puchner A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF // RBMOnline. — 2006. — V. 12. — P. 95—101.
- [2] Ильина А.А., Калинина И.И., Трошина Т.Г. и др. Фолликулярная жидкость, как среда, определяющая качество ооцита и исход программ ВРТ // Пробл. репродукции. — 2008. — № 4. — С. 27—38.
- [3] Кулаков В.И., Леонов Б.В. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия: Руководство для врачей. — М.: МИА, 2004. — 782 с.
- [4] Яманова М.В., Светлаков А.В., Салмина А.Б. и др. Микроокружение ооцита при эндокринном бесплодии // Пробл. репродукции. — 2004. — № 4. — С. 46—50.
- [5] Anifandis G., Koutselini E., Stefanidis I. et al. Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality // Reproduction. — 2005. — Vol. 130. — P. 917—921.
- [6] Hill M.J., Uyehara C.F., Hashiro G.M. et al. The utility of serum leptin and follicular fluid leptin, estradiol, and progesterone levels during an in vitro fertilization cycle // J. Ass. Reprod. Genet. — 2007. — V. 24. — № 5. — P. 183—188.
- [7] Andersen C.Y., Rosendahl M., Byskov A.G. Concentration of AMH and inhibin B in relation to steroids and age in follicular fluid from small antral human follicles // The journal of clinical endocrinology and metabolism. — 2008. — V. 93. — № 6. — P. 2344—2349.
- [8] Fanchin R., Daniel H., Lozano M., Frydman N. et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in IVF // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. — 2007. — V. 92. — № 5. — P. 1796—1802.
- [9] Csemickzky G. Luteal phase oestradiol and progesterone levels are stronger predictors than follicular phase FSH for the outcome for IVF treatment in women with tubal infertility // Hum. Reprod. — 1996. — Vol. 11. — P. 2396—2399.
- [10] Fanchin R., Mandez Lozano D.H., Louafi N. et al. Dynamics of serum AMH levels during the luteal phase of controlled ovarian hyperstimulation // Hum. Reprod. — 2005. — Vol. 20. — P. 747—751.
- [11] La Marca., Malmusi S., Giulini S. et al. AMH plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation // Hum. Reprod. — 2004. — Vol. 19. — P. 2738—41.

**DIAGNOSTIC VALUE OF HORMONES CONCENTRACION
IN BLOOD AND FOLLICULAR FLUID
DURING OVARIAN STIMULATION IN IVF CYCLES**

D.O. Zhordanidze, T.A. Nazarenko

Chair obstetrics, gynecology, reproductology and perinatology
Moscow state university

The first Moscow state medical university of a name of I.M. Setchenov
Trubetsky str., 8, p. 2, Moscow, Russia, 119991

N.D. Fanchenko

Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology n.a. V.I. Kulakov
Akademika Oparina str., 4, Moscow, Russia, 117997

We present data on concentrations of serum and follicular fluid hormones in IVF cycles in relation to the number of punctured follicles. Circulating periovulatory estradiol levels correlated positively with the number of punctured follicles. We observed significant decrease in circulating AMH concentrations in periovulatory period compared to baseline levels. Estradiol and progesterone concentrations in follicular fluid did not correlate with the number of follicles or serum levels of these hormones. AMH and inhibin B in follicular fluid were higher in patients with greater number of punctured follicles.

Key words: in vitro fertilization, anti-mullerian hormone, estradiol, progesterone, follicular fluid.